



**HAL**  
open science

## Détection du streptocoque B par PCR en temps réel dans des prélèvements vaginaux chez la femme enceinte

Caroll Le Risbe

► **To cite this version:**

Caroll Le Risbe. Détection du streptocoque B par PCR en temps réel dans des prélèvements vaginaux chez la femme enceinte. Sciences pharmaceutiques. 2001. dumas-01438441

**HAL Id: dumas-01438441**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01438441>**

Submitted on 17 Jan 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1<sup>er</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2001

N° 7048

**DETECTION DU STREPTOCOQUE B PAR PCR EN TEMPS  
REEL DANS DES PRELEVEMENTS VAGINAUX  
CHEZ LA FEMME ENCEINTE**

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**  
Conformément aux dispositions du décret n°90-810  
du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

Présenté à la Faculté de Pharmacie de Grenoble,  
et soutenu publiquement le 12 Novembre 2001  
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par **Caroll LE RISBE**

*[Données à caractère personnel]*

**JURY**

Président : Madame le Professeur R. Grillot  
Membres : Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin  
Monsieur le Docteur J.M. Ayoubi  
Monsieur le Docteur J. Croizé

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 2001

N°

**DETECTION DU STREPTOCOQUE B PAR PCR EN TEMPS  
REEL DANS DES PRELEVEMENTS VAGINAUX  
CHEZ LA FEMME ENCEINTE**

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**  
Conformément aux dispositions du décret n°90-810  
du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

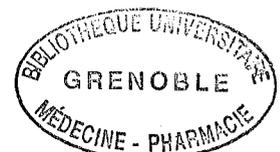
Présenté à la Faculté de Pharmacie de Grenoble,  
et soutenu publiquement le 12 Novembre 2001  
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par **Caroll LE RISBE**

*[Données à caractère personnel]*

**JURY**

Président : Madame le Professeur R. Grillot  
Membres : Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin  
Monsieur le Docteur J.M. Ayoubi  
Monsieur le Docteur J. Croizé



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galènique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio- technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galènique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotech.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BURMEISTER	Wilhelm	Physique
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
DELETRAZ	Martine	Droit Economie pharmaceutique
DIJOUX-FRANCA	M.-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie moléculaire structur
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie.
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie-Virologie.
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GUIRAUD	Pascale	Biologie cellulaire
GROSSET	Catherine	Chimie analytique
HININGER-FAVIER	Isabelle	LBSO-Biochimie C
KRIVOBOK	Serge	Botanique-Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie organique
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique Alimentaire
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RIBUOT	Diane	Physio. Pharmaco
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxico-Ecotoxicologie
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie Pharmacologie
TAILLANDIER	Georges	Chimie organique
VILLEMMAIN	Danièle	Physique Pharmacie
VILLET	Annick	Chimie analytique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté  
 Vice-Doyen  
 Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU  
 M. le Professeur J. P. CHIROSSEL  
 M. le Professeur J. LEBEAU  
 M. le Professeur J.P. ROMANET  
 M. le Professeur B. SELE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénérologie	HOSTEIN	Jean	Hépto-Gastro-Entérol.
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.	JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop.. et de la reproduction.
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques	JUVIN	Robert	Rhumatologie
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.	LAVIELLE	Jean-Pierre	O.R.L.
BARGE	Michel	Neurochirurgie	LE BAS	François	Biophys.et Trait. de l'Image.
BARRET	Luc	Médecine Légale	LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.	LEROUX	Dominique	Génétique
BEANI	J.-Claude	Dermatologie,Vénérologie	LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image	LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
BENSA	J. Claude	Immunologie	LEVY	Patrick	Physiologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique	LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécu.
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale	MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascul.
BLIN	Dominique	Chir. Thor.et Cardio Vascul.	MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
BOLLA	Michel	Radiothérapie	MALLION	J. Michel	Méd.du Trav. et Risques Prof.
BOST	Michel	Pédiatrie	MASSOT	Christian	Médecine Interne
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie	MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumatol.
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes	MICOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie	MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.	MOUILLON	Michel	Ophthalmologie
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.	MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique	MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
CARPENTIER	Patrick	Méd.Interne	PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Patho
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie	PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire	PAYEN de LA GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
CHARACHON	Robert	O.R.L.	PELLAT	Jacques	Neurologie
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie	PHELIP	Xavier	Rhumatologie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.	PISON	Christophe	Pneumologie
COLOMB	Maurice	Immunologie	POLACK	Benoit	Hématologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie	POLLAK	Pierre	Neurologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.	PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne	RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.	RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Med.	RAPHAEI.	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie	REYT	Emile	O.R.L.
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale	ROMANET	J. Paul	Ophthalmologie
DYON	J.François	Chirurgie Infantile	SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image	SCHAEERER	René	Cancérologie
FAURE	Claude	Anatomie	SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon	SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
FERRETTI	Gilbert	Radiologie centrale	SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie	SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
FOURNET	Jacques	Hépto-Gastro-Entéro.	STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
FRANCO	Alain	Médecine. Interne	VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.	VIALTEL	Paul	Néphrologie
GARNIER	Philippe	Pédiatrie	VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.	VUILLEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
GOULLIER-FLEURET	Andrée	Parasitologie et Mycologie	ZARSKI	J.Pierre	Hépto-Gastro-Entérol.
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire			
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale			
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol			
HALIMI	Serge	Nutrition			
HOMMEL	Marc	Neurologie.			

# REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur R. GRILLOT,  
pour l'honneur qu'elle me fait de présider ce jury de thèse

A Monsieur le Professeur J.M. SEIGNEURIN,  
pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury  
de thèse

A Monsieur le Docteur J. CROIZE,  
pour m'avoir accordé sa confiance, pour sa disponibilité et son soutien constant

A Monsieur le Docteur J.M. AYOUBI,  
pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse

A Karen BRENGEL-PESCE,  
pour sa disponibilité et son aide précieuse

Au Docteur Patrice MORAND,  
pour la pertinence de ses conseils

A Zette BOURGEAT et Gérard BARGUES,  
pour leur disponibilité, leurs conseils, et leur bonne humeur

A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie pour leur accueil chaleureux, leur aide et  
l'excellente ambiance de travail qu'ils ont su créer

A Monsieur le Professeur J.P. STAHL,  
pour son soutien dans la réalisation de ce travail

A Messieurs les Professeurs M. FAVIER et J.C. PONS,  
pour la collaboration des services de Gynécologie Obstétrique du CHU de Grenoble

A Mesdames F. BRANCHET, M. CHUIMENTO, F. PERESSE et à toutes les sages femmes des  
services de Gynécologie Obstétrique du CHU de Grenoble, qui m'ont de disposer de  
prélèvements

A mon père, qui m'a donné tout son amour et son affection, pour son soutien et sa présence  
pendant toutes ces années d'étude

A mon frère Eric et ma sœur Michèle, pour leur complicité et leur joie de vivre

A Lionel, pour sa patience et son soutien tout au long de ces années d'étude, cette thèse est  
également la sienne

A Martin, mon petit bonhomme qui illumine ma vie chaque jour un peu plus

A mes amis et ma belle-famille, pour leurs encouragements

A ma mère

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>1- DONNEES BACTERIOLOGIQUES SUR LE STREPTOCOQUE B</b>	<b>4</b>
1.1 Caractères morphologiques et cultureux	4
1.2 Habitat	4
1.3 Ultrastructure	4
1.3.1 La capsule	5
1.3.2 Le polysaccharide C	5
1.3.3 Autres composants de la paroi	5
1.4 Facteurs de virulence bactériens	5
1.4.1 La capsule	7
1.4.2 Les acides lipoteichoïques	7
1.4.3 La C5a peptidase	7
1.4.4 La hyaluronate lyase	7
1.4.5 La protéine C	8
1.4.6 L'hémolysine	8
1.4.7 Le CAMP-factor	8
1.4.8 La protéine Lmb	9
1.5 Epidémiologie	9
<b>2- INFECTIONS MATERNO-FŒTALES A STREPTOCOQUE B</b>	<b>10</b>
2.1 Colonisation maternelle par le streptocoque B	10
2.1.1 Epidémiologie de la colonisation maternelle	10
2.1.2 Particularités de la colonisation maternelle	11
2.2 Colonisation néonatale par le streptocoque B	11
2.3 Pouvoir pathogène du streptocoque B	12
2.3.1 Retentissement sur la grossesse	12
2.3.2 Infections maternelles	12

2.3.3 Infections néonatales	13
2.4 Rôle des défenses immunitaires	15
<b>3- PREVENTION DES INFECTIONS NEONATALES A STREPTOCOQUE B</b>	<b>17</b>
3.1 L'antibioprophylaxie	17
3.1.1 Stratégies de prévention	17
3.1.2 Traitement antibiotique recommandé	22
3.1.3 Prise en charge des nouveau-nés	23
3.2 L'immunoprophylaxie	25
<b>4- DIAGNOSTIC CHEZ LA FEMME ENCEINTE</b>	<b>26</b>
4.1 Démarche diagnostique actuelle	26
4.1.1 Prélèvement	26
4.1.2 Culture	26
4.1.3 Identification après culture	27
4.2 Intérêts et limites des techniques rapides	28
4.2.1 Tests d'agglutination	28
4.2.2 Tests immuno-enzymatiques	30
4.2.3 Apport de la biologie moléculaire	34
<b><u>OBJECTIFS</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>MATERIEL ET METHODES</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b>1- SOUCHE BACTERIENNE ET PRELEVEMENTS</b>	<b>38</b>
1.1 Souche bactérienne	38
1.2 Prélèvements vaginaux	38
1.2.1 Technique de référence	38
1.2.2 Préparation des prélèvements pour la PCR	38
<b>2- DETECTION DU STREPTOCOQUE B PAR PCR EN TEMPS REEL</b>	<b>39</b>
2.1 Extraction de l'ADN	39
2.1.1 Principe	39

2.1.2 Protocole	39
2.2 PCR en temps réel sur LightCycler	40
2.2.1 Principe	40
2.2.2 Fonctionnement	40
2.3 Amplification de l'ADN du streptocoque B	44
2.3.1 Choix des amorces	44
2.3.2 Conditions PCR	44
<b><u>RESULTATS</u></b>	<b>45</b>
1- MISE AU POINT DE LA DE LA PCR EN TEMPS REEL SUR LIGHTCYCLER	46
1.1 Optimisation de l'extraction d'ADN	46
1.2 Optimisation des conditions PCR	47
1.2.1 Test des amorces	47
1.2.2 Concentration en chlorure de magnésium et température d'hybridation	48
1.3 Etude de sensibilité	49
1.4 Etude de reproductibilité	51
2- APPLICATION AUX PRELEVEMENTS VAGINAUX	52
2.1 Conditions d'amplification	52
2.2 Résultats	52
<b><u>DISCUSSION</u></b>	<b>55</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>60</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>63</b>
<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>73</b>
1- Liste des abréviations	74
2- Liste des illustrations	75

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

Les premiers cas d'infection néonatale à *Streptococcus agalactiae*, ou streptocoque du groupe B, ont été décrits dans les années 1960. Depuis son émergence en pathologie infectieuse néonatale dans les années 1970, le streptocoque B est devenu la première cause d'infection bactérienne sévère du nouveau-né. Cette augmentation de l'incidence des septicémies et des méningites néonatales a été observée dans tous les pays industrialisés. Malgré les progrès thérapeutiques, ces infections néonatales restent associées à une morbidité et une mortalité importantes, notamment chez les prématurés. Les répercussions en terme de santé publique sont importantes en raison des séquelles neurologiques que ces infections peuvent entraîner chez le nouveau-né et des complications maternelles du *post-partum*.

Dans les années 1990 les efforts de prévention ont permis, avec la publication de recommandations pour la prévention des infections néonatales à streptocoque B par le CDC (Center for Diseases Control and Prevention) en 1996, de diminuer l'incidence de ces infections. L'identification des grossesses à risque, notamment le dépistage des femmes enceintes colonisées par le streptocoque B et l'antibioprophylaxie *per-partum*, sont les éléments clés de ces stratégies préventives.

La première partie de ce travail consiste en une revue de la littérature, composée d'une description de la bactérie, de sa pathogénicité chez la mère et le nouveau-né et des différentes attitudes préventives recommandées. Cette première partie se termine par l'étude des méthodes diagnostiques, et notamment l'intérêt et les limites des techniques rapides de dépistage du streptocoque B au moment de l'accouchement.

La seconde partie est composée d'un travail expérimental de mise au point et d'évaluation d'une technique rapide de détection du streptocoque B par PCR en temps réel (real time PCR).

**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1- Données bactériologiques sur le streptocoque B

## 1.1 Caractères Morphologiques et cultureux

Le streptocoque B se présente sous l'aspect de cocci à Gram positif, de diamètre voisin de 2µm, immobiles et asporulés. Ces cocci sont groupés en courtes chaînettes.

Les streptocoques B nécessitent pour leur multiplication de nombreux facteurs de croissance présents dans les milieux de culture complexes (gélose Trypticase-soja enrichie de 5% sang de mouton, bouillon Todd-Hewitt à base d'infusion de viande). La température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37°C et la culture est améliorée par une atmosphère contenant 5% de gaz carbonique. Les streptocoques B sont des anaérobies aérotolestants, catalase et oxydase négatifs (79).

Sur gélose au sang, après 24 heures d'incubation à 37°C, le streptocoque B donne des colonies assez typiques. Elles sont d'un diamètre de 1 à 2 mm, opaques et bombées avec un bord régulier, parfois muqueuses ou pigmentées, masquant une zone étroite d'hémolyse de type β. Notons que des variants non hémolytiques ont été décrits.

## 1.2 Habitat

Le réservoir naturel est humain mais également animal, le streptocoque B ayant été initialement isolé de lésions mammaires chez les bovidés. Chez l'Homme, le streptocoque B est un commensal de l'intestin, du vagin et du périnée (chez la femme), de l'urètre (chez l'homme), et des voies respiratoires supérieures (4).

## 1.3 Ultrastructure

La paroi des streptocoques B est constituée d'une capsule polysaccharidique, support des antigènes de type, d'un polyside C, support des antigènes de groupe et d'un peptidoglycane. La bactérie libère de nombreuses protéines extracellulaires (le CAMP-factor, une hémolysine, un pigment caroténoïde, une hyaluronate lyase et trois ribonucléases).

### **1.3.1 La capsule**

Partie la plus externe de la paroi, la capsule est formée d'un polyside ramifié spécifique de type (substance S) formé de D-galactose, de glucose, de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylneuraminique ou acide sialique (4). La capsule représente l'antigène majeur des streptocoques B. Les antigènes polysidiques capsulaires (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII et VIII), et leur association aux protéines de surface (C, R et X) sont à la base du sérotypage des streptocoques B utilisé en épidémiologie. Il existe également des souches non typables.

### **1.3.2 Le polyside C**

Le polyside C est formé de molécules polysidiques ramifiées. Il est situé entre la couche protéinique et le peptidoglycane, auquel il est associé par des liaisons covalentes. Les molécules de base de ce polyside sont le rhamnose, le N-acétylglucosamine et le galactose. Le polyside C représente l'antigène spécifique de groupe utilisé dans la méthode de Lancefield pour la classification des streptocoques en 17 sérogroupes (79).

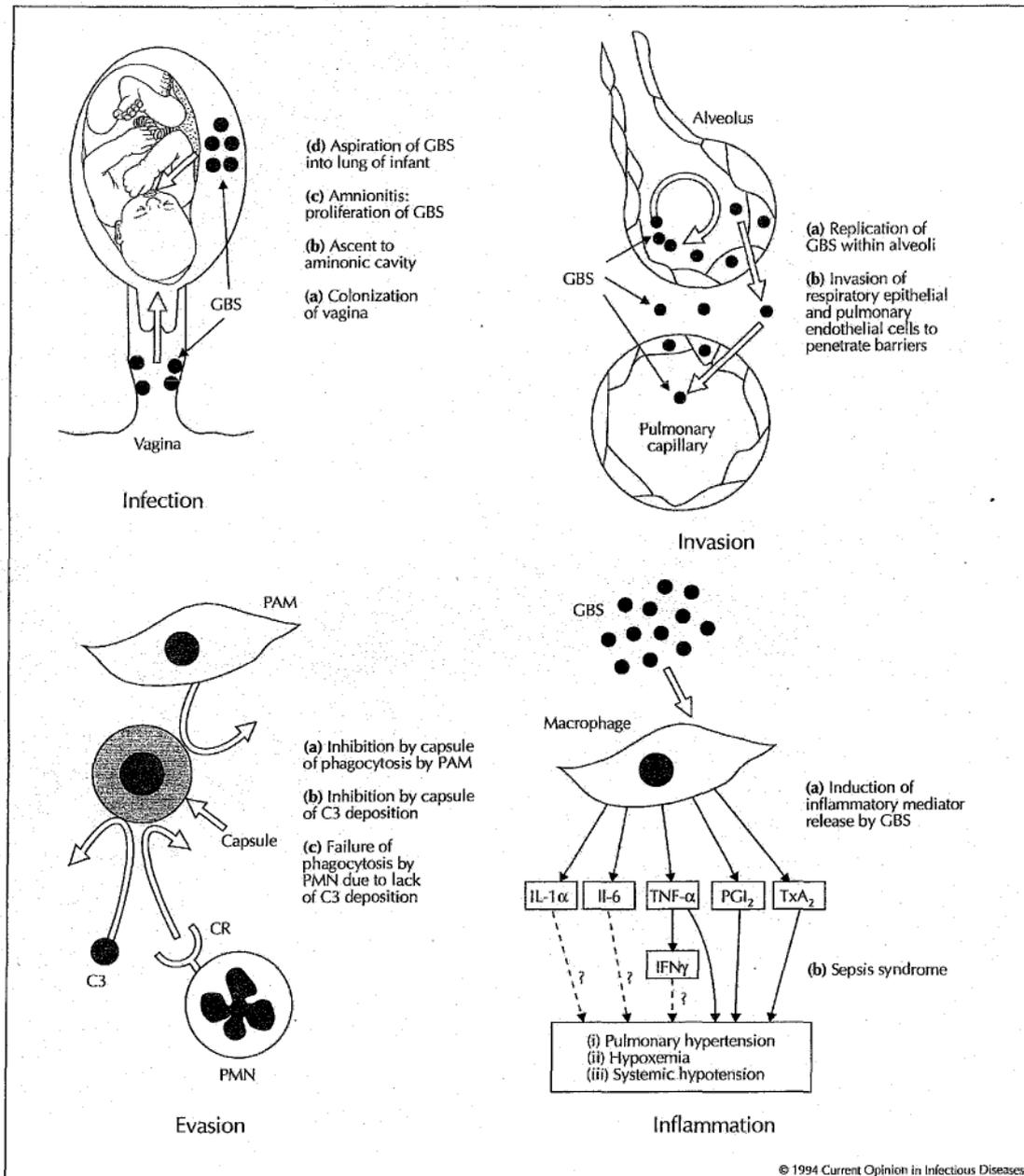
### **1.3.3 Autres composants de la paroi**

- Entre la capsule et le polyside C se trouve la couche protéinique formée par les protéines T, R, X et C.
- Le peptidoglycane est un constituant permanent de toutes les parois bactériennes dont il assure la rigidité. C'est un hétéropolymère formé d'un réseau de chaînes polysidiques reliées entre elles par de courtes chaînes peptidiques. C'est le constituant principal de la paroi bactérienne.
- Les acides lipoteichoïques sont des polymères linéaires de glycérol et de phosphore, amphiphiles et immunogènes. Ils sont ancrés par leur extrémité lipidique dans la membrane cytoplasmique. Les acides lipoteichoïques traversent la couche de peptidoglycane et le polyside C, puis ils s'étendent à l'extérieur de la bactérie sous la forme de longs filaments.

