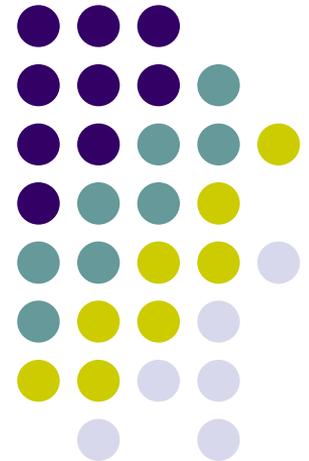


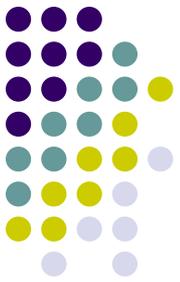
# SPERMOCULTURE

---

Florence GRATTARD  
MCU-PH  
CHU de Saint Etienne

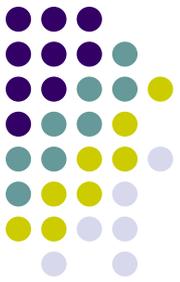


## Déclaration de conflit d'intérêt



- Abbott : étude pour évaluation de la PCR sur spermatozoïdes

# Contexte



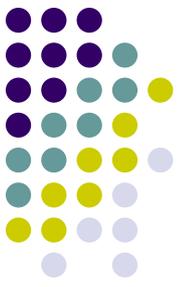
- Spermoculture indiquée dans 3 circonstances:
  - Diagnostic d'une infection haute de la sphère génitale masculine
  - Recherche d'une cause infectieuse d'infertilité
  - Contrôle de la qualité du sperme avant assistance médicale à la procréation (AMP)

# Diagnostic d'une infection haute de la sphère génitale masculine



- **Différents tableaux cliniques:**
  - Urétrite,
  - Prostatite,
  - Orchi-épididymite : chez le sujet jeune souvent précédée ou associée à urétrite ou prostatite aiguë
- **Recherche des germes responsables d'IST:**
  - *C. trachomatis*, gonocoque, mycoplasmes, syphilis
- **Particularités:**
  - infection à *C. trachomatis* souvent pauci-symptomatique, voire asymptomatique : diagnostic de l'infection non réalisé → risque de transmission aux partenaires

# Recherche d'une cause infectieuse d'infertilité



- Conséquence de l'infection sur le tractus génital masculin
  - Pas de certitude sur un rôle direct des germes dans les obstructions génitales masculines : qq obstructions partielles décrites avec azoospermie secondaire

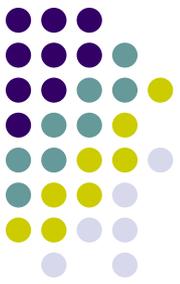
Tableau 2. Résumé des possibles associations entre certains agents infectieux et l'infertilité (tiré de l'article de Pellati et al.) [10]

Micro-organismes		Testicule-épididyme	Prostate-glandes accessoires	Altérations des paramètres spermatiques
Bactéries	<i>C. trachomatis</i>	Prouvée	Douteuse	Possible
	<i>N. gonorrhoeae</i>	Prouvée	Probable	Probable
	<i>M. hominis</i>	Douteuse	Douteuse	Douteuse
	<i>U. urealyticum</i>	Douteuse	Douteuse	Douteuse
	<i>M. genitalium</i>	Douteuse	Douteuse	S'attache aux spermatozoïdes
	Bactéries associées aux vaginoses	Douteuse	Douteuse	Douteuse
	<i>E. coli</i>	Prouvée, fréquente	Prouvée, fréquente	Possible
Levures	<i>Candida spp.</i>	Douteuse	Douteuse	Rares cas
Parasites	<i>T. vaginalis</i>	Douteuse	Douteuse	Probables sous certaines conditions
Virus	HPV	Douteuse	Douteuse	Nécessite d'autres investigations
	HSV	Douteuse	Douteuse	Probable

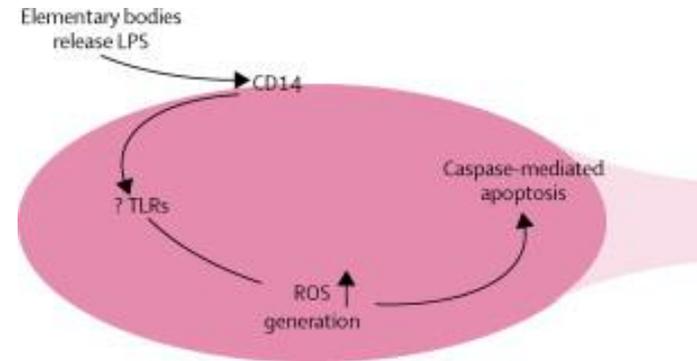
Putin et al. *Med Reprod, Gynecol Endoc* 2010, 13:233-241

Pellati et al. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio* 2008, 140:3-11

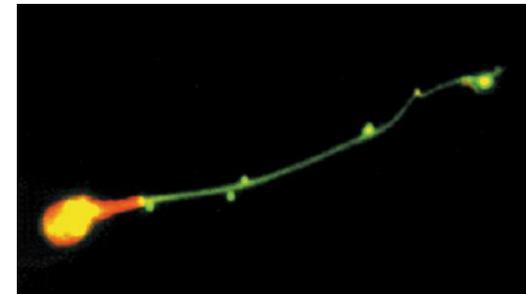
# Recherche d'une cause infectieuse d'infertilité

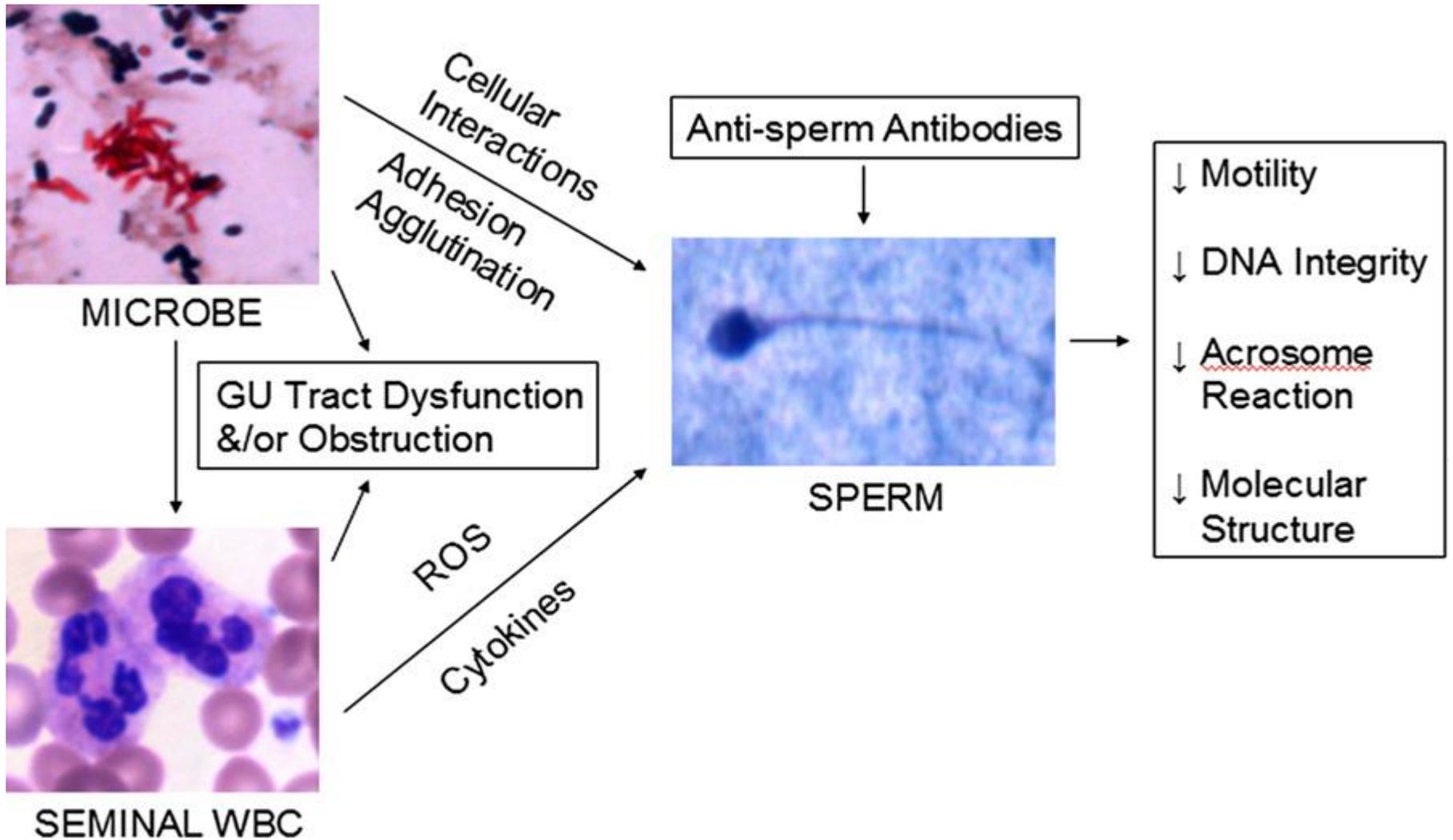


- Conséquence de l'infection sur le tractus génital masculin
- Conséquences de l'infection sur les spermatozoïdes (spz)
  - **Leucospermie** serait un facteur d'infertilité:
    - baisse de mobilité spermatique
    - lésions de l'ADN mitochondrial
    - altération de morphologie des spermatozoïdes
    - fragmentation de l'ADN spermatique (↑radicaux libres, LPS de *C. trachomatis*) → apoptose des spz
  - **Autoimmunisation** contre les spz (*C. trachomatis* et mycoplasmes)
  - **Adhérence** des germes sur les spz (*C. trachomatis*, *M. genitalium*)



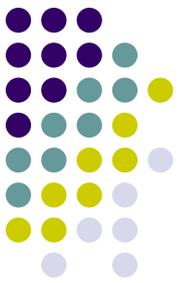
CE de *C. trachomatis* fluorescent adhérent au spz  
*Eley et al. Lancet.infect. Dis 2005; 5: 53-57*





*Domes et al. Seminal bacteria and leukocytes in subfertile men. Fertil Steril 2012.*

# Recherche d'une cause infectieuse d'infertilité



- **Conséquence de l'infection sur le tractus génital masculin**
- **Conséquences de l'infection sur les spermatozoïdes**
- **Difficultés dans l'interprétation des études reliant infection et infertilité**
  - Diversité dans les méthodes d'analyse de la qualité du sperme, type d'échantillon analysé
  - Diversité dans les groupes de patients étudiés
  - Rôle des infections aiguës ou chroniques?
  - Rôle des infections mixtes?

*Eley et al. Can C. trachomatis directly damage your sperm? Lancet.infect. Dis 2005; 5: 53-57*

## Difficulties in interpreting whether *C trachomatis* infection can affect semen quality

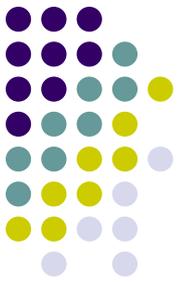
- Accuracy of method used to assess semen quality
- Timing of semen quality examination following *C trachomatis* infection
- Type of specimen used to determine *C trachomatis* infection in the upper genital tract
- Accuracy of method used to detect *C trachomatis*
- Importance of acute or past *C trachomatis* infection
- Relevance of mixed infections to semen quality
- Size and statistical significance of patient group(s) studied