## **1.4 Facteurs de virulence bactériens**

La virulence du streptocoque B est liée à son pouvoir d'adhésion aux cellules, d'invasion des tissus et à son action sur le système immunitaire de l'hôte. La sécrétion de médiateurs

inflammatoires ( $TNF\alpha$ , thromboxane  $A_2$  et prostaglandine  $I_2$  notamment) induite par l'infection à streptocoque B, joue également un rôle important dans le syndrome septique (figure 1). Parmi les différentes souches, celles de sérotype I et III sont particulièrement virulentes.



**Figure 1** : mécanismes de pathogénicité du streptocoque B (86)

C3 (facteur 3 du complément), CR (récepteur du complément), INF (interféron), IL (interleukine), PAM (macrophage pulmonaire alvéolaire), PG (prostaglandine), TX (thromboxane), TNF (tumor necrosis factor).

### **1.4.1 La capsule**

La capsule est considérée comme le facteur de virulence le plus important. L'acide sialique qui entre dans la structure des composés polyosidiques capsulaires, inhibe l'opsonisation par le facteur C3 du complément ainsi que l'activation du complément par la voie alterne, ce qui bloque la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles (84). L'acide sialique interviendrait également dans les capacités invasives de la bactérie (84). Les souches de sérotype III possèdent dans leur capsule une concentration particulièrement élevée en acide sialique.

### **1.4.2 Les acides lipoteichoïques**

L'adhésion d'une bactérie à un tissu représente l'étape initiale de l'infection. Pour le streptocoque B, cette étape est nécessaire à l'invasion des cellules épithéliales du nouveau-né. Le mécanisme d'adhérence fait intervenir les acides lipoteichoïques (84). Les récepteurs spécifiques de ces acides se trouvent essentiellement sur les tissus immatures. Ainsi le streptocoque B adhère de façon plus efficace aux cellules épithéliales néonatales qu'aux cellules épithéliales matures de l'adulte. Cette étape est un facteur déterminant de l'infection du nouveau-né. Les acides lipoteichoïques interviendraient également dans la libération de cytokines proinflammatoires par les monocytes (84).

### **1.4.3 La C5a peptidase**

Sérine estérase produite par de nombreuses souches de streptocoque B, cette peptidase inactive le facteur C5a du complément par clivage. Elle contribue ainsi à la virulence de la bactérie par inhibition de la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles en interférant avec l'activité chimiotactique du facteur C5a (84).

### **1.4.4 La hyaluronate lyase**

Cette protéine faciliterait la dissémination de la bactérie dans les tissus par clivage de l'acide hyaluronique, composant majeur du tissu conjonctif (84). La hyaluronate lyase est sécrétée à un taux particulièrement élevé par les souches de sérotype III.

#### 1.4.5 La protéine C

Ce complexe protéique est formé de quatre composés antigéniques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), les composés  $\alpha$  et  $\beta$  sont exprimés à la surface de la bactérie. La protéine C est retrouvée chez environ 60% des souches de streptocoque B isolées de prélèvements cliniques (59). Elle est notamment présente dans la majorité des souches de sérotype Ia, Ib et II. Dans les souches de sérotype III on retrouve une protéine de surface appelée Rib, très similaire au composé  $\alpha$  de la protéine C (84). La protéine C semble contribuer à la résistance de la bactérie en interférant avec les mécanismes d'opsonisation et de phagocytose. Elle serait également associée au développement d'une immunité protectrice (59).

Le composé  $\beta$  de la protéine C se fixe au fragment Fc des immunoglobines A, ce qui pourrait jouer un rôle critique dans la résistance de la bactérie aux défenses mucosales de l'hôte (59).

#### 1.4.6 L'hémolysine

Cette protéine est responsable de l'hémolyse des hématies de différentes espèces de mammifères (mouton, cheval). Son rôle comme facteur potentiel de virulence est discuté. Elle aurait un effet cytopathogène sur les cellules de l'épithélium pulmonaire (84).

#### 1.4.7 Le CAMP-factor

Protéine extracellulaire diffusible produite par la grande majorité des streptocoques B. Cette protéine sensibilise les hématies de mouton à l'action hémolytique de l'hémolysine  $\beta$  de *Staphylococcus aureus*. Cette hémolysine staphylococcique est en fait une sphingomyérase qui va convertir la shingomyéline présente dans la membrane des érythrocytes en céramide. Le CAMP-factor va ensuite se fixer sur les contenus membranaires en céramide formés, ce qui conduit à une instabilité physico-chimique de la membrane et à une lyse cellulaire (46).

L'expression du CAMP-factor apparaît contribuer à la virulence des streptocoques B mais son mécanisme de pathogénicité demeure inconnu. Sa fixation sur le fragment Fc des immunoglobulines G et M pourrait rendre inefficace le mécanisme d'opsonisation de ces immunoglobulines (84).

### 1.4.8 La protéine Lmb

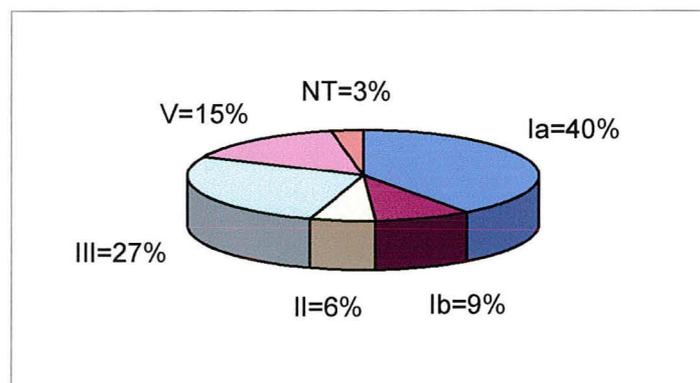
Récemment une nouvelle protéine de surface a été décrite, la Lmb (Laminin binding), présente dans tous les sérotypes. Cette lipoprotéine permet l'attachement des streptocoques B à la laminine humaine, ce qui pourrait contribuer à la colonisation des cellules épithéliales par la bactérie (84).

## 1.5 Epidémiologie

Les dernières études épidémiologiques ont montré un changement au cours des dix dernières années, dans la distribution des sérotypes des streptocoques B isolés d'infections invasives chez les nouveau-nés. Les sérotypes Ia et III restent prédominants, alors que le sérotype II a diminué et le sérotype V est apparu. Une étude récente aux USA, chez des nouveau-nés atteints d'infections invasives, montre la répartition suivante des différents sérotypes : Ia 40%, Ib 9%, II 6%, III 27%, V 15% et non typable 3%. Les sérotypes IV, VI, VII et VIII sont rarement retrouvés dans les infections néonatales (55).

L'émergence du sérotype V, depuis quelques années, est confirmée par d'autres auteurs. Dans une étude de 1996, réalisée sur des souches de streptocoque B isolées d'infection invasive chez des adultes et des nourrissons, le sérotype V représentait 21% des souches (24).

La répartition des sérotypes semble variable selon les zones géographiques. Des études au Japon décrivent les sérotypes VI (25%) et VIII (36%) comme prédominants parmi les souches de streptocoque B isolées chez des femmes enceintes colonisées (52).



**Figure 2** : répartition des sérotypes de streptocoque B responsables d'infections néonatales (55)  
(NT = souches non typables)

## **2- Infections materno-fœtales à streptocoque B**

### **2.1 Colonisation maternelle par le streptocoque B**

La prévalence du portage asymptomatique du streptocoque B chez la femme enceinte varie de 10 à 30%, suivant les études, avec en moyenne un taux de 20 à 25% en Amérique du Nord et de 10 à 15% en Europe. Ces chiffres varient en fonction des populations étudiées, des sites de prélèvements (vagin ou rectum) et de la méthode de culture utilisée (enrichissement sur milieu sélectif ou non). Une étude multicentrique réalisée en Ile de France en 1992, sur près de 1900 femmes, a montré un taux moyen de colonisation maternelle de 10% (8,6 à 13,2% selon les centres) (53).

#### **2.1.1 Epidémiologie de la colonisation maternelle**

L'épidémiologie de la colonisation maternelle est complexe. Plusieurs équipes ont tenté de dégager des critères de sélection susceptibles de classer la future mère en patiente à forte probabilité de colonisation. Une des études épidémiologiques les plus importantes a été réalisée sur 7742 femmes enceintes aux Etats Unis (73). Différents facteurs ont été associés à une colonisation vaginale importante. Selon l'origine ethnique la prévalence était différente : les hispaniques originaires des Caraïbes étaient les plus colonisées, suivies des femmes noires, puis des femmes blanches et des hispaniques originaires du Mexique. D'autres études ont également retrouvé une colonisation plus fréquente chez les femmes noires. La colonisation par le streptocoque B est également plus fréquente chez les femmes primipares par rapport aux femmes multipares.

Autre facteur associé à une colonisation plus importante, le diabète. Ramos et coll. ont rapporté un taux de colonisation de 43,8% chez des femmes diabétiques, contre 22,7% dans un groupe témoin (72).

Dans les pays en voie de développement, les taux de colonisation semblent similaires à ceux retrouvés aux Etats-Unis et en Europe. Une publication a recensé les études de prévalence de la colonisation vaginale par le streptocoque B dans ces pays (34 études incluant 7730 femmes). Le taux de colonisation global était de 17,8% avec la répartition suivante selon les zones géographiques : Afrique du Nord et Moyen Orient 22%, Asie et Pacifique 19%, Afrique subsaharienne 19%, Inde et Pakistan 12% et Amériques 14% (85).

### **2.1.2 Particularités de la colonisation maternelle**

Le réservoir primaire du streptocoque B semble être le tube digestif, à partir duquel s'effectue la colonisation des voies génitales (13, 45). Le streptocoque B est isolé au moins deux fois plus fréquemment dans les prélèvements rectaux par rapport aux prélèvements vaginaux. Dillon et coll. ont montré que le tractus intestinal était le premier site de contamination par la bactérie chez des femmes auparavant non colonisées (33). Il existerait également une transmission sexuelle du streptocoque B.

La colonisation vaginale maternelle est très instable. Des auteurs ont étudié la persistance de cette colonisation tout au long de la grossesse et ont défini trois catégories de portage. (10, 97). Le portage est dit chronique si l'on retrouve au moins trois cultures consécutives positives avec le même sérotype. Il est dit transitoire si l'on retrouve une culture positive encadrée de deux cultures négatives, et intermittent si l'on retrouve au moins deux cultures positives séparées par une culture négative. Une femme porteuse de streptocoque B à un moment donné de sa grossesse peut donc ne plus l'être à son accouchement et inversement. Les deux études montrent qu'environ un tiers des femmes sont des porteuses chroniques. L'isolement du streptocoque B au niveau du rectum pourrait prédire la persistance du portage vaginal et serait associé à un portage chronique (33).

## **2.2 Colonisation néonatale par le streptocoque B**

La colonisation d'un nouveau-né est révélée par une culture positive au niveau de prélèvements périphériques (gorge, peau, ombilic, rectum), du placenta ou du liquide gastrique. Selon Schuchat et coll., le taux de colonisation néonatale par le streptocoque B est de 5 à 40%, variant selon la population étudiée, la méthode de culture utilisée, le site prélevé et le nombre de prélèvements effectués (82). Le streptocoque B est isolé de 10 à 20% des liquides gastriques des nouveau-nés (79).

La colonisation néonatale survient chez 50 à 70% des nourrissons nés de mères colonisées au moment de l'accouchement. Malgré ce taux élevé de transmission, seuls 1 à 3% des nouveau-nés colonisés développeront une infection symptomatique (60).

Une colonisation maternelle importante et la persistance du portage au cours de la grossesse sont les facteurs de risque de transmission périnatale les plus importants (45).

La transmission du streptocoque B aux nouveau-nés peut se faire selon quatre voies différentes (61). La contamination in utéro transcervicale par voie ascendante, avec ou sans rupture des membranes, est la voie la plus fréquente. L'infection fœtale est secondaire à la déglutition ou à l'aspiration du liquide amniotique infecté (figure 1). Cette transmission est responsable des formes précoces d'infections, apparaissant dès les premières heures de vie.

La contamination du nouveau-né lors du passage dans la filière génitale est la deuxième voie de transmission verticale. Elle est moins fréquente que la précédente et est responsable des formes précoces d'infections à début retardé, apparaissant entre le troisième et le septième jour de vie. L'invasion bactérienne se fait alors par la traversée des téguments, des muqueuses conjonctivales, digestives ou respiratoires du nouveau-né.

Le fœtus peut également être contaminé par voie hématogène au cours d'une bactériémie chez la mère. Mais ce mode de contamination semble beaucoup plus rare.

Enfin, le dernier mode de contamination est la transmission horizontale, après la naissance, par la mère ou le personnel soignant. La transmission peut également se faire d'enfant à enfant par l'intermédiaire du personnel soignant. Cette contamination postnatale est responsable des infections néonatales tardives.

## **2.3 Pouvoir pathogène du streptocoque B**

### **2.3.1 Retentissement sur la grossesse**

La littérature est assez univoque sur le retentissement du portage asymptomatique du streptocoque B sur l'évolution de la grossesse (23). La relation entre portage vaginal maternel et accouchement prématuré est démontrée en cas de forte colonisation. La relation entre rupture prématurée des membranes et colonisation vaginale maternelle est, quant à elle plus discutée.

### **2.3.2 Infections maternelles**

L'incidence des infections puerpérales à streptocoque B serait de 2% des grossesses (22). Le streptocoque B serait responsable de 20% des endométrites du *post-partum*, de 15 à 30% des

chorioamniotites et de 25% des bactériémies maternelles après césariennes. Il peut également être responsable d'infections urinaires, d'abcès de paroi et plus rarement d'infections invasives (22, 23).

Les infections maternelles périnatales à streptocoque B sont favorisées par une forte colonisation génitale, l'existence d'une bactériurie à streptocoque B, un accouchement prématuré et surtout, par la réalisation d'une césarienne (23). La présence d'une bactériurie asymptomatique est reconnue comme liée à une forte colonisation vaginale. A la différence des chorioamniotites, le risque d'endométrites du *post-partum* ne semble pas influencé par l'importance de la colonisation maternelle (51).

On a pu constater que la prévention de la transmission néonatale du streptocoque B par une antibiothérapie *per-partum* réduit significativement les endométrites du *post-partum*. Suite aux efforts de prévention des infections néonatales par antibioprophylaxie *per-partum*, l'incidence des infections invasives à streptocoque B a diminué de 21% chez la femme enceinte entre 1993 et 1998, aux Etats-Unis (80).

### **2.3.3 Infections néonatales**

En estimant la prévalence du portage vaginal maternel à 20% et la colonisation des nouveau-nés de mères porteuses à 50%, Goldenberg et coll. prévoient annuellement aux Etats-Unis la naissance de 400 000 nouveau-nés colonisés, de 6800 cas d'infections néonatales évoluant favorablement sans séquelle, de 400 décès et de 1200 enfants infectés avec séquelles neurologiques (39).

Les infections néonatales à streptocoque B peuvent se présenter sous deux formes cliniques différentes.

#### ***a) La forme précoce (early-onset disease)***

L'infection précoce est la forme la plus fréquente des d'infections néonatales; elle représente environ 80 à 85% des cas. Ces infections néonatales à streptocoque B sont rares mais gravissimes. On estime leur fréquence entre 1 et 3‰ des naissances vivantes, 5‰ chez les nourrissons nés de mères colonisées et 40‰ en cas de facteurs de risque périnataux associés (28). Les dernières études américaines indiquent des taux de 0,8 à 1,6‰ des naissances vivantes (70, 80).

Le tableau clinique se développe au cours de la première semaine de vie, et dans 80% des cas dans les premières 24 heures. Cette infection est caractérisée principalement par une septicémie accompagnée ou non d'une pneumonie. Les signes respiratoires (apnée, détresse respiratoire) sont fréquents. Une localisation méningée peut être observée dans 5 à 15% des cas.

La contamination par voie ascendante transcervicale est responsable de la majorité des formes précoces débutant dans les 48 premières heures de vie.

La mortalité des infections précoces est en nette diminution depuis plusieurs années, probablement en raison des progrès du traitement symptomatique de réanimation et de l'antibiothérapie. Ce taux de mortalité est actuellement de 5 à 15%, contre 20 à 40% dans les années 1980 et 30 à 90% dans les années 1970 (23, 80). La prématurité augmente significativement le risque de mortalité, avec un taux de 25 à 30% chez les prématurés de moins de 33 semaines, contre 2 à 8% pour un enfant né à terme (22, 80).