# Contrôle de la qualité du sperme avant AMP



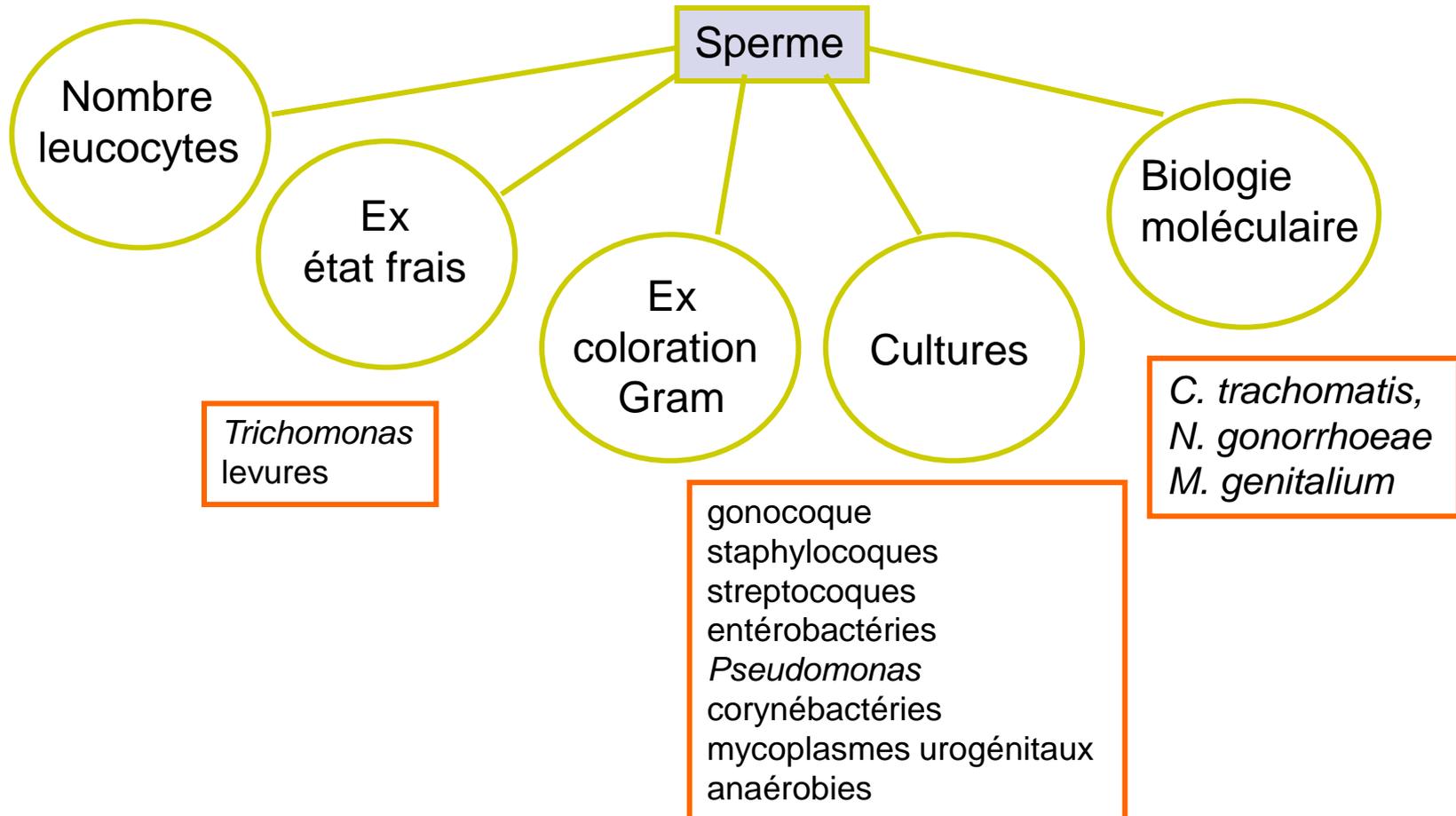
- **Indications: éviter la contamination de la femme par le sperme infecté lors des étapes d'Aide Médicale à la Procréation**
  - Risques théoriques:
    - perte de chances pour la survenue de grossesse
    - transmission de l'infection à la partenaire
  - **Risque de contamination des milieux de culture** pendant les manipulations d'AMP
  - Bénéfices attendus du traitement
    - amélioration des paramètres spermatiques (mobilité, morphologie spz) et potentiellement du taux de grossesse naturelle.  
*Vacari Human Reprod 2000 15:2536-44*
    - possibilité d'utiliser des techniques d'AMP plus simples

# Examen cytobactériologique du sperme (au minimum 500 µl)

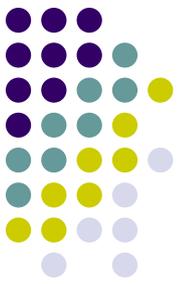


Étape pré analytique : primordiale

→ éviter la contamination du prélèvement par la flore commensale cutanéomuqueuse de la zone urogénitale



# Examen cyto bactériologique du sperme



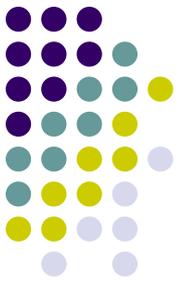
## Étape pré analytique ++:

→ éviter la contamination du prélèvement par la flore commensale cutanéomuqueuse de la zone urogénitale

→ va conditionner la qualité des résultats de la culture

- Recueil impératif dans un labo accrédité si AMP
- Explications du protocole de recueil par **voie écrite et orale**++
  - Recueil du sperme après abstinence de 2 à 5 jours, après vidange vésicale totale
  - Asepsie rigoureuse : toilette rigoureuse de la zone génitale et des mains et lavage au savon antiseptique et à l'eau chaude
  - Séchage
  - Recueil de l'éjaculat dans un flacon plastique stérile
  - Transport rapide au laboratoire pour permettre la mise en culture des germes fragiles (gonocoque...)
  - Liquéfaction possible 30 à 60 min à 37°C pour homogénéiser avant mise en culture

# Examen cyto bactériologique du sperme



## Détermination de la leucospermie

- la leucospermie serait un facteur d'infertilité mais :
  - Critères de l'OMS : GB à  $10^6$  leucocytes/ml associée à bactériospermie significatifs
  - « the clinical implications of white blood cells detected in a semen sample is as yet undetermined » *EAU Guidelines on Male Infertility, European Urology 48 (2005) 703–711*
- techniques:
  - coloration des leucocytes après réaction à la peroxydase (Leucoscreen®), pouvant sous-évaluer la leucospermie
  - quantification par cytométrie en flux

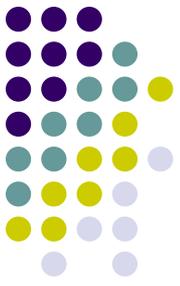
## Examen à l'état frais

- *Trichomonas vaginalis* et levures
- Le futur: biologie moléculaire avec PCR multiplex?