Il existe de nombreux facteurs de risque de l'infection néonatale précoce à streptocoque B (19). Etant donné la voie de transmission, le principal facteur de risque est la colonisation vaginale maternelle au moment de l'accouchement. Le taux d'infection augmente avec le degré de cette colonisation. Une chorioamniotite est également un marqueur de haut risque d'infection néonatale, même chez des enfants dont les mères ont reçu un traitement antibiotique prophylactique.

Les autres facteurs de risque reconnus sont (19, 81) :

- un accouchement prématuré (< 37 semaines de gestation)
- une fièvre maternelle supérieure à 37,5°C pendant le travail
- une rupture prématurée des membranes
- une rupture prolongée des membranes (>12 ou 18 heures)
- un faible poids de naissance (<2,5kg)
- une bactériurie à streptocoque B pendant la grossesse
- un faible taux sérique d'anticorps maternels dirigés contre les antigènes

polysaccharidiques du streptocoque B

- un âge maternel inférieur à 20 ans
- un antécédent d'un enfant ayant eu une infection à streptocoque B

### ***b) La forme tardive (late-onset disease)***

L'infection tardive débute entre le 7<sup>ème</sup> jour et le 3<sup>ème</sup> mois de vie, en moyenne un mois après la naissance, mais elle peut survenir jusqu'à 6 mois. Sa fréquence est de 0,5 à 1‰ des naissances vivantes. Elle atteint préférentiellement des enfants en bonne santé nés à terme. La forme clinique habituelle est une méningite. On retrouve plus rarement une septicémie. L'arthrite septique, l'ostéomyélite et la cellulite sont d'autres manifestations de cette forme tardive. Dans 90% des formes méningées, les streptocoques B impliqués sont des souches de sérotype III.

Le taux de mortalité est plus faible qu'au cours des infections précoces, autour de 2 à 6% (16). En revanche, en raison de la fréquence des méningites, les risques de séquelles neurologiques sont plus importants.

Les infections tardives résultent généralement d'une transmission horizontale, mais il existe également une transmission verticale, lors du passage dans la filière génitale. Les travaux de Dillon et coll. sont les premiers à suggérer l'hypothèse d'une transmission materno-fœtale verticale à révélation tardive (34). En effet, la moitié des nouveau-nés présentant une infection tardive étaient colonisés à la naissance.

Les facteurs de risque et la pathogénicité de l'infection tardive ne sont pas très bien connus.

## **2.4 Rôle des défenses immunitaires**

La réaction de défense de l'hôte contre le streptocoque B fait appel à trois éléments du système immunitaire agissant de concert (36) → le complément, les anticorps spécifiques de type et les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et macrophages alvéolaires).

La susceptibilité du nouveau-né aux infections est due à l'immaturation de son système immunitaire. Les défenses du nouveau-né sont limitées, principalement par un défaut d'opsonisation et de phagocytose, conséquence notamment d'un taux plus faible en protéines du complément (de l'ordre de 40% par rapport à adulte pour un nouveau-né à terme). Ceci est aggravé par des anomalies fonctionnelles des phagocytes. Les polynucléaires neutrophiles sont déficients en récepteurs CR3, récepteurs du facteur C3b du complément, ce qui diminue

la capacité de phagocytose de ces polynucléaires neutrophiles. La présence d'anticorps spécifiques maternels (IgG), transmis par passage transplacentaire, protège le nouveau-né des formes invasives. Ces anticorps permettent l'activation du complément par la voie alterne.

En l'absence d'opsonisation par le complément ou par les anticorps spécifiques, la phagocytose et donc l'élimination du streptocoque B par les polynucléaires neutrophiles sont diminuées, ce qui augmente les risques d'infection.

Les prématurés sont plus exposés au risque d'infection du fait d'une immaturité plus accentuée de leur système immunitaire, de leur faible poids et d'un faible taux d'anticorps maternels ayant traversés la barrière placentaire. Ces anticorps sériques maternels sont en effet, en quantité insuffisante pour assurer parfaitement leur rôle protecteur avant 32 semaines de grossesse.

L'incidence des infections précoces à streptocoque B est supérieure chez les prématurés par rapport aux nouveau-nés à terme, et comme nous l'avons vu, les taux de mortalité sont plus élevés chez ces nourrissons.

### 3- Prévention des infections néonatales à streptocoque B

Face à l'importance et à la gravité des infections néonatales à streptocoque B, différentes approches préventives ont été proposées au cours des 20 dernières années.

#### 3.1 L'antibioprophylaxie

##### 3.1.1 Stratégies de prévention

Une des premières stratégies proposées était d'identifier les femmes enceintes colonisées et de les traiter pendant la grossesse. Les différentes tentatives d'éradication du streptocoque B de la flore vaginale et intestinale, par un traitement antibiotique par voie générale pendant la grossesse, se sont soldées le plus souvent par un échec. La plupart des études ont montré une recolonisation des femmes après arrêt du traitement, même dans les cas où le conjoint était traité simultanément, pour éviter une recontamination des femmes par voie sexuelle (37).

Une autre approche a été de traiter les enfants à leur naissance, en particulier les prématurés. Plusieurs équipes ont tenté de prévenir la survenue des infections néonatales à streptocoque B par traitement antibiotique intra-veineux à la naissance. Ce traitement néonatal s'est avéré peu efficace. L'étude randomisée de Pyati et coll. n'a montré aucune différence significative entre le groupe traité et le groupe témoin (71). Dans la mesure où l'infection débute le plus souvent in utero, la majorité des nouveau-nés sont déjà bactériémiques à la naissance, ce qui explique l'échec de cette stratégie préventive.

En 1979 Yow et coll. proposent une nouvelle approche : le traitement prophylactique *per-partum* par ampicilline des mères colonisées (96). Ce traitement s'est révélé d'emblée efficace, puisque la transmission verticale semblait être interrompue, le taux de colonisation néonatale chutant nettement et aucun cas d'infection n'étant retrouvé dans le groupe étudié. Plusieurs études ont démontré par la suite une diminution de la colonisation des nouveau-nés et de l'incidence des infections précoces à streptocoque B grâce à l'administration d'une chimio prophylaxie *per-partum* chez des femmes enceintes à risque (3, 20, 58, 63, 71, 89).

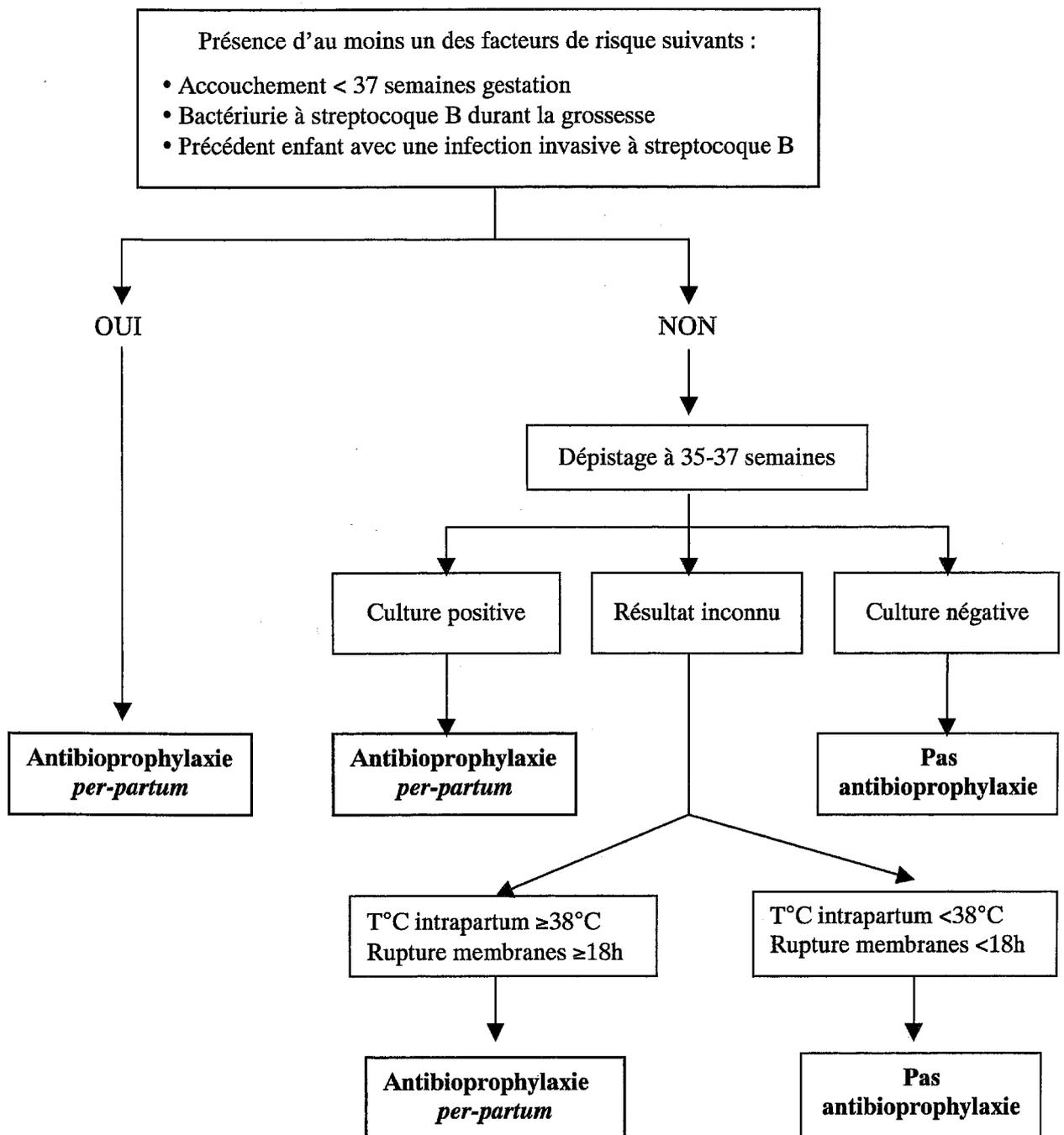
En 1986 Boyer et coll. (27), ont effectué un dépistage du streptocoque B au niveau vaginal chez des femmes enceintes, entre la 26<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine de grossesse, et ont traité à l'accouchement les mères positives ayant en plus un facteur de risque (gestation <37 semaines, rupture des membranes >12 heures ou fièvre). Une diminution très nette de l'incidence des infections néonatales précoces a été constatée. En comparant un groupe de 85 mères traitées pendant l'accouchement (2g ampicilline IV puis 1g/4h jusqu'à accouchement) et un groupe témoin de 79 mères non traitées, ils ont montré une diminution très significative de la colonisation des nouveau-nés (9,4% dans le groupe traité contre 50,6% dans le groupe non traité), et une diminution de la fréquence des infections néonatales précoces (aucune dans le groupe traité contre 5 cas dans le groupe non traité dont 1 décès).

Les résultats de ces différentes études ont aboutit en 1992 à la publication de recommandations élaborées par l'American Academy of Pediatrics (AAP) (6) et l'American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG) (7). Le but était d'arriver à mieux définir les groupes de femmes à risque devant bénéficier d'une chimioprophylaxie *per-partum*.

L'ACOG recommandait de traiter toutes les femmes présentant à l'accouchement un des facteurs de risque d'infection néonatale suivants : âge gestationnel <37 semaines, rupture prématurée des membranes <37 semaines, rupture prolongée des membranes >18 heures, fièvre *per-partum*, grossesse multiple. L'AAP recommandait un dépistage systématique des femmes porteuses de streptocoque B, par prélèvement recto-vaginal entre la 26<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine de gestation, et un traitement prophylactique *per-partum* des femmes colonisées ayant en plus au moins un des facteurs de risque précédemment cités associés. Si le statut de colonisation n'était pas connu, l'AAP recommandait de traiter les femmes présentant un des facteurs de risque d'infection néonatale.

En 1996, le Center for Diseases Control and Prevention (CDC) publiait de nouvelles recommandations afin de coordonner les stratégies pédiatriques et obstétricales pour la prévention des infections materno-fœtales à streptocoque B (31). Ces nouvelles recommandations, approuvées par l'AAP et l'ACOG, proposent deux stratégies préventives. Quelque soit la stratégie choisie, toutes les femmes accouchant avant 37 semaines de gestation et les femmes ayant déjà eu un nouveau-né infecté par le streptocoque B, doivent recevoir un traitement antibiotique pendant le travail. Les femmes enceintes présentant une bactériurie à streptocoque B pendant leur grossesse doivent être traitées au moment du diagnostic de cette bactériurie, et doivent bénéficier d'une antibioprofylaxie *per-partum*.

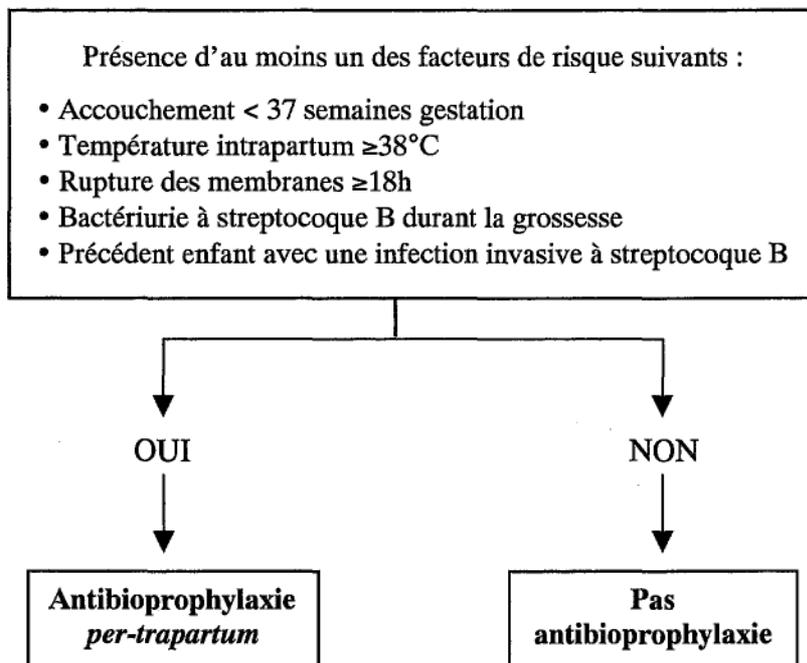
La première stratégie du CDC est basée sur un dépistage ano-vaginal réalisé chez toutes les femmes enceintes entre la 35<sup>ème</sup> et la 37<sup>ème</sup> semaines de gestation. Une antibioprophylaxie est administrée pendant le travail, chez toutes les femmes ayant un dépistage positif. Si le statut de colonisation est inconnu, une antibioprophylaxie *per-partum* doit s'imposer en présence d'un état fébrile ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) ou d'une rupture des membranes de plus de 18 heures (figure 3).



**Figure 3** : algorithme pour la prévention des infections néonatales précoces à streptocoque B. Stratégie basée sur un dépistage à 35-37 semaines de gestation (29)

L'élément clé dans cette stratégie préventive est l'identification des femmes enceintes colonisées au cours de leur grossesse, afin de sélectionner celles qui recevront une antibioprophylaxie. Comme nous l'avons vu, le statut de colonisation vaginale peut fluctuer tout au long de la grossesse. Pour cette raison, les valeurs prédictives d'un dépistage prénatal sur la colonisation au moment de l'accouchement, varient en fonction du temps écoulé entre le dépistage et l'accouchement. Trois à quatre semaines avant l'accouchement, les valeurs prédictives positive et négative du dépistage sont respectivement de 87 et 96%, alors que la valeur prédictive positive est de seulement 50% pour les dépistages réalisés six semaines ou plus avant l'accouchement (95).

La deuxième stratégie proposée par le CDC est basée sur la présence de facteurs de risque au moment de l'accouchement. Une antibioprophylaxie *per-partum* est indiquée chez toutes les femmes qui présentent au moins un des facteurs de risque suivant : rupture des membranes de plus de 18 heures ou température  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  (figure 4).



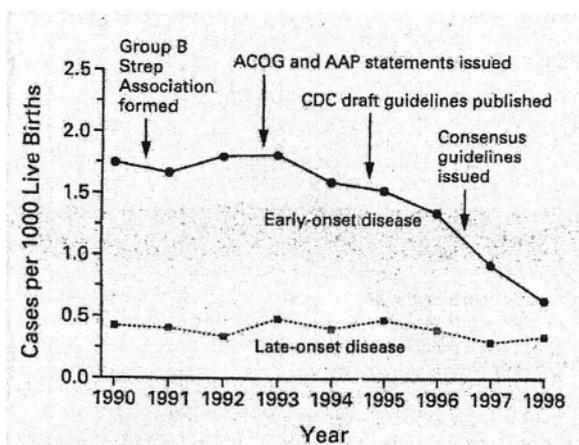
**Figure 4 :** algorithme pour la prévention des infections néonatales précoces à streptocoque B.  
Stratégie basée sur la présence de facteurs de risque (29)

L'efficacité des différentes stratégies a été évaluée par plusieurs auteurs selon trois paramètres : l'importance de la réduction du nombre de cas d'infections néonatales précoces, le pourcentage de femmes qui recevront une antibioprophylaxie et le coût total engendré par ces mesures (18, 29, 75, 76, 94).

Il ressort de ces différentes études, que la stratégie basée sur un dépistage anténatal du portage vaginal de streptocoque B à la 35-37<sup>ème</sup> semaine de gestation, est plus efficace. Bien qu'elle nécessite le traitement d'un peu plus de femmes enceintes (15 à 30% contre 16 à 18% pour la seconde stratégie), cette prévention permettrait de réduire le nombre d'infections précoces à streptocoque B d'environ 80%, contre 50 à 60% pour la stratégie basée sur la présence de facteurs de risque. Son coût est également un peu plus élevé et elle implique un suivi rigoureux entre les laboratoires et les unités de soins pour la transmission des résultats du dépistage (18).

En 1998, le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (22) puis, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé en 2001 (2), recommandaient la réalisation d'un dépistage systématique en fin de grossesse, de la colonisation vaginale maternelle par le streptocoque B, afin d'identifier les femmes qui devront recevoir une antibioprophylaxie *per-partum*.

Suite aux efforts de prévention qui ont suivi la publication des différentes recommandations, le taux d'infections néonatales précoces à streptocoque B a diminué de 65% aux Etats-Unis. Il est passé de 1,7‰ en 1993 à 0,6‰ en 1998, dans trois centres de surveillance (80).



**Figure 5 :** incidence des infections précoces et tardives à streptocoque B dans trois zones de surveillance aux Etats-Unis entre 1990 et 1998 (80)

#### 4.1.2 Traitement antibiotique recommandé

Il est souhaitable que l'antibioprophylaxie soit brève (uniquement pendant le travail), intense (dose de charge et voie intra-veineuse), et qu'elle utilise des molécules avec un spectre d'action étroit. La préférence est donnée à la pénicilline G pour son spectre plus étroit ayant un moindre risque de sélectionner des résistances. En cas d'allergie à la pénicilline, la clindamycine ou l'érythromycine peuvent être utilisées (tableau 1).

L'antibioprophylaxie ne peut être efficace si le délai est trop court entre l'injection et l'accouchement. Le CDC recommande de débiter les traitements antibiotiques au minimum 4 heures avant l'accouchement (31).

Recommandé :	<b><i>Pénicilline G</i></b> : 5 millions d'U en IV initialement puis 2,5 millions d'U en IV toutes les 4 heures jusqu'à l'accouchement
Alternative :	<b><i>Ampicilline</i></b> : 2g en IV initialement puis 1g en IV toutes les 4 heures jusqu'à l'accouchement
<u>En cas d'allergie à la pénicilline</u>	
Recommandé :	<b><i>Clindamycine</i></b> : 900mg en IV toutes les 8 heures jusqu'à l'accouchement
Alternative :	<b><i>Erythromycine</i></b> : 500mg en IV toutes les 6 heures jusqu'à l'accouchement

**Tableau 1** : traitements recommandés par le CDC dans le cadre d'une antibioprophylaxie *per-partum* (31)

La pénicilline est l'antibiotique de choix dans le traitement prophylactique des infections néonatales. Les souches de streptocoques B sont sensibles à cet antibiotique (CMI  $\leq$  0,012mg/ml), et aucune résistance n'a été décrite à ce jour (84).

En cas d'allergie à la pénicilline, un antibiogramme est justifié en raison de la résistance de certaines souches de streptocoques B aux macrolides. Une étude récente à partir de souches isolées d'hémoculture, a montré une résistance à l'érythromycine de 25% des souches isolées aux Etats-Unis et de 14% des souches isolées au Canada; 7% des souches étaient résistantes à la clindamycine dans ces deux pays (8). En revanche, aucune souche de streptocoque B isolée en Amérique du Sud était résistante à un de ces deux antibiotiques. Des études précédentes avaient reporté un taux de résistance à l'érythromycine de 7 à 21% et à la clindamycine de 3,5 à 15% (67, 77). Ces résultats supportent les recommandations du CDC qui indiquent que la clindamycine est un meilleur choix par rapport à l'érythromycine, chez les femmes allergiques à la pénicilline. Une autre alternative chez ces femmes est l'utilisation d'une céphalosporine (céfotaxime), malgré les risques d'allergie croisée (27, 2).

L'utilisation croissante des antibiotiques, liée à l'application des recommandations de prévention des infections néonatales, n'est pas sans risque.

Cette administration excessive pourrait en effet favoriser l'émergence de souches résistantes parmi les autres agents infectieux responsables d'infection materno-fœtales, notamment des entérobactéries. Deux études évaluant l'effet d'une utilisation accrue de l'ampicilline en prophylaxie *ante-partum* et *per-partum* chez des femmes enceintes vont dans ce sens (54, 88). Elles ont montré une augmentation de l'incidence de souches d'entérobactéries (notamment *Escherichia coli*) résistantes à l'ampicilline dans les infections néonatales précoces entraînant une augmentation de la mortalité des nouveau-nés.

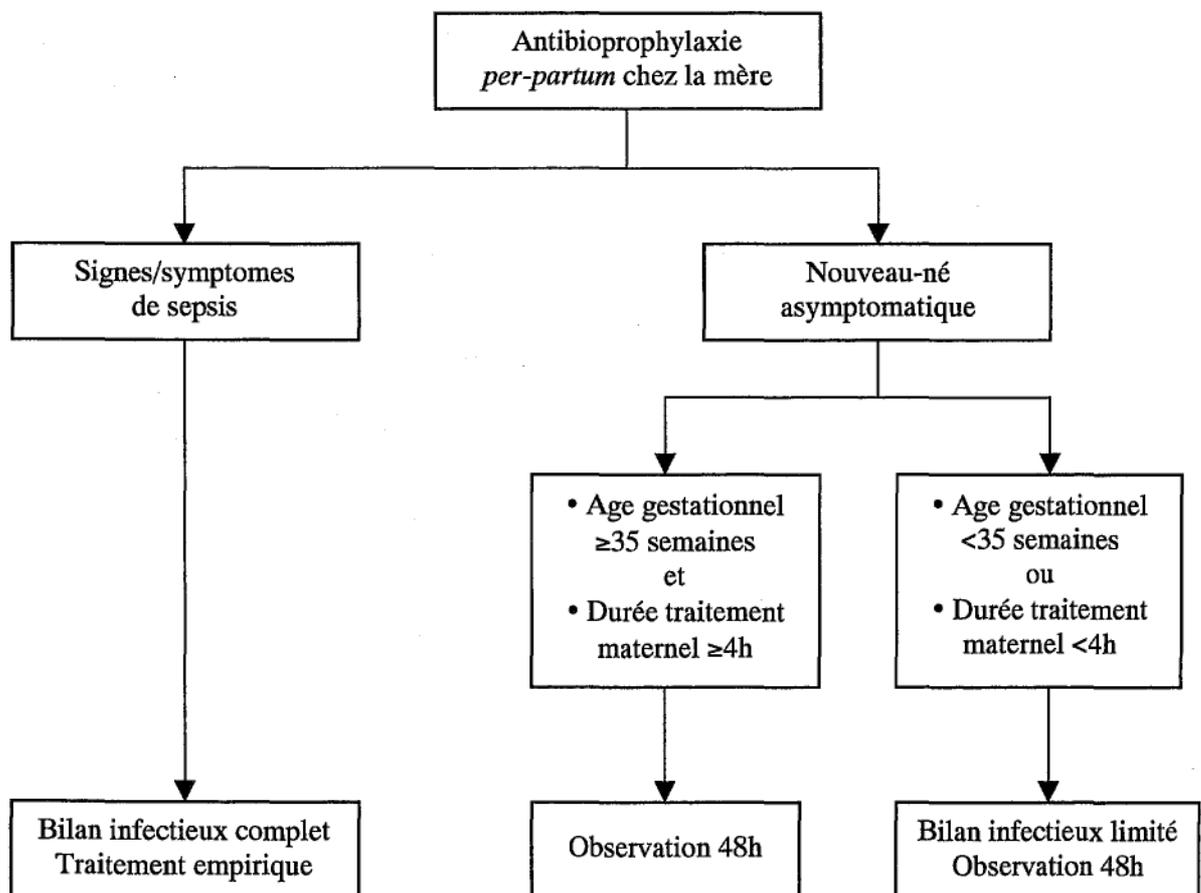
En dehors des problèmes de sélection de résistances bactériennes, les effets secondaires de ces traitements sont à prendre en compte. Les réactions allergiques à la pénicilline sont estimées entre 1 et 7% des traitements avec réaction anaphylactique dans environ 0,001% des cas (28). Notons enfin, que l'antibioprophylaxie *per-partum* n'a pas d'action préventive sur les infections néonatales tardives, et les accouchements prématurés attribuables aux streptocoques B.

#### 4.1.3 Prise en charge des nouveau-nés

En ce qui concerne la prise en charge des nourrissons nés de mères ayant reçu une antibioprophylaxie, le CDC recommande deux attitudes en fonction de la présence ou non de signes infectieux chez le nouveau-né. En présence de signes infectieux, une antibiothérapie

empirique (ampicilline plus gentamicine puis pénicilline) doit être entreprise après un bilan infectieux (formule leucocytaire, hémoculture, radiographie pulmonaire ou ponction lombaire). La gestion des nouveau-nés asymptomatiques est plus problématique. En l'absence de signes d'infection, si l'enfant est prématuré (<35 semaines) ou si l'antibioprophylaxie maternelle a été administrée depuis moins de 4 heures, les enfants doivent être observés plus étroitement pendant 48 heures, mais sans administration d'une antibiothérapie. Seul un bilan infectieux limité est recommandé (formule leucocytaire et hémoculture). En l'absence de signes d'infection et si l'antibioprophylaxie a été administrée depuis plus de 4 heures, les enfants doivent être observés attentivement pendant 48 heures mais aucun bilan infectieux ni traitement antibiotique ne sont recommandés (31).

Le principal problème chez ces nourrissons réside dans l'interprétation des résultats bactériologiques des prélèvements effectués à la naissance, notamment les hémocultures, qui peuvent être négativées par le traitement antibiotique maternel.



**Figure 6 :** algorithme pour la prise en charge des enfants nés de mères ayant reçues une antibioprophylaxie *per-partum* (29)

## 4.2 L'immunoprophylaxie

Nous avons vu qu'un faible taux d'anticorps dirigés contre les antigènes capsulaires du streptocoque B, dans le sérum maternel au moment de l'accouchement, était un facteur de risque de l'infection néonatale à streptocoque B.

L'immunoprophylaxie paraît être un moyen possible de lutte contre ces infections néonatales, par le biais du passage transplacentaire d'une plus grande quantité de ces anticorps maternels protecteurs.

L'immunoprophylaxie active, après vaccination de la femme enceinte, semble être la méthode la plus prometteuse et potentiellement la plus durable pour la prévention de ces infections néonatales.

A travers plusieurs études, des essais de vaccination avec le polysaccharide capsulaire purifié ont été réalisés. Des résultats encourageants avaient été obtenus après vaccination de femmes enceintes avec des antigènes polysaccharidiques capsulaires de type III. Une réponse anticorps avait été obtenue chez 57% des femmes vaccinées et 80% des nourrissons nés de ces femmes immunisées avaient un taux protecteur d'anticorps (14). Pour augmenter cette réponse immunitaire, l'antigène polysaccharidique a par la suite été couplé à une protéine porteuse, la toxine tétanique. D'excellents résultats ont été rapportés avec les antigènes capsulaires de type III (48) et de type Ia et Ib (17).

Cette approche possède l'avantage, par rapport à l'antibioprophylaxie *per-partum*, de ne pas avoir d'impact sur les résistances bactériennes aux antibiotiques et de posséder également une action préventive sur les infections néonatales tardives. Mais elle possède un inconvénient important. Les anticorps maternels ne traversent pas le placenta avant 32 semaines de gestation. Les grands prématurés, particulièrement sensibles aux infections invasives à streptocoque B, ne seraient donc pas protégés par cette stratégie.

Différentes préparations vaccinales à base d'antigènes capsulaires polysaccharidiques des principaux sérotypes (Ia, Ib, II, III, V), couplés à la toxine tétanique ou à une autre protéine sont en développement et en cours d'évaluation.

## **4- Diagnostic chez la femme enceinte**

### **4.1 Démarche diagnostique actuelle**

#### **4.1.1 Prélèvement**

Le Center for Diseases Control and Prevention (CDC) recommande, pour le dépistage du streptocoque B chez les femmes enceintes, d'effectuer un prélèvement vaginal et un prélèvement rectal (31). Plusieurs études ont évalué cette méthode de référence par rapport à un dépistage au niveau vaginal uniquement. Elles ont montré qu'un prélèvement vaginal détectait entre 59 et 77% des femmes colonisées, un prélèvement rectal en détectait 86 à 90% et un prélèvement combiné au niveau vaginal et rectal détectait 100% des femmes colonisées (57, 68). Un seul écouvillon pour les deux sites de prélèvements est suffisant. Cet écouvillon doit être placé dans un milieu de transport en attendant d'être ensemencé. En pratique courante, le prélèvement au niveau du rectum est très rarement réalisé et non recommandé par le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français.

#### **4.1.2 Culture**

La culture microbiologique après enrichissement est la méthode de référence recommandée pour le dépistage des femmes colonisées (31). Le prélèvement doit être ensemencé dans un bouillon sélectif, incubé 18 à 24 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, puis on doit réaliser une subculture de ce bouillon sur une gélose au sang (trypticase soja supplémentée de 5% sang mouton). La subculture est incubée 18 à 48 heures à 37°C. Le bouillon sélectif d'enrichissement est un bouillon Todd-Hewitt additionné d'antibiotiques (15µg/ml d'acide nalidixique plus 8µg/ml de gentamicine ou 15µg/ml d'acide nalidixique plus 10µg/ml de colistine). Les antibiotiques permettent d'inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif. Cette technique nécessite 36 à 72 heures pour obtenir des résultats, mais elle reste la méthode la plus sensible, particulièrement pour le dépistage des femmes faiblement colonisées (44). La culture directe sur gélose au sang sous-estimerait le taux de colonisation de près de 50% (5).

### 4.1.3 Identification après culture

Le CAMP-test n'est actuellement plus utilisé comme test d'identification car il nécessite une incubation de 24 heures à 37°C.

L'hydrolyse de l'hippurate permet une identification présomptive du streptocoque B mais elle n'est pas spécifique et nécessite également 24 heures d'incubation à 37°C (17% des entérocoques hydrolysent également l'hippurate).

Ces deux tests ne sont donc plus utilisés en laboratoire de routine pour l'identification des streptocoque B, au profit du sérogroupage par agglutination, technique rapide et simple.

#### *a) Groupage par agglutination*

L'identification des colonies suspectes est réalisée par agglutination avec des particules de latex sensibilisées, après extraction enzymatique (pronase, trypsine ou pepsine) du polyoside C. Ce groupage simple et rapide, permet de différencier les streptocoques du groupe B des autres streptocoques  $\beta$  hémolytiques rencontrés en pathologie humaine (A, C, F et G). La présence de l'antigène du groupe B est un caractère constant qui, avec l'aspect des colonies sur gélose au sang, permet la reconnaissance de l'espèce en pratique courante.

Les souches atypiques sont différenciées des autres streptocoques par leurs caractères biochimiques grâce à l'utilisation de galeries d'identification (API 20 Strep ou rapide ID 32 Strep, bioMérieux).

#### *b) Identification par sondes moléculaires*

Cette nouvelle méthode d'identification est basée sur la reconnaissance d'une séquence conservée des ARN ribosomiaux 16S par une sonde d'ADN marquée. Les hétéroduplex ARN cible-ADN marqués sont mis en évidence par une réaction de chemiluminescence.

Bourbeau et coll. ont comparé les performances d'une sonde moléculaire commercialisée (Accuprobe de GenProbe, bioMérieux) avec celles de la culture classique (25). L'identification avec la sonde est réalisée après une incubation de 18 à 24 heures du prélèvement dans un milieu d'enrichissement. Les auteurs ont trouvé une sensibilité comparable entre les deux techniques.

## 4.2 Intérêts et limites des tests rapides

Un élément clé dans les stratégies de prévention des infections néonatales à streptocoque B est l'identification des femmes colonisées, afin de sélectionner celles qui recevront une antibioprofylaxie *per-partum*. Actuellement un laboratoire de bactériologie dispose de deux techniques pour la mise en évidence du streptocoque B dans les prélèvements vaginaux : la culture et l'examen direct après coloration de Gram.

La culture avec enrichissement dans un bouillon sélectif, méthode de référence, demande 36 à 72 heures pour obtenir des résultats. La culture directe sur gélose au sang, plus utilisée par les laboratoires, demande également au moins 24 heures pour obtenir des résultats.

L'examen direct après coloration de Gram peut être réalisé très rapidement au laboratoire. Sa sensibilité est très variable (34 à 93%) suivant les études (93). La spécificité et surtout la valeur prédictive positive de cet examen sont trop faibles (61 à 72% et 13 à 33% respectivement) pour être utilisé comme technique rapide de dépistage du streptocoque B.

Une alternative à la culture et à la coloration de Gram est l'utilisation d'un test rapide de détection du streptocoque B. Celui-ci serait réalisé sur des prélèvements vaginaux effectués au début du travail. Cette mise en évidence extemporanée de la présence de streptocoque B devrait être plus efficace pour identifier les mères colonisées candidates à une antibioprofylaxie. Ce test doit répondre à plusieurs impératifs : il doit être rapide, très sensible quelque soit l'importance de la colonisation maternelle, spécifique, simple à réaliser et pouvant être effectué à tout moment de la journée et de la nuit.

Depuis une quinzaine d'années de nombreux tests ont été développés et commercialisés pour répondre à cette attente. La détection des antigènes polysaccharidiques du streptocoque B, après extraction enzymatique ou chimique, est l'approche qui a été la plus développée. Les premiers utilisaient des techniques d'agglutination avec des particules de latex sensibilisées, les derniers sont basés sur des techniques immuno-enzymatiques.

### 4.2.1 Tests d'agglutination

Trois tests d'agglutination ont été commercialisés : le Bactigen<sup>®</sup> test (Wampole Laboratoires), le latex Streptex<sup>®</sup> (bioMérieux) et le Directigen<sup>®</sup> Group B Strep test (Becton Dickinson). Les performances de ces tests obtenues dans les différentes études d'évaluation réalisées, sont représentées dans le tableau 2.

Leur sensibilité globale est comprise entre 15 et 88% et leur spécificité entre 93 et 100%. Cette faible sensibilité a été confirmée par une étude *in vitro* à partir de dilutions de culture de streptocoque B. Le seuil de sensibilité trouvé était de  $10^8$  CFU/ml (1).