## Examen après coloration de Gram

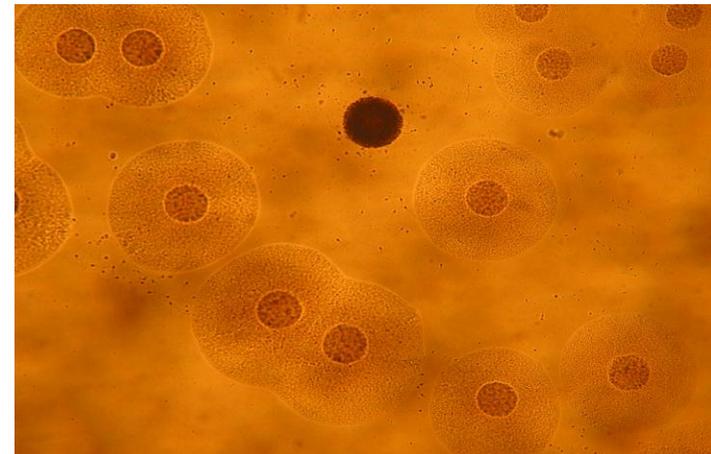
- estimation semi-quantitative du nombre de leucocytes
- présence éventuelle de germes et de levures

# Examen cyto bactériologique du sperme



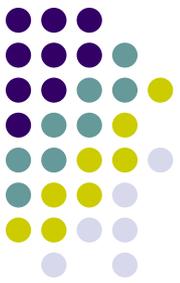
## Cultures bactériennes

- **semi-quantitatives**
  - sur milieux riches: gélose au sang, gélose « chocolat », VCAT
  - +/- gélose pour recherche d'entérobactéries
  - +/- gélose pré-réduite pour recherche d'anaérobies
- **semi-quantitatives pour les mycoplasmes génitaux (hors *M. genitalium*):**
  - galeries commerciales théoriquement non « validées » pour spermés
  - en cas d'utilisation (ex: 200 µl dans 2ml de bouillon A3 de la galerie mycoplasma DUO Biorad®) → dénombrement et réalisation possible d'un antibiogramme
- vérification de résultat positif en titrage conseillée :
  - soit par l'absence de croissance de germes usuels sur gélose ordinaire
  - soit par l'aspect des colonies sur milieu spécifique pour culture de mycoplasmes



*Spermoculture positive en UU et MH*

## Interprétation des résultats de cultures bactériennes

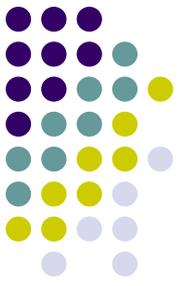


- si présence de germes pathogènes: antibiogramme pour *N. gonorrhoeae*
- pour autres germes, en fonction du caractère **monomorphe ou prédominant** dans la culture, identification et antibiogramme à partir de seuils de quantification (WHO: seuils à  $10^3$  UFC/ml, Boitrelle et al: seuils à  $10^2$  pour entérobactéries et *P. aeruginosa*)

**Tableau I.** Critères quantitatifs de prise en charge des bactéries identifiées dans la spermoculture.

Résultat de la culture ou de la PCR	Identification des germes	Conduite à tenir- Interprétation
Identification positive	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycoplasma genitalium</i>	Toujours pathogènes Faire antibiogramme si culture positive pour <i>N. gonorrhoeae</i>
Identification au seuil $\geq 10^2$ UFC/mL	Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Faire antibiogramme
Identification au seuil $\geq 5.10^3$ UFC/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Corynebacterium seminale</i> <i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> <i>Candida albicans</i> Anaérobies	Faire antibiogramme (sauf pour <i>G. vaginalis</i> et <i>C. albicans</i> )
Identification au seuil $\geq 10^4$ UFC/mL	Autres bactéries à Gram+ en culture monomorphe	Faire antibiogramme
Identification au seuil $\geq 10^4$ UCC/mL	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma</i> spp.	Faire antibiogramme spécifique si contexte d'AMP

# Examen cyto bactériologique du sperme



## Biologie moléculaire

Indications pour 3 agents pathogènes

- *C. trachomatis* +/- *N.gonorrhoeae*
- *M. genitalium*

Aucune trousse actuellement validée sur les prélèvements de sperme

- 2 contraintes:
- le sperme est un prélèvement qui contient des inhibiteurs de la réaction de PCR
  - la charge bactérienne dans le sperme est souvent faible