Référence	Sensibilité globale/forte colonisation		Spécificité	Nombre de femmes	Pourcentage culture pos.	Milieu de culture
<i>BACTIGEN<sup>®</sup> test</i>						
Isada (47)	58%	/	93%	431	4,4%	GS
Lotz-Nolan (56)	62%	95%	99%	344	11%	GS
Greenspoon (42)	33%	100%	95%	250	2,4%	GS
Green (41)	20%	57%	99%	4251	5,3%	GS
<i>DIRECTIGEN<sup>®</sup> test</i>						
Green (41)	24%	62%	99%	4251	5,3%	GS
Brady (26)	88%	/	100%	500	5%	GS
Clark (32)	30%	76%	93%	314	29%	TH
<i>Latex STREPTEX<sup>®</sup></i>						
Skoll (82)	15%	29%	99%	1062	9,9%	GS
Kontnick (50)	19%	63%	100%	434	14,7%	TH

**Tableau 2** : comparaison des performances des tests de dépistage du streptocoque B par agglutination. La dernière colonne correspond à la culture utilisée comme méthode de référence (GS = gélose au sang ; TH = bouillon Todd-Hewitt).

La plupart des études d'évaluation de ces latex montrent une augmentation assez importante de leur sensibilité pour la détection des fortes colonisations vaginales (tableau 2). En revanche en ce qui concerne la détection des femmes faiblement colonisées les résultats sont beaucoup plus alarmants avec une sensibilité de seulement 3 à 15% (41).

En conclusion, ces tests ont l'avantage d'être rapide (20min à 1h) et de réalisation très facile, mais aucun des kits testés n'est un indicateur sensible de la colonisation vaginale par le streptocoque B.

#### 4.2.2 Tests immuno-enzymatiques

A l'heure actuelle, la plupart des auteurs se penchent sur l'intérêt des tests permettant la détection des antigènes polysaccharidiques du streptocoque B par techniques immuno-enzymatiques.

Les trois premiers tests commercialisés sont le Equate<sup>®</sup> Strep B test (Binax), le Quidel<sup>®</sup> Group B Strep test (Quidel) et plus récemment le ICON<sup>®</sup> Strep B test (Biotrol).

Les performances de ces trois tests figurent dans le tableau 3. Ils présentent une assez faible sensibilité (11 à 70%), une bonne spécificité (92 à 100%) et une mauvaise valeur prédictive positive (29 à 63%). Pour le Equate<sup>®</sup> Strep B test des réactions croisées ont été décrites avec d'autres espèces de streptocoques, essentiellement *Enterococcus faecalis* (43).

Lorsque le ICON<sup>®</sup> Strep B test est réalisé après six heures de conservation de l'écouvillon dans un milieu de transport, sa sensibilité diminue d'un facteur 5 à 10 par rapport à une réalisation immédiate après le prélèvement (92).

Comme pour les techniques d'agglutination, ces tests montrent une augmentation assez importante de leur sensibilité pour la détection des fortes colonisations vaginales (tableau 3). Par rapport aux latex, ces tests sont plus rapides (10 à 20 minutes) et la lecture et l'interprétation des résultats sont plus faciles. Bien que ces tests immuno-enzymatiques semblent avoir une sensibilité *in vitro* un peu plus grande que les latex, (seuil de sensibilité à  $10^7$  CFU/ml contre  $10^8$  CFU/ml pour les latex), leur sensibilité *in vivo* est trop faible pour recommander leur utilisation en routine (1).

Ces trois tests immuno-enzymatiques n'apportent donc aucune amélioration en terme de sensibilité par rapport aux tests d'agglutination précédents.

Les variations observées selon les études, en ce qui concerne les performances des différents tests ont plusieurs origines : la méthode de référence utilisée (culture avec enrichissement ou culture classique), la différence des populations étudiées (présence de facteurs de risques, origine ethnique, niveaux de colonisation) et enfin le délai de traitement des écouvillons après le prélèvement.

Référence	Sensibilité globale/forte colonisation		Spécificité	Nombre de femmes	Pourcentage culture pos.	Milieu de culture
<i>EQUATE<sup>®</sup> test</i>						
Hagay (43)	24%	/	95%	660	7,6%	GS
Towers (87)	60%	80%	92%	131	15%	GS
Skoll (82)	22%	37%	99%	1062	9,9%	GS
Greenspoon (42)	33%	50%	99%	250	2,4%	GS
<i>QUIDEL<sup>®</sup> test</i>						
Granato (40)	74%	89%	99%	331	5,7%	GS
Baker (15)	12%	36%	98,8%	502	25	TH
Wust (92)	24%	100%	100%	189	9%	GS
<i>ICON<sup>®</sup> test</i>						
Gentry (38)	33%	100%	95%	300	10%	GS
Wust (92)	11%	100%	100%	180	10%	GS
Donders (35)	70%	/	99,5%	254	10,6%	GS
Armer (11)	11%	100%	100%	182	23%	TH
Baker (15)	15%	46%	99,8%	502	25%	TH

**Tableau 3** : comparaison des performances des tests de dépistage du streptocoque B par technique immuno-enzymatique. La dernière colonne correspond à la culture utilisée comme méthode de référence (GS = gélose au sang ; TH = bouillon Todd-Hewitt).

Le dernier test rapide de détection d'antigène du streptocoque B commercialisé est le STREP B OIA<sup>®</sup> test (Biomedical Diagnostics). Il s'agit d'un test immuno-optique, validé sur les prélèvements vaginaux uniquement. Bien qu'il soit de réalisation et d'interprétation

relativement simple, les manipulations et les incubations doivent être correctement chronométrées et ce test doit être réalisé par un personnel de laboratoire (12). Les résultats sont obtenus en 30 minutes.

Les performances du STREP B OIA<sup>®</sup> test données par le fabricant sont respectivement de 85,4% pour la sensibilité et de 91,5% pour la spécificité. Sept études ont évalué ce test et les résultats sont relativement discordants (tableau 4). La sensibilité observée varie de 53 à 94% par rapport à une culture standard et de 37 à 72% par rapport à une culture avec enrichissement dans un bouillon sélectif. Chez les femmes fortement colonisées cette sensibilité atteint 90 à 100%. La spécificité est un peu moins bonne que les tests immuno-enzymatiques précédents (85,7 à 99%).

Référence	Sensibilité globale/forte colonisation		Spécificité	Nombre de femmes	Pourcentage culture pos.	Milieu de culture
Park (66)	72%	100%	95,6%	531	19%	TH
Nguyen (65)	47%	90%	96%	524	17%	TH
Song (83)	58,6%	/	85,7%	141	21%	TH
Carroll (30)	62,4% 82,5%	/	92,2% 91,8%	962	22%	TH GS
Auvray (12)	94,1%	/	98,9%	113	15%	GC
Baker (15)	37% 53%	100% 100%	98,3% 98,4%	502	25% 17%	TH GS
Samadi (78)	63,6%	/	86,3%	301	14%	GS

**Tableau 4** : comparaison des différentes études d'évaluation du STREP B OIA<sup>®</sup> test.

La dernière colonne correspond à la culture utilisée comme méthode de référence  
(GS = gélose au sang ; GC = gélose Columbia ; TH = bouillon Todd-Hewitt).

Deux des études ont comparé la sensibilité de ce test à celle de la culture standard par rapport à la culture de référence après enrichissement (30, 66). Les deux ont trouvé une sensibilité à

peu près équivalente entre les deux techniques (72% et 62,4% pour le STREP B OIA<sup>®</sup> test et 68% et 64,4% pour la culture sur gélose au sang). En revanche sa spécificité est plus faible que la culture (92 et 96% contre 100% pour la culture). Ce test semble donc avoir une sensibilité comparable à la culture standard avec l'avantage de pouvoir donner des résultats en 30 minutes au lieu de 24 heures pour la culture.

Des techniques actuellement disponibles, le STREP B OIA<sup>®</sup> test est la plus performante. Mais l'utilisation de ce test pour un dépistage systématique des femmes à leur accouchement est discuté. Pour certains auteurs ses performances sont suffisantes pour une application clinique de routine (18). Ce test identifierait plus de 75% des enfants à risque d'infection néonatale (18). En revanche, pour d'autres, bien que ce test soit plus sensible que les autres techniques immuno-enzymatiques, il ne peut être utilisé en remplacement de la culture pour la détection de la colonisation vaginale par le streptocoque B des femmes enceintes au moment de l'accouchement (15).

Le tableau 5 récapitule les performances des différentes techniques rapides de détection des streptocoques B.

Techniques	Sensibilité globale	Spécificité	Sensibilité si forte colonisation
<b>Tests Latex</b>	15 à 88%	93 à 100%	29 à 100%
<b>Equate<sup>®</sup></b>	22 à 60%	92 à 99%	37 à 80%
<b>Quidel<sup>®</sup></b>	12 à 74%	99 à 100%	82 à 89%
<b>ICON<sup>®</sup></b>	11 à 70%	95 à 100%	100%
<b>Strep B OIA<sup>®</sup></b>	37 à 94%	86 à 99%	90 à 100%

**Tableau 5** : performances des différentes techniques rapides de dépistage du streptocoque B

Bien que le risque d'infection néonatale est plus grand en présence d'une forte colonisation maternelle, la possibilité d'infection chez des enfants nés de mères faiblement colonisées ne doit pas être ignorée. Dans l'étude de Towers et coll., deux prématurés nés de mères faiblement colonisées non dépistées au moment de l'accouchement par un des tests immuno-

enzymatique, sont décédés d'une infection invasive à streptocoque B (87). D'autres études ont rapporté des cas de sepsis dus au streptocoque B chez des enfants nés de mères faiblement colonisées à l'accouchement (32, 64).

En 1997 la FDA (The Food and Drug Administration) a publié un article afin d'alerter les cliniciens sur les risques d'erreur de diagnostic avec l'utilisation en routine des kits permettant la détection rapide des antigènes du streptocoque B (9). Cet article avait pour but d'alerter les cliniciens sur les limites de ces tests mais également de donner des directives concernant leur utilisation. Pour la FDA ces tests doivent être considérés comme un outil diagnostique supplémentaire ne pouvant se substituer à la culture. Tout test négatif doit donc toujours être confirmé par la culture sur milieu d'enrichissement et ne doit jamais exclure une possible colonisation maternelle.

#### **4.2.3 Apport de la biologie moléculaire**

La dernière approche développée est la biologie moléculaire. La technique mise au point par Bergeron et coll. (21) est la première PCR permettant la détection du streptocoque B dans des prélèvements vaginaux et rectaux. L'étude réalisée sur 112 femmes enceintes a montré une sensibilité de 97% et une spécificité de 100% par rapport à la culture avec enrichissement. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec toutes les autres techniques de détection rapide. De plus, cette méthode ne semble pas influencée par la rupture des membranes, ce qui est important dans la mesure où cette rupture peut survenir avant que le test de dépistage n'ait pu être réalisé.

Cette technique de PCR développée est une PCR en temps réel qui donne des résultats en moins d'une heure.

# OBJECTIFS

# OBJECTIFS

Actuellement, la technique de référence pour la détection des streptocoques B dans les prélèvements vaginaux, est la culture avec enrichissement dans un bouillon sélectif. Cette méthode, très sensible et spécifique, nécessite néanmoins 36 à 72 heures pour obtenir des résultats. La culture classique sur gélose au sang, bien que moins sensible que la précédente, est plus utilisée par les laboratoires de bactériologie. Elle nécessite également au moins 24 heures pour obtenir des résultats.

L'émergence des techniques de biologie moléculaire dans le domaine médical est l'un des faits les plus marquants de ces vingt dernières années. Un des grands domaines d'application de ces techniques est l'infectiologie. Ces outils sont devenus des instruments de routine dans de nombreux laboratoires. Parmi ces techniques, celle qui est la plus utilisée en biologie clinique est la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettant la détection et la quantification des acides nucléiques après amplification.

La PCR en temps réel est un nouvel outil de diagnostic moléculaire, aux applications multiples. Cette technique peut notamment permettre la détection rapide de microorganismes.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré l'intérêt d'un dépistage du portage vaginal du streptocoque B chez les femmes enceintes, afin d'identifier les candidates à une antibioprofylaxie *per-partum*, dans le but de prévenir les infections néonatales.

Notre travail se propose de développer et d'évaluer la détection rapide du streptocoque B par PCR en temps réel sur LightCycler, dans le but d'appliquer cette technique au dépistage des femmes au moment de l'accouchement.

**MATERIEL**  
**ET METHODES**

## **1- Souche bactérienne et prélèvements**

### **1.1 Souche bactérienne**

Tout le travail de mise au point de la technique de biologie moléculaire a été réalisé sur une souche de streptocoque B de référence : souche ATCC 12400 (sérotypage Ia).

Après réhydratation du lyophilisat dans 0,2ml de bouillon nutritif, la souche a été mise en culture en aérobiose à 37°C sur une gélose trypticase-soja additionnée de 5% de sang de mouton, puis repiquée sur une deuxième gélose au sang après 18 heures d'incubation.

### **1.2 Prélèvements vaginaux**

Dans un deuxième temps nous avons appliqué la PCR mise au point sur des prélèvements vaginaux (PV).

Ces prélèvements provenaient de femmes enceintes à risque, hospitalisées dans les services de Gynécologie Obstétrique du CHU de Grenoble. Sur ces prélèvements vaginaux nous avons réalisé en parallèle une culture standard et une détection par PCR, à partir de deux écouvillons différents.

#### **1.2.1 Technique de référence**

Nous avons utilisé comme technique de référence, une culture sur gélose trypticase-soja additionnée de 5% de sang de mouton, incubée en aérobiose pendant 24 à 48 heures à 37°C.

Sur les colonies évoquant un streptocoque B, particulièrement les colonies bêta-hémolytiques, une catalase et une coloration de Gram ont été réalisées. Les cocci Gram positif catalase négative ont été identifiés par agglutination avec des particules de latex sensibilisées (latex Streptex® de Murex Biotech). Tous les prélèvements vaginaux arrivés au laboratoire de Bactériologie ont été ensemencés le jour même, excepté ceux réceptionnés au laboratoire central de garde, qui ont été ensemencés le lendemain.

#### **1.2.2 Préparation des prélèvements pour la PCR**

Les prélèvements vaginaux ont été placés 30 minutes à température ambiante dans un tube eppendorf contenant 1 ml de PBS, puis vortexés 30 secondes afin de décharger au maximum

l'écouvillon dans le PBS. Le prélèvement a ensuite été centrifugé 10 minutes à 5000g et l'extraction de l'ADN effectuée sur le culot de centrifugation. Pour des raisons d'organisation tous les PV n'ont pas été extraits le jour même de leur réception au laboratoire de Bactériologie. Ceux qui ne pouvaient être extraits ont été déchargés dans 1ml de PBS puis stockés à -80°C. Le délai de cette conservation n'a pas excédé 6 jours.

## **2- Détection du streptocoque B par PCR en temps réel**

### **2.1 Extraction de l'ADN**

#### **2.1.1 Principe**

Après avoir testé différents kits d'extraction nous avons choisi le QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen), en suivant le protocole technique fourni par le fabricant pour l'extraction de bactéries à Gram positif. La paroi des bactéries à Gram positif étant particulièrement résistante, une étape supplémentaire de lyse est indispensable avant de réaliser la purification d'ADN.

Les ADN sont purifiés sur une membrane de silice à l'intérieur de mini colonnes de centrifugation.

#### **2.1.2 Protocole**

##### ***a) Souche de référence***

Les colonies de streptocoque B obtenues après 18 heures de culture sont mises en suspension dans 180µl d'un premier tampon de lyse (20mg/ml lysozyme; 20mM Tris-HCl pH 8.0; 2mM EDTA; 1,2% Triton X100) et incubées 30 minutes à 37°C. Une seconde étape de lyse est réalisée avec 200µl d'un deuxième tampon (tampon AL du kit DNA Mini Kit) et de 20µl de protéinase K (20mg/ml), suivi d'une incubation à 56°C pendant 30 minutes. Le lysat obtenu est déposé sur une mini colonne, l'ADN se fixe sur la membrane de silice lors d'une étape de centrifugation. Après deux étapes de lavage, l'ADN est élué par 100µl de tampon d'éluion puis dosé au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260nm. L'ADN extrait est stocké à -20°C.

### ***b) Prélèvements vaginaux***

Après déchargement de l'écouvillon dans 1ml de PBS, le prélèvement est centrifugé dix minutes à 5000g. Le surnageant est éliminé et le culot de centrifugation est repris par 180µl du premier tampon de lyse. L'extraction est ensuite la même que pour la souche de référence.

## **2.2 PCR en temps réel sur LightCycler**

### **2.2.1 Principe**

La détection du streptocoque B par biologie moléculaire a été réalisée par une technique de PCR en temps réel sur LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Ce système est basé sur un thermocycleur à air pulsé couplé à un micro-spectrofluorimètre (90, 91). Il permet non seulement de réaliser des PCR et des transcriptions inverses (RT-PCR) quantitatives, mais également des courbes de fusion afin de caractériser les produits de PCR.

Cet appareil permet l'acquisition en temps réel du signal avec affichage des données en ligne, ce qui permet de suivre en direct la réaction d'amplification. Le pilotage de l'appareil, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés par une station de travail PC qui fonctionne en multi-tâches dans un environnement Windows NT.

### **2.2.2 Fonctionnement**

Le LightCycler est composé de deux parties (figure 7).