Etude réalisée au CHU de St-Etienne : proposer et évaluer un protocole de PCR sur l'automate M2000 (Abbott) applicable aux prélèvements de spermes

- facile à mettre en œuvre
- sensible



## 1. Quel volume de sperme utiliser pour la PCR (sans augmenter le risque d'inhibition)?

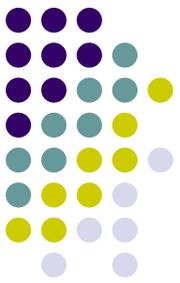
- Tests d'extraction réalisés sur M2000 sur différents volumes de spermes (de 50  $\mu$ l à 250  $\mu$ l) provenant d'échantillons différents
- Utilisation des extraits d'ADN pour quantification des cellules extraites par PCR temps réel avec la trousse cell control r-gene (Biomérieux)

→ Utiliser jusqu'à 200  $\mu$ L de sperme dilué dans 400  $\mu$ l de tampon Multicollect permet de récupérer plus de cellules

- Tests d'extraction réalisés sur M2000 sur différents volumes de spermes artificiellement contaminés avec des échantillons positifs en CT ou NG.
- Amplification avec la trousse Abbott CT/NG

→ Utiliser 200  $\mu$ L de sperme dilué dans 400  $\mu$ l de tampon Multicollect permet la détection de charges bactériennes théoriquement plus faibles, sans augmenter le % d'inhibition

→ Possibilité de conserver les spermes dilués en Multicollect à 4°C ou -20°C

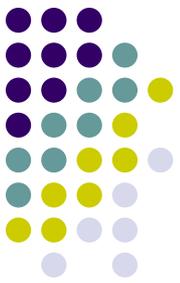


## 2. Evaluation du degré d'inhibition de la PCR réalisée sur échantillons de spermes

- Tests d'extraction réalisés sur M2000 sur 200 µl d'échantillons de spermes artificiellement contaminés avec le même volume d'échantillon positif en CT
- Amplification avec la trousse Abbott CT/NG

Semen specimens (200 µL) spiked with 200 µL of a CT-positive sample	CT crossing points	IC crossing points
Sample A	36.63	36.91
Sample B	35.87	37.3
Sample C	37.41	36.75
Sample D	38.07	37.71
Sample E	37.29	36.40
Sample F	37.55	37.14
Sample G	37.92	37.28
CV	0.020	0.011

→ Pour différents échantillons de spermes artificiellement contaminés par le même échantillon positif, le coefficient de variation de détection du signal positif est très faible : 2% (CV de 1,5% pour la détection du contrôle interne)

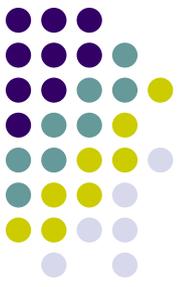


### 3. Sensibilité de détection de *C. trachomatis* sur échantillons de spermes

- Evaluation de la sensibilité de détection sur 200  $\mu$ L d'échantillons de spermes, contaminés par des dilutions décroissantes d'un lyophilisat quantifié du panel QCMD 2010

<b>Semen (200 <math>\mu</math>L) mixed with serial dilutions of the QCMD 10-07</b>	<b>Amounts of CT cells in copies/test</b>	<b>CT crossing points</b>	<b>IC crossing points</b>
Sample 1	2850	31.63	36.02
Sample 2	1425	32.43	36.05
Sample 3	712	33.76	36.07
Sample 4	356	34.87	36.44
Sample 5	178	35.83	36.26
Sample 6	89	35.83	36.20
Sample 7	44	36.98	36.22

→ seuil de sensibilité sur échantillons de spermes au moins équivalente à celle décrite par le fabricant pour la trousse CT/NG (320 copies)



## 4. Performances : répétabilité et reproductibilité

- Tests de répétabilité réalisés sur un échantillon de sperme artificiellement contaminé par un échantillon positif à la fois en CT et NG: 8 aliquots testés dans la même série
- Tests de reproductibilité réalisés sur un échantillon de sperme artificiellement contaminé par un échantillon faiblement positif en CT et positif en NG : aliquots conservés à 4°C et testés pendant 10 semaines consécutives

	CT crossing points	NG crossing points
test-01	29.20	31.93
test-02	30.09	33.05
test-03	29.09	31.62
test-04	29.98	32.77
test-05	29.31	31.97
test-06	30.24	33.22
test-07	29.89	32.88
test-08	29.34	31.90

CV	0.015	0.019
----	-------	-------

	date	CT crossing points	NG crossing points
test-01	10/01/2013	29.34	31.90
test-02	17/01/2013	28.60	31.49
test-03	24/01/2013	27.18	29.87
test-04	28/01/2013	29.89	32.53

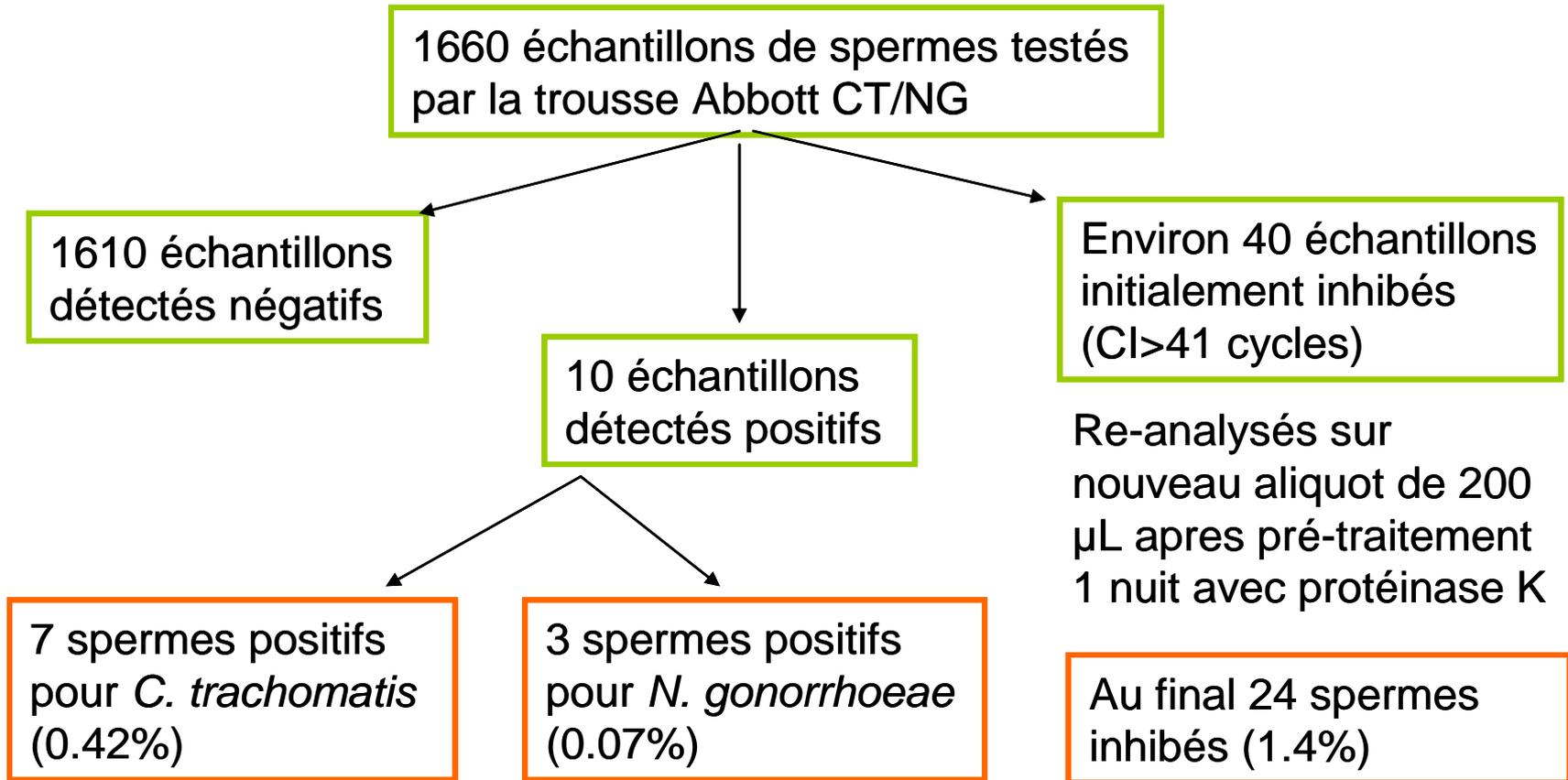
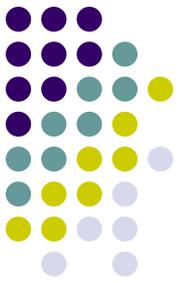
  

CV	0.041	0.036
----	-------	-------

→ Coefficient de variation pour les tests de répétabilité <2%

→ Coefficient de variation pour les tests de reproductibilité ≤ 4%

## 5. Bilan d'une évaluation prospective au CHU de Saint-Etienne de la PCR sur prélèvements de spermes de 2012 à 2013 (hors *M. genitalium*)