#### ***a) Un thermocycleur à air pulsé***

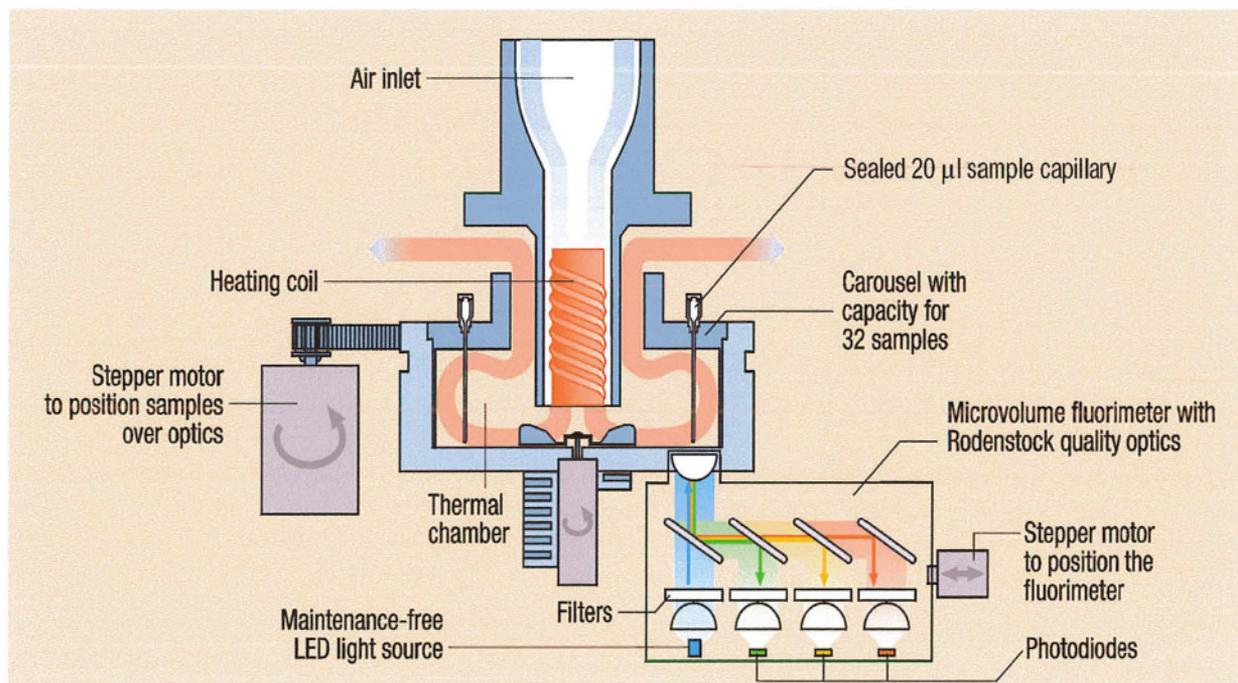
L'air ambiant est aspiré par un système de ventilation, propulsé sur une résistance dont les caractéristiques permettent des variations thermiques extrêmement rapides (jusqu'à 20°C par seconde). L'air atteint ensuite la chambre de mesure où se trouve le carrousel contenant les échantillons à l'intérieur de capillaires en verre (35mm de longueur et 1,55mm de diamètre), et provoque la montée en température ou le refroidissement de ces capillaires. La température à l'intérieur du thermocycleur est contrôlée par un système de mesure intégré. La réaction de PCR est réalisée très rapidement (45 cycles en 30 minutes en moyenne) grâce à l'utilisation combinée des capillaires comme supports d'échantillons et d'une circulation d'air pulsé pour les montées en température. Ainsi, le faible volume réactionnel à l'intérieur du capillaire

(20 $\mu$ l en moyenne), dont la paroi représente une grande surface d'échanges thermiques, est presque instantanément à la même température que l'intérieur de la chambre de mesure. Le carrousel pouvant contenir 32 capillaires, est piloté par un moteur pas à pas ultra-rapide. Ce moteur permet une rotation précise du carrousel (précision au  $\mu$ m) afin de placer chaque échantillon au dessus de la zone de mesure du micro-spectrofluorimètre (durée de la mesure 20 msec).

### b) Un micro-spectrofluorimètre

La partie fluorimètre est composée d'une source d'excitation formée par une diode froide appelée LED (light-emitting diode) et d'une partie détection. La LED, émettant avec un maximum à 470 nm, excite la molécule fluorescente contenue dans l'échantillon.

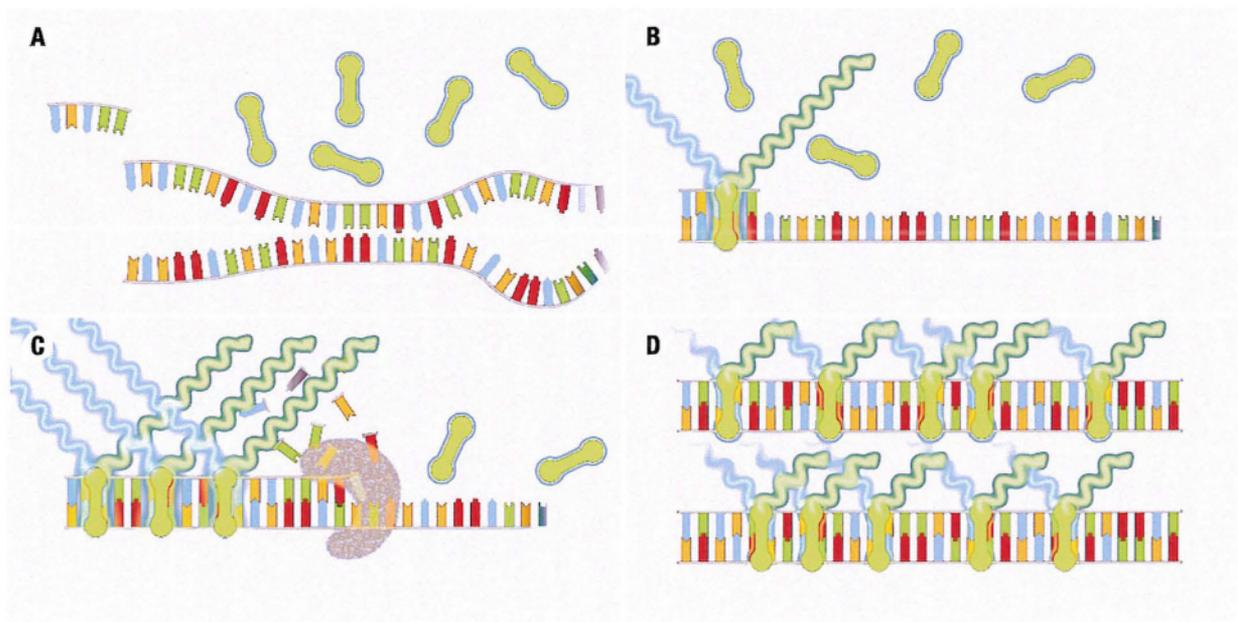
Les photons de fluorescence émis sont focalisés par la paroi à la pointe du capillaire en un point très lumineux, juste au dessus de la zone de mesure. Par l'utilisation d'un jeu de miroirs semi-transparents passe-bandes, le signal est dévié selon trois longueurs d'onde sur des photodiodes à 530nm, 640nm et 700nm. La fluorescence émise est mesurée selon sa longueur d'onde dans trois canaux, F1 (530nm), F2 (640nm) et F3 (700nm).



**Figure 7:** schéma de principe du LightCycler

Parmi les trois formats de fluorescence utilisables sur le LightCycler pour suivre la réaction d'amplification (SYBR Green I, sondes d'hybridation et sondes d'hydrolyse) nous avons choisi le SYBR Green I.

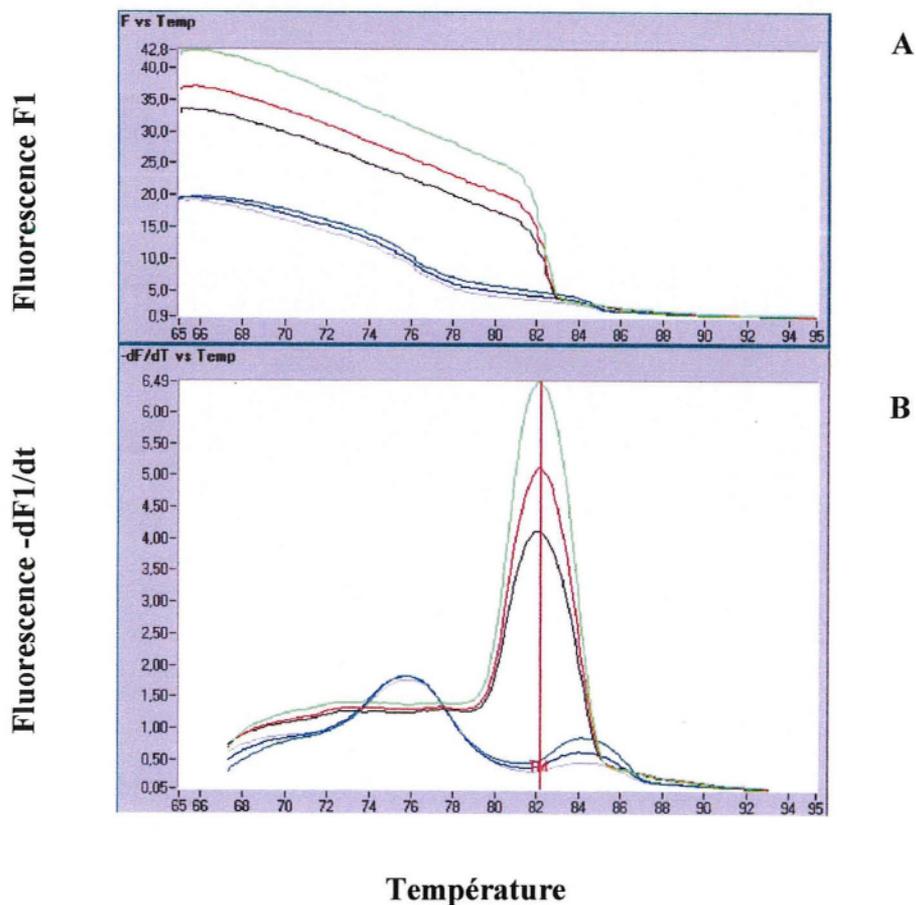
Le SYBR Green I est un agent intercalant qui se lie préférentiellement et de façon transitoire à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Dès que l'ADN est synthétisé par la Taq polymérase, pendant l'étape d'élongation, le SYBR Green I s'intercale dans la petite hélice de l'ADN en émettant de la fluorescence à 530 nm. La lecture de cette fluorescence est effectuée dans le canal F1. Le SYBR Green I émet une fluorescence qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons. Lorsque l'ADN est déshybridé, pendant l'étape de dénaturation, la molécule se retrouve à l'état libre dans le milieu réactionnel et n'émet plus de fluorescence. On peut ainsi visualiser la formation des produits de PCR à chaque cycle d'amplification. Cette molécule donne une très bonne sensibilité, mais n'est pas spécifique et s'intercale dans tous les ADN double brin amplifiés (amplification non spécifique, dimères d'amorce).



**Figure 8** : principe du SYBR Green I

- A : libération des molécules de SYBR Green I pendant la déshybridation de l'ADN  
→ pas d'émission de fluorescence
- B : hybridation des amorces
- C et D : insertion des molécules de SYBR Green I pendant la phase d'élongation  
→ émission de fluorescence

Le SYBR Green I ne permettant pas un marquage séquence spécifique, la caractérisation du produit amplifié à la fin de la réaction d'amplification, se fait par l'étude de sa courbe de fusion (figure 9). Chaque produit de PCR est caractérisé par son point de fusion appelé  $T_m$ , correspondant à la température où 50% de l'ADN est dénaturé sous forme simple brin. Le  $T_m$  est principalement fonction de la composition en bases du fragment (pourcentage de CG) et de sa longueur. La courbe de fusion est obtenue, après la PCR en augmentant la température très lentement ( $0,1^\circ\text{C}$  par seconde) tout en mesurant en continu la fluorescence. On observe tout d'abord une décroissance progressive de la fluorescence émise par le SYBR Green I suivie d'une chute rapide lorsqu'on atteint la température de fusion du double brin d'ADN. En dérivant ce signal de fluorescence ( $-dF/dt$ ), on obtient un pic de fusion permettant de déterminer précisément le  $T_m$  du produit amplifié. On peut ainsi discriminer plusieurs produits de PCR, à condition qu'ils aient un  $T_m$  différent d'au moins  $1^\circ\text{C}$  (74). Par cette technique il est également possible de mettre en évidence des produits d'amplification non spécifiques et des dimères d'amorces.



**Figure 9** : courbes de fusion (A) et pics de fusion (B) obtenus avec différentes concentrations d'un ADN cible marqué par du SYBR Green I

## 2.3 Amplification de l'ADN du streptocoque B

### 2.3.1 Choix des amorces

Les amorces utilisées ont été définies dans une région hautement conservée du gène *cfb* (49). Ce gène code pour une protéine caractéristique des streptocoques B, le CAMP-factor.

Séquence des amorces streptocoque B		
Amorce sens Sag 59 :	5'-TTT CAC CAG CTG TAT TAG AAG TA-3'	Tm=46°C
Amorce anti-sens Sag 190 :	5'-GTT CCC TGA ACA TTA TCT TTG AT-3'	Tm=49°C
→ fragment de 153 paires de bases		

### 2.3.2 Conditions PCR

Nous avons utilisé le kit Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals). Le mélange réactionnel contient un anticorps anti-Taq polymérase qui va bloquer l'enzyme pendant l'étape pré-PCR, ce qui diminue la formation de produits non spécifiques. Cet anticorps est dénaturé lors du chauffage initial à 94°C pendant 10 minutes. La réaction de PCR est réalisée dans un volume réactionnel final de 20µl. L'analyse des résultats a été réalisée avec la version 5.32 du logiciel LightCycler.

La composition du mélange réactionnel et les étapes de la réaction de PCR sont définies dans les tableaux 6 et 7.

Cocktail PCR		
Amorces	1 µl	(0,5µM)
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl	(3mM)
Mix	2 µl	
H <sub>2</sub> O	qsp	10 µl
Echantillon d'ADN	10 µl	

Tableau 6 : composition du mélange

Réaction de PCR	
Dénaturation initiale	10 min - 94°C
Amplification 45 cycles	
- dénaturation	10 sec - 94°C
- annealing	5 sec - 60°C
- élongation	7 sec - 72°C
Courbe de fusion	
	0 sec - 94°C
	10 sec - 65°C
	0 sec - 94°C

Tableau 7 : étapes de la réaction de PCR

# RESULTATS

# 1- Mise au point de la PCR en temps réel sur LightCycler

## 1.1 Optimisation de l'extraction d'ADN

Nous avons testé trois techniques d'extraction d'ADN, adaptées notamment à la purification d'ADN de bactéries Gram positif (62). Le kit Qiagen, utilisé dès le début de l'expérimentation, a l'inconvénient de comporter une étape de lyse assez longue (1h15) ce qui allonge la durée totale de l'analyse. Nous avons choisi de tester deux autres techniques : un kit commercialisé, le High pure PCR Template® (Roche Molecular Biochemicals) et une lyse par sonication. L'extraction avec le kit Roche dure environ 45 minutes incluant une étape de lyse de 25 minutes dans un tampon contenant du lysozyme (10 mg/ml) et de la protéinase K suivie d'une étape de purification de l'ADN. La sonication permet la lyse de la bactérie et entraîne la libération des acides nucléiques sous l'action d'ultrasons. Cette technique de lyse est très rapide (15 minutes).

Ces trois techniques ont été appliquées sur 200µl d'une suspension de streptocoque B à 7 MacFarland dans du PBS. Pour les deux kits commercialisés, l'ADN a été élué par 200µl de tampon afin d'avoir le même volume final pour les trois techniques. Puis, les trois extraits ont été dosés au spectrophotomètre. Les résultats, présentés dans le tableau 8, montrent une nette supériorité de la sonication par rapport aux deux autres techniques en terme de rendement (quantité d'ADN extrait). En revanche en terme de purification, représentée par le rapport de la densité optique à 260nm sur la densité optique à 280nm, le kit Qiagen est supérieur aux deux autres techniques.

Techniques	Concentration ADN en ng/µl	Valeur du ratio DO <sub>260</sub> /DO <sub>280</sub>	Durée totale de l'extraction
<b>Kit Qiagen</b>	30	2.00	2 h
<b>Kit Roche</b>	75	1.45	40 mn
<b>Sonication</b>	480	1.55	15 mn

**Tableau 8** : comparaison des trois techniques d'extraction d'ADN testées selon trois critères (quantité d'ADN extrait, pureté de l'ADN extrait et durée de la technique)

Les trois extraits ont ensuite été amplifiés à deux concentrations différentes (5pg et 500fg). Tous les extraits à 5pg sont positifs avec des pics de fusion d'intensité beaucoup plus faible pour la technique Roche et la sonication. Par contre, seul l'extrait Qiagen à 500fg est positif. Bien que plus long par rapport aux deux autres techniques, le kit Qiagen est donc plus efficace pour l'extraction et la purification de l'ADN des streptocoques B.

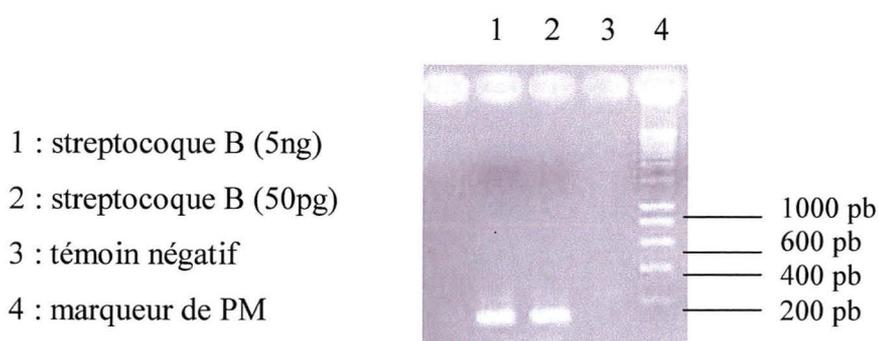
## 1.2 Optimisation des conditions PCR

### 1.2.1 Test des amorces

Dans un premier temps, nous avons testé les amorces spécifiques du streptocoque B à la température d'hybridation de 55°C, et la révélation des produits PCR a été réalisée par un marquage avec du SYBR Green I. Nous nous sommes mis dans des conditions de PCR classiques pour les concentrations en amorces (0,5µM) et en chlorure de magnésium (3mM). Ces premiers essais ont été réalisés sur trois concentrations en ADN (50ng, 50pg et 50fg), avec à chaque amplification un témoin négatif contenant 10µl d'eau à la place des 10µl d'ADN.

L'analyse de la courbe de fusion, montre des pics d'intensité plus ou moins importante en fonction des trois concentrations en ADN, avec pour tous un  $T_m$  d'environ 80,5°C. Le témoin négatif n'a montré aucune amplification non spécifique.

Nous avons alors vérifié que le pic de fusion obtenu correspondait bien au produit amplifié de notre ADN cible. Pour cela nous avons contrôlé la taille de ce fragment amplifié, après électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation sous UV en présence d'un intercalant (bromure d'éthidium), par comparaison à un marqueur de poids moléculaire (PM) migrant en parallèle. Nous avons obtenu une seule bande dont la taille correspondait bien à celle attendue, environ 150 paires de bases (figure 10).



**Figure 10** : électrophorèse du fragment d'ADN amplifié sur gel d'agarose

### 1.2.2 Concentration en chlorure de magnésium et température d'hybridation

Dans un deuxième temps, nous avons fait varier la concentration en chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) et la température d'hybridation des amorces afin d'optimiser le rendement de la PCR. Trois concentrations en ADN (50ng, 50pg et 50fg) ont été testées dans les différentes conditions opératoires. Le témoin eau est resté négatif dans toutes les conditions d'amplification testées.

Nous avons effectué une gamme de concentration en  $MgCl_2$ , de 2mM à 5mM, à 55°C et 60°C de température d'hybridation. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11.

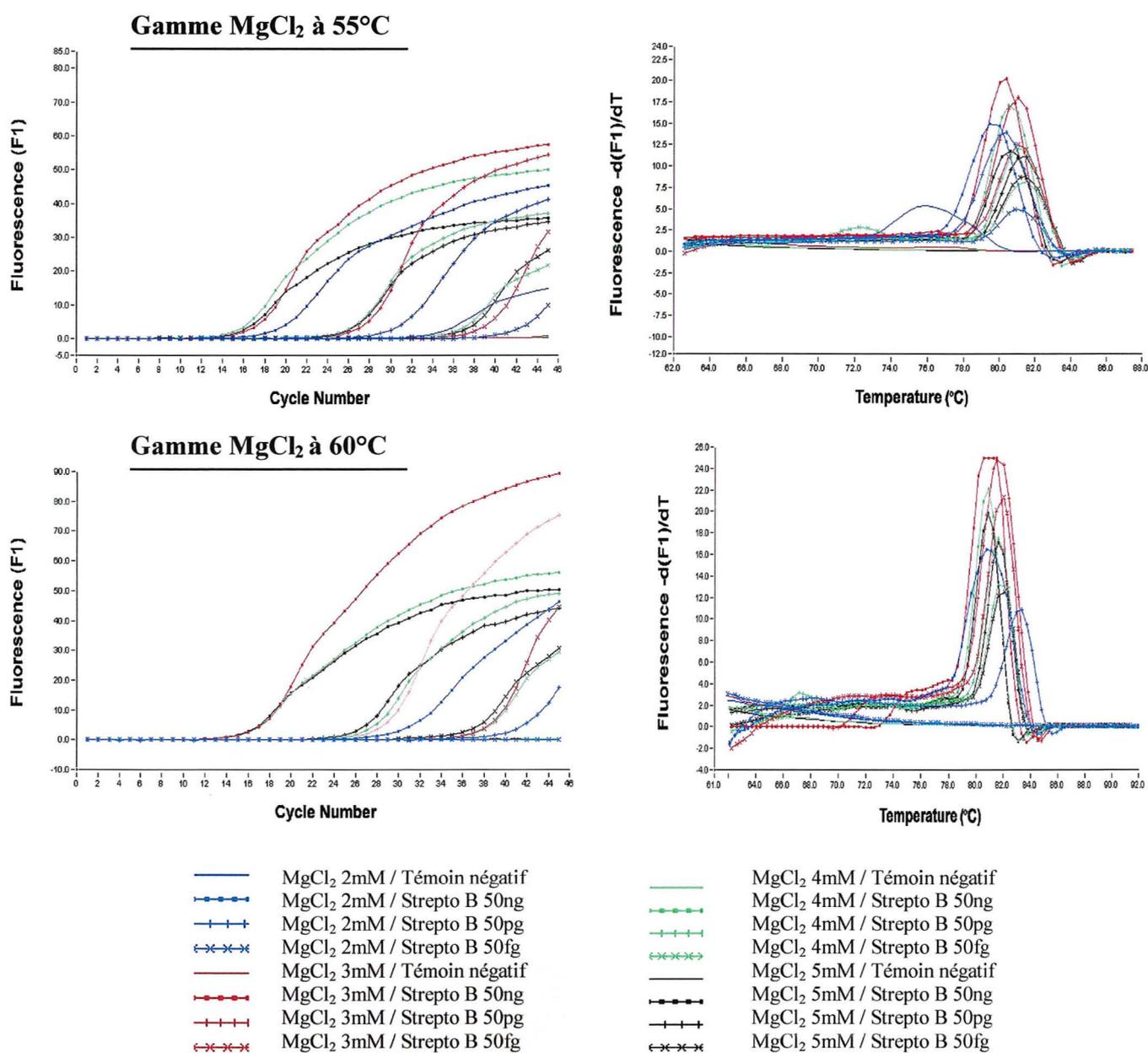


Figure 11 : courbes d'amplification (à gauche) et de fusion (à droite) de trois concentrations d'ADN de streptocoque B (50ng, 50pg, 50fg) selon différentes concentrations de  $MgCl_2$  (2mM, 3mM, 4mM, 5mM) et à deux températures d'hybridation 55°C (en haut) et 60°C (en bas)

Ces différentes expériences montrent que les conditions optimales sont obtenues avec une concentration en chlorure de magnésium de 3mM et une température d'hybridation des amorces de 60°C. En effet les courbes d'amplification, de part leur pente montrent une efficacité de la réaction de PCR supérieure dans ces conditions expérimentales. De plus, l'intensité des pics de fusion, pour une même concentration en ADN, est également plus importante.

### **1.3 Etude de la sensibilité**

Afin de déterminer la limite de détection de la technique nous avons réalisé une gamme de concentration en ADN de 5ng à 5fg. Pour cela nous avons effectué des dilutions de série 10 d'ADN extrait, dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Les réactions d'amplification des dilutions ont été faites dans les conditions optimales définies précédemment (figure 12).

L'amplification d'une cible d'ADN est caractérisée par son  $C_T$  (cycle seuil d'émission de fluorescence), c'est à dire le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence émise passe au dessus du seuil correspondant au bruit de fond. En théorie, si le rendement de la PCR est de 100%, un log de différence de concentration en ADN est représenté par un écart de 3,3 cycles. Sur la figure 12 représentant les courbes d'amplification de la gamme, on remarque qu'il existe bien un écart régulier de 3 à 4 cycles entre les  $C_T$  des différentes dilutions d'ADN. Ceci permet de vérifier la bonne exécution des dilutions d'ADN et donc de valider la limite de détection trouvée.

L'analyse des courbes de fusion montre un dernier pic visible pour la dilution à 50fg d'ADN. Ces résultats ont été reproduits dans cinq expériences différentes.

Le seuil de sensibilité de cette PCR sur LightCycler, pour la détection du streptocoque B est donc de 50fg d'ADN cible, ce qui correspond environ à 25 copies de génome bactérien.

Afin de se mettre dans des conditions expérimentales voisines de celles que l'on retrouvera lors de l'application aux prélèvements, nous avons répété cette gamme d'ADN en ajoutant dans chaque capillaire, 50ng d'un ADN extrait d'un prélèvement vaginal négatif en culture pour le streptocoque B. Le même seuil de sensibilité a été retrouvé dans cette expérience (50fg d'ADN).

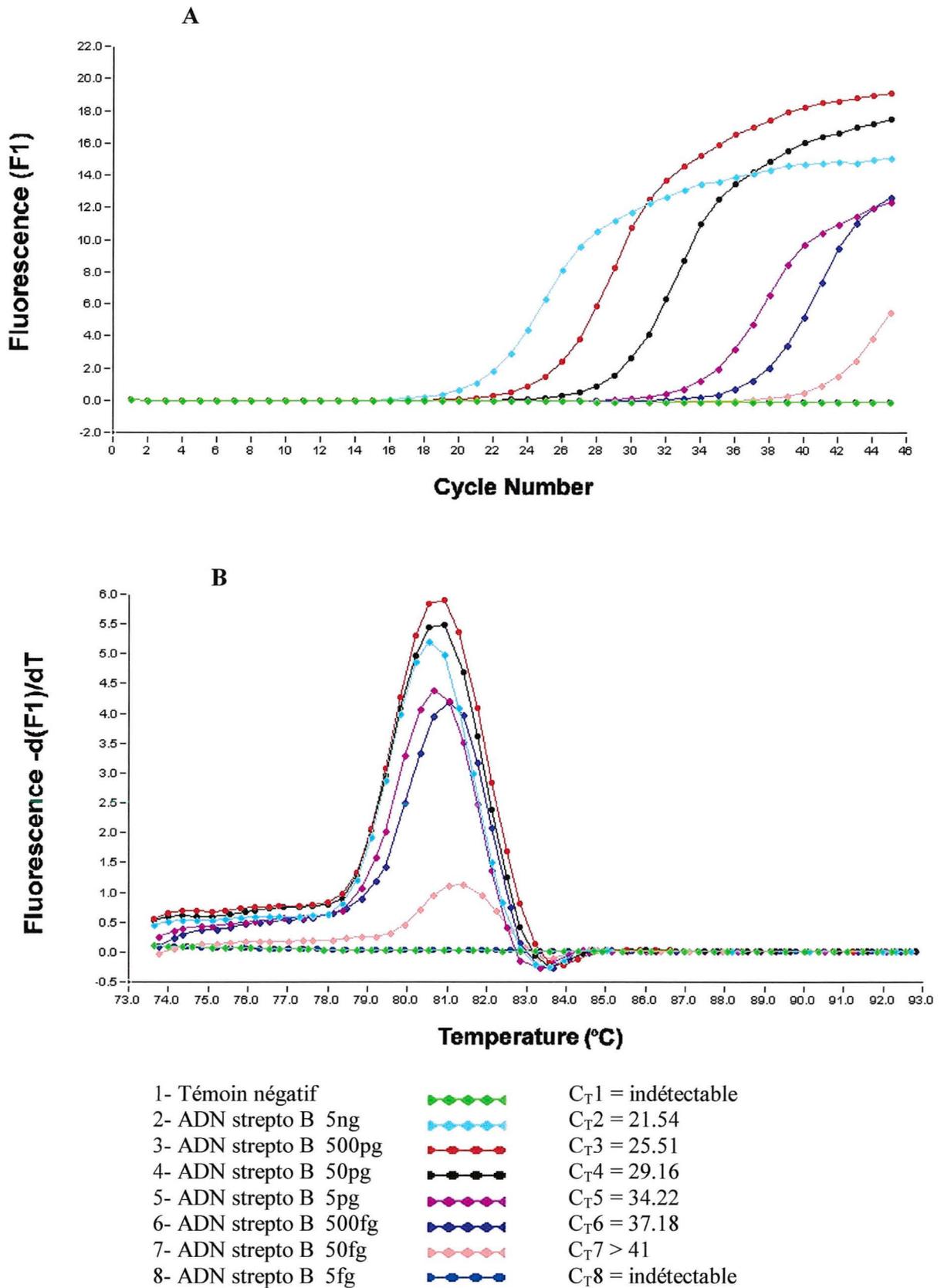


Figure 12 : courbes d'amplification et de fusion d'une gamme de raison 10 d'ADN (5ng à 5fg) de streptocoque B (strepto B).  $C_T$  = cycle seuil de fluorescence.  
 A : courbes d'amplification (fluorescence F1 en fonction du nombre de cycles)  
 B : courbes de fusion (fluorescence  $-d(F1)/dt$  en fonction de la température)

## 1.4 Etude de reproductibilité

Nous avons étudié la reproductibilité de cette technique de PCR par l'intermédiaire de l'analyse de deux paramètres : la température de fusion ( $T_m$ ) et le cycle seuil d'émission de fluorescence ( $C_T$ ). Pour une concentration en ADN donnée (5pg), nous avons effectué une douzaine d'amplification et déterminé le  $T_m$  et le  $C_T$  par calcul mathématique grâce au logiciel du LightCycler. Les différentes valeurs obtenues sont représentées dans le tableau 9.

Expériences	$T_m$ (en °C)	$C_T$ (nb de cycles)
Expérience 1	80,71	35,67
Expérience 2	80,76	33,30
Expérience 3	80,49	36,74
Expérience 4	80,76	35,88
Expérience 5	80,46	33,66
Expérience 6	80,82	34,22
Expérience 7	80,55	35,02
Expérience 8	80,46	33,50
Expérience 9	80,16	34,83
Expérience 10	80,65	34,71
Expérience 11	80,82	36,39
Expérience 12	80,45	33,20
<b>Moyenne</b>	<b>80,60</b>	<b>34,75</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,2</b>	<b>1,2</b>

**Tableau 9** : valeurs des températures de fusion ( $T_m$ ) et des cycles seuil d'émission de fluorescence ( $C_T$ ) obtenues dans douze expériences pour une concentration en ADN de 5pg

La moyenne de la température de fusion sur l'ensemble des valeurs est égale à 80,60°C et l'écart-type à 0,2. En ce qui concerne le cycle seuil d'émission de fluorescence, la moyenne est égale à 34,75 et l'écart-type à 1,2.

## 2- Application aux prélèvements vaginaux

Une fois la mise au point de cette PCR en temps réel sur LightCycler achevée, nous l'avons appliquée à 43 prélèvements vaginaux reçus au laboratoire de Bactériologie et provenant des services de Gynécologie Obstétrique du CHU de Grenoble.

### 2.1 Conditions d'amplification

Tous les extraits d'ADN obtenus ont été dosés au spectrophotomètre, afin d'homogénéiser la prise d'essai en quantité d'ADN. Pour les PV contenant plus de 5ng/μl d'ADN, nous avons utilisé la quantité maximale d'ADN recommandée pour l'amplification en SYBR Green I (50ng dans un volume de 10μl). Pour ceux contenant moins de 5ng/μl d'ADN nous avons pris un volume d'ADN extrait de 10μl.

Pour chaque réaction d'amplification nous avons utilisé deux témoins :

- un témoin négatif contenant 10μl d'eau à la place des 10μl d'ADN
- un témoin positif contenant 5pg d'ADN extrait de la souche de référence

### 2.2 Résultats

Parmi les 43 prélèvements vaginaux testés, 7 étaient positifs en culture pour le streptocoque B. Sur ces 7 prélèvements, 6 ont donné un résultat positif en PCR. Les résultats de la culture et les cycles seuil de fluorescence obtenus en PCR pour ces 7 PV figurent dans le tableau 10, les courbes d'amplification et de fusion sont représentées dans la figure 13.

Les pics de fusion des différents prélèvements vaginaux sont tout à fait superposables au pic obtenu avec l'ADN purifié extrait de la souche de référence, utilisé comme témoin positif. Deux des pics de fusion sont d'intensité plus faible que les autres. Ces deux pics correspondent aux PV n° 1 et 2 pour lesquels nous disposions d'un seul écouvillon pour la culture et la PCR. La culture étant réalisée en premier, les écouvillons étaient en partie déchargés avant la réalisation de la PCR.

La culture et la PCR sont réalisées sur deux écouvillons différents (sauf pour les PV n°1 et 2), ce qui peut expliquer le fait que les valeurs des cycles seuil de fluorescence ne soient pas corrélées avec les résultats de la culture (tableau 10).

Dans le PV n°4 négatif par PCR, nous avons contrôlé l'extraction d'ADN ainsi que l'absence d'éventuels inhibiteurs de PCR. Pour cela nous avons effectué une amplification du gène de la

$\beta$ -globine, gène présent dans toutes les cellules humaines. Cette amplification s'est avérée positive. Le résultat négatif de la PCR streptocoque B, pour ce prélèvement, est donc dû à un manque de sensibilité de la technique. Notons que la culture de ce PV n°4 était faiblement positive (rares colonies de streptocoque B).

Prélèvements vaginaux	Résultats de la culture streptocoque B	Valeur du $C_T$ obtenu en PCR
PV n°1	Quelques colonies	$C_T > 41$
PV n°2	Assez nombreuses colonies	$C_T > 41$
PV n°3	Quelques colonies	$C_T > 41$
PV n°4	Rares colonies	$C_T > ND$
PV n°5	Quelques colonies	$C_T = 37,9$
PV n°6	Nombreuses colonies	$C_T = 37,2$
PV n°7	Quelques colonies	$C_T = 34,6$

**Tableau 10** : résultats de la culture et valeurs des cycles seuil de fluorescence ( $C_T$ ) obtenues par PCR pour les sept prélèvements vaginaux (PV) positifs en culture pour le streptocoque B.

(ND = non détectable)

Le délai d'obtention des résultats était en moyenne de 24 heures pour la culture et de 3h15 pour la détection par PCR.

Comparée avec les résultats de la culture, la sensibilité de la PCR est égale à 87,5% et la spécificité à 100%. Les valeurs prédictives positive et négative sont égales respectivement à 100% et 97,3%.