Examen cytbactériologique du sperme :  
bilan rétrospectif sur 3 ans (2012-2014) au CHU de Saint Etienne



2762 spermocultures

437 positives  
15,8%

***Ureaplasma spp*: 5,45%**  
**Enterobactéries et Pseudomonas: 3,91%**  
**total cocci Gram+: 3,91%**  
**dont streptocoques du groupe B: 1,96%**  
***G. vaginalis* en association: 0,90%**  
***C. trachomatis*: 0,91%**

## Données de la littérature

- Etude canadienne de 2001 à 2010 sur 7852 échantillons de spermes de patients consultant pour infertilité (*Domes. Fertil Steril* 2012)

Bactériospermie avec  $>10^3$  UFC/ml: **15%**

le top 4: *E. faecalis*

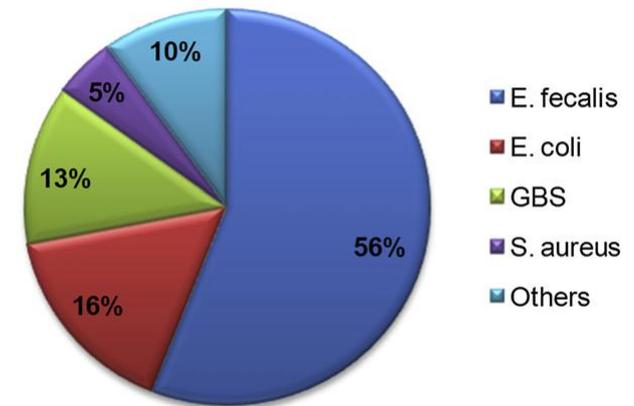
*E. coli*

*S. agalactiae* = GBS

*S. aureus*

Association non significative avec leucospermie

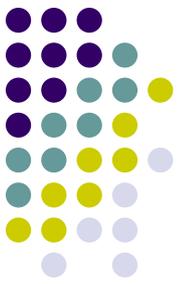
Bacteriospermia Species



- Pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, taux d'infection faibles dans notre étude (**<1%**), similaires à ceux observés dans d'autres études françaises réalisées sur de petites séries (n=100)

- [Hamdad-Daoudi et al. J Med Microbiol 2004, 53: 895-990](#) → 0,06% spermes + en CT, 7,3% d'échantillons inhibés (Cobas amplicor)
- [Rosemond et al. Path Biol 2006, 54:125-9](#) → 1 % sperme + en CT
- [Le Roy et al. J Med Microbiol 2013, 62:217-222](#) → 0 % (Cobas amplicor), 25  $\mu$ L de sperme par test.
- Taux d'infection à *C. trachomatis* bcp plus élevés dans d'autres pays :
  - 4,9% Royaume- Uni par nested PCR, 16,3% en Tunisie, 30% en Egypte

# Prise en charge du risque viral en AMP



**Bilan obligatoire avant AMP:** sérologies hépatites, HIV, HTLV et CMV

**Prise en charge des couples séro-différents vis-à-vis du HIV** (homme séropositif):

différentes fractions du sperme testées par PCR: [AMP non autorisée](#)

- si charge virale du plasma séminal > 100 000 copies/ml
- si charge du plasma <100 000 copies associée à détection positive d'ARN dans la fraction spermatozoïdes

## **Role des autres virus: HPV??**

PHRC national piloté par Pr Bourlet, CHU de Saint Etienne

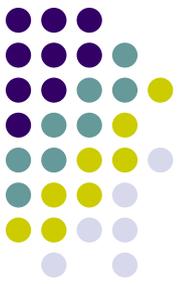
Résultats préliminaires non publiés (750 inclusions à ce jour)

190 spermés testés

**15,7% de détection d'ADN d'HPV dans le sperme!!!**

>50% de virus oncogènes

3 fractions détectées positives....



# Conclusions

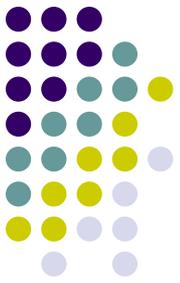
Points clés:

la spermoculture est indispensable avant AMP

- pour identifier des germes dont le rôle pathogène est certain:  
*C. trachomatis*, gonocoque, *M. genitalium*...
- pour identifier des agents microbiens en culture monomorphe ou prédominante, qui peuvent être responsables d'infertilité et/ou qui peuvent contaminer les fractions utilisées en AMP

Points en suspens:

- rôle et impact des infections mixtes
- nécessité de développement de tests moléculaires validés sur spermes
- comment traiter *M. genitalium*?
- faut-il dépister d'autres agents viraux tels que HPV ?



**Merci pour votre attention**