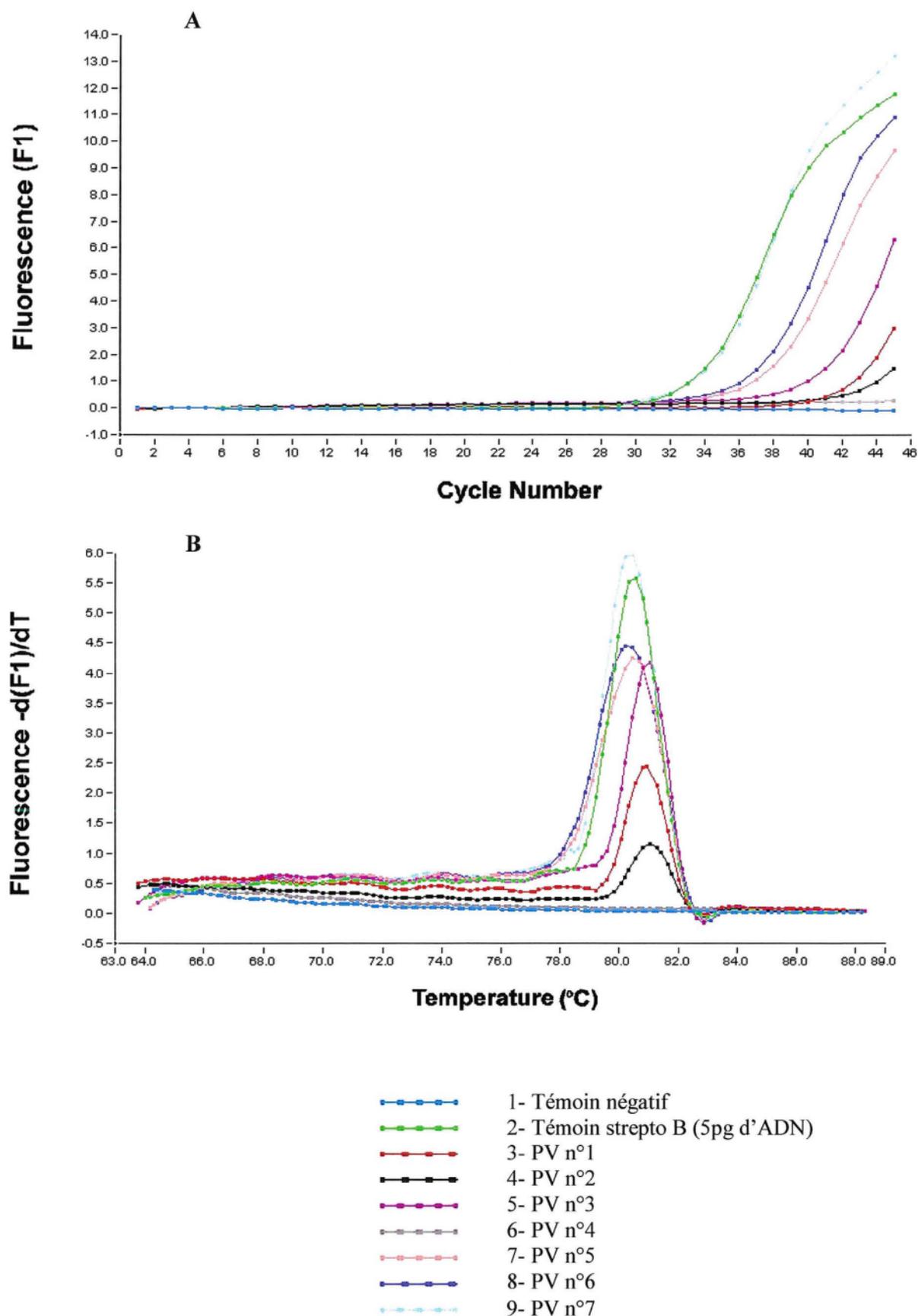


Figure 13 : courbes d'amplification (A) et de fusion (B) des sept prélèvements vaginaux (PV) positifs en culture pour le streptocoque B (strepto B)

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Dans le cadre de la prévention des infections néonatales à streptocoque B, un dépistage systématique du portage vaginal de cette bactérie est recommandé en fin de grossesse, idéalement entre 34 et 38 semaines d'aménorrhée. Plusieurs arguments sont en faveur de ce dépistage :

- la gravité des infections néonatales à streptocoque B
- la fréquence du portage vaginal du streptocoque B (environ 10% des femmes en France)
- l'absence de facteurs de risque au moment de l'accouchement dans 25% des cas
- l'efficacité de l'antibioprophylaxie *per-partum* guidée par le résultats du dépistage (réduction de plus des trois quarts du risque infectieux néonatal)
- la prévalence des conséquences des infections materno-fœtales qui en fait un problème de santé publique (séquelles neurologiques permanentes chez environ un tiers des nouveau-nés ayant développés une méningite, stérilité secondaire à une endométrite du *post-partum*)

La compensation du coût du dépistage et de l'antibioprophylaxie est réalisée par les économies faites sur la rationalisation des prescriptions et sur les complications néonatales et maternelles évitées.

Mais, comme nous l'avons vu, le portage vaginal du streptocoque B est transitoire. La valeur prédictive d'une colonisation en cours de grossesse dépend du délai entre le prélèvement et l'accouchement. De plus, les femmes accouchant prématurément ne bénéficient pas de ce dépistage, ainsi que les femmes qui ne sont pas suivies pendant leur grossesse.

L'utilisation d'un test rapide et fiable de dépistage du streptocoque B, au moment de l'accouchement, pourrait résoudre ces lacunes du dépistage anténatal.

D'après une étude de Benitz et coll., le dépistage des femmes porteuses de streptocoque B en début de travail, avec un test de détection rapide idéal, permettrait de traiter moins de femmes (15% contre 25% avec un dépistage en fin de grossesse) et d'éviter un plus grand nombre d'infections néonatales précoces à streptocoque B (90% contre 80% avec un dépistage en fin de grossesse), ceci avec un coût équivalent (17).

L'ANAES ne recommande l'utilisation des tests de détection rapide que chez les femmes non suivies pendant leur grossesse (2).

Actuellement, les tests de détection rapides commercialisés sont des tests immuno-enzymatiques. La biologie moléculaire pourrait être une alternative à ces techniques immuno-enzymatiques, qui pour la plupart manquent de sensibilité.

Dans le domaine du diagnostic bactériologique la PCR est essentiellement utilisée dans deux cas : pour la détection de bactéries à croissance lente (mycobactéries) et pour la détection de bactéries dont le diagnostic traditionnel n'existe pas (*Tropheryma whippelii*). Son utilisation dans le cadre d'un dépistage rapide du streptocoque B pourrait être une nouvelle application.

La PCR en temps réel, nouvel outil de biologie moléculaire, est encore peu utilisée en bactériologie. Cette nouvelle technologie possède de nombreux avantages :

- sa très grande rapidité (45 cycles d'amplification réalisés en 20 à 30 minutes).
- l'amplification et la détection se passent dans un même capillaire, ce qui diminue les risques de contamination post-PCR.
- la vitesse d'exécution de ce thermocycleur, avec de brefs passages à haute température, permet de maintenir un rendement de la Taq polymérase équivalent tout au long des cycles d'amplification, et de ne pas dégrader les fluorophores utilisés pour la mesure du signal.
- la possibilité de traiter jusqu'à 32 échantillons en même temps.

De plus, dans la mesure où les témoins positif et négatif sortent correctement, l'interprétation biologique des résultats ne pose pas de problème.

En revanche, cette technique implique de disposer de plusieurs pièces pour réaliser les différentes étapes de la PCR (extraction, préparation du mélange réactionnel et l'amplification), d'un thermocycleur spécifique type LightCycler et d'un personnel formé.

Bergeron et coll. (21) ont mis au point une PCR en temps réel permettant la détection du streptocoque B dans des prélèvements vaginaux et anaux. Ils ont défini des amorces dans une région fortement conservée du gène *cfb*. Ce gène codant pour la synthèse du CAMP-factor est théoriquement présent chez tous les streptocoques B et, très bien conservé au sein de cette espèce. La spécificité de ces amorces a été démontrée sur 125 espèces bactériennes et fongiques ainsi que sur 162 souches différentes de streptocoques B (49).

Le but de ce travail était de développer une technique rapide de détection de streptocoque B par PCR en temps réel sur LightCycler. Les résultats de cette détection par PCR sont obtenus en un peu plus de 3 heures, ce qui est nettement plus court que la culture classique (24 à 48

heures). Néanmoins cette technique reste plus longue que les tests de détection des antigènes du streptocoque B par technique immuno-enzymatique (10 à 30 minutes). Ce délai pourrait être diminué avec l'utilisation d'une technique d'extraction d'ADN plus rapide, dans la mesure où l'étape PCR seule ne dure que 45 minutes. En effet, parmi les différentes techniques d'extraction testées, le kit Qiagen choisi a donné les meilleurs résultats en ce qui concerne la lyse de la bactérie et la purification de l'ADN extrait, mais c'est également la technique la plus longue (2h15). La technique utilisée par Bergeron et coll. (21), IDI DNA extraction kit, est beaucoup plus rapide (10 minutes) et devrait permettre de réduire la détection du streptocoque B à 1 heure. Il serait intéressant de comparer cette technique d'extraction à celle de Qiagen.

L'étude de la dispersion de la température de fusion montre une très bonne reproductibilité de la PCR, avec un écart-type égal à 0,2. En ce qui concerne le cycle seuil d'émission de fluorescence ( $C_T$ ), la reproductibilité est un peu moins bonne, avec un écart-type égal à 1,2. En SYBR Green I les  $C_T$  varient généralement plus qu'en sondes d'hybridation, ce qui peut expliquer la moins bonne reproductibilité de ce paramètre. Etant donné que le but de cette PCR est de faire de la détection et non de la quantification, cette petite variabilité du  $C_T$  n'est pas préjudiciable.

A partir de l'ADN purifié, extrait de la souche de streptocoque B de référence, nous avons obtenu une limite de détection à 50fg d'ADN total, correspondant environ à 25 copies de génome bactérien. Bergeron et coll. ont obtenu un seuil de sensibilité à 5fg d'ADN (2 à 3 copies de génome bactérien), en utilisant un marquage du produit amplifié par des sondes d'hybridation spécifiques (21, 49). Le marquage de l'ADN amplifié par SYBR Green I utilisé dans notre cas semble moins sensible qu'un marquage par des sondes d'hybridation. Cependant, étant donné que nous n'avons pas testé de dilutions d'ADN intermédiaires entre 50fg et 5fg, le seuil de sensibilité de notre technique devrait être inférieur à 50fg et se rapprocher de celui de Bergeron et coll.

La sensibilité de la PCR par rapport à la culture, obtenue sur les prélèvements vaginaux (87%), est également plus faible (97%) que celle obtenue par Bergeron et coll. (21). Mais ces chiffres sont difficilement interprétables en raison du faible nombre de prélèvements testés dans notre étude (43 seulement contre 112 dans l'étude de Bergeron).

Une première explication peut néanmoins être évoquée : la quantité d'ADN totale utilisée comme échantillon. Celle-ci est en effet limitée à 50ng en SYBR Green I contre 500ng en

sondes d'hybridation. Pour les prélèvements faiblement positifs, une quantité limitée d'ADN comme prise d'échantillon peut être un facteur limitant.

Malgré ces deux inconvénients liés à l'utilisation d'un marquage des produits amplifiés par SYBR Green I par rapport aux sondes d'hybridation (sensibilité et quantité d'échantillon inférieures), nous avons choisi de travailler avec ce format de fluorescence pour deux raisons. La spécificité des amorces et l'absence de formation de produits non spécifiques ayant été démontrées (49) nous pouvions utiliser un marquage non spécifique du produit amplifié. De plus, nous voulions dans un deuxième temps, tenter de développer une PCR multiplex permettant la détection simultanée des deux bactéries les plus fréquemment responsables d'infections néonatales : *Streptococcus agalactiae* (streptocoque B) et *Escherichia coli* K1. L'utilisation de sondes d'hybridation nous obligerait à trouver des conditions PCR satisfaisantes pour deux couples d'amorces et deux couples de sondes. En SYBR Green I, la mise au point semble plus simple avec seulement deux couples d'amorces à optimiser.

Nous avons obtenu pour un des prélèvements vaginaux un faux négatif par PCR par rapport à la culture. Nous avons dû réaliser sur ce prélèvement, une deuxième PCR permettant d'amplifier le gène de la  $\beta$  globine, afin de vérifier l'extraction d'ADN et l'absence d'inhibiteurs de PCR dans ce PV.

Pour vérifier l'efficacité de la PCR dans chaque échantillon, sans avoir à réaliser deux réactions d'amplification par prélèvement, on peut envisager de développer un témoin interne. Celui-ci pourrait être formé d'une séquence d'ADN non retrouvée chez le streptocoque B, encadrée à chaque extrémité par les séquences complémentaires des deux amorces spécifiques. Ce fragment d'ADN, amplifié par les mêmes amorces et dans les mêmes conditions PCR, devra posséder un  $T_m$  différent d'au moins  $1^\circ\text{C}$  de celui du produit spécifique, afin de les distinguer sur la courbe de fusion.

Enfin, dernier élément à prendre en compte pour le choix d'une technique, son coût. Le coût des réactifs utilisés pour la détection par PCR sur LightCycler (environ  $50^{\text{F}}$ ) est plus élevé que ceux nécessaires pour le dépistage par culture ( $21^{\text{F}}$ ) et à peu près équivalent à ceux nécessaires pour la détection par technique immuno-enzymatique ( $43^{\text{F}}$  pour le Strep B OIA<sup>®</sup> test).

La politique de santé publique va vers une meilleure utilisation des antibiotiques avec si possible une documentation bactériologique, le plus près possible de la décision thérapeutique. De ce fait, un diagnostic rapide, même s'il coûte cher, peut être justifié.

# **CONCLUSION**

MEMOIRE SOUTENU PAR : Caroll LE RISBE

TITRE :

## **Détection du streptocoque B par PCR en temps réel dans des prélèvements vaginaux chez la femme enceinte**

### **CONCLUSION**

La prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce fait l'objet de consensus et de recommandations, où la place des infections à streptocoque B est prédominante. Le traitement préventif recommandé consiste à administrer une antibioprofylaxie *per-partum* chez les femmes porteuses de streptocoque B. Le dépistage systématique du portage de streptocoque B est recommandé en fin de grossesse, entre la 34<sup>ème</sup> et 38<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée. A l'heure actuelle, ce dépistage est réalisé par culture microbiologique.

L'utilisation d'un test rapide de détection du streptocoque B au moment de l'accouchement semble être une autre approche intéressante. Les tests immuno-enzymatiques commercialisés permettent, pour la plupart, un dépistage du streptocoque B chez les femmes fortement colonisées donc à haut risque infectieux, mais manquent de sensibilité pour une utilisation systématique. La biologie moléculaire pourrait être une alternative à ces tests.

Nous avons développé une technique de détection du streptocoque B par PCR en temps réel sur un thermocycleur automatisé (LightCycler). La première partie du travail a consisté en la mise au point de la technique, à partir d'une souche de streptocoque B de référence, avec les étapes suivantes : choix de la technique d'extraction (Qiagen), optimisation des conditions opératoires (concentration de chlorure de magnésium 3mM, température d'hybridation 60°C), étude de la reproductibilité et définition du seuil de sensibilité (25 copies de génome bactérien).

Dans un second temps, nous avons appliqué cette technique sur une quarantaine de prélèvements vaginaux provenant de femmes enceintes, hospitalisées dans les services de Gynécologie Obstétrique au CHU de Grenoble. Dans cette étude préliminaire, la sensibilité et la spécificité sont respectivement égales à 87% et 100%, la valeur prédictive positive à 100% et la valeur prédictive négative à 97,3%, par rapport à la culture. Le délai de réponse est de 3h15, contre 18 à 48 heures pour la méthode de référence (culture) et 30 minutes pour les tests immuno-enzymatiques.

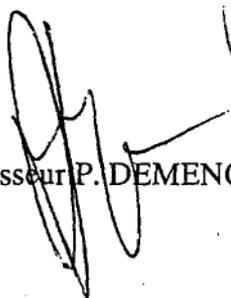
Si la PCR en temps réel s'avère plus sensible que les tests immuno-enzymatiques, cette technique nous semble cependant plus lourde et plus difficilement adaptable à une logistique de garde. Sa place dans les stratégies actuelles de prévention des infections néonatales précoces à streptocoque B reste donc à définir.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 24 Octobre 2001

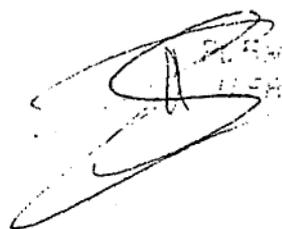
LE DOYEN

Professeur P. DEMENGE



LE PRESIDENT DU MEMOIRE

Professeur R. GRILLOT



le 24 Octobre 2001

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Adriaanse A.H., Muytjens H.L., Kollee L.A., Nijhuis J.G., Eskes T.K. Sensitivity of intrapartum group B streptococcal screening and in vitro comparison of four rapid antigen tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1994 : 56 : 21-6.
2. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Service recommandations et références professionnelles. Septembre 2001.
3. Allardice J.G., Baskett T.F., Seshia M.M., Bowman N., Malazdrewicz R. Perinatal group B streptococcal colonization and infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1982 : 142 (6 Pt 1) : 617-20.
4. Alouf J., Horaud T. Streptococcus, Enterococcus et apparentés. In : Eyquem A., Alouf J., Montagnier L. eds. *Traité de Microbiologie Clinique.* Padova : Piccin. 1998 : 593-618.
5. Altaie S.S., Dryja D. Detection of group B Streptococcus. Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994 : 18 : 141-4.
6. American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn. Guidelines for prevention of group B streptococcal (GBS) infection by chemoprophylaxis. *Pediatrics.* 1992 : 90 : 775-8.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists. Group B streptococcal infections in pregnancy. *ACOG Technical Bulletin.* 1992 : 170 : 1-4.
8. Andrews J.I., Diekema D.J., Hunter S.K. et al. Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 : 183 : 859-62.
9. Anonyme. Risks of devices for direct detection of group B streptococcal antigen. *J Nurse Midwifery.* 1997 : 42 : 408-9.
10. Anthony B.F., Okada D.M., Hobel C.J. Epidemiology of group B Streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis.* 1978 : 137 : 524-30.
11. Armer T., Clark P., Duff P., Saravanos K. Rapid intrapartum detection of group B streptococcal colonization with an enzyme immunoassay. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 : 168 (1 Pt 1) : 39-43.

12. Auvray C., Decaux J., Deliege R., Delesalle S., Reveil J.C. Value of a rapid screening technique for vaginal carriage of group B Streptococcus during high-risk pregnancies. *Pathol Biol.* 1999 : 47 : 494-6.
13. Badri M.S., Zawaneh S., Cruz A.C et al. Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis.* 1977 : 135 : 308-12.
14. Baker C.J., Rench M.A., Edwards M.S., Carpenter R.J., Hays B.M., Kasper D.L. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. *N Engl J Med.* 1988 : 319 : 1180-5.
15. Baker C.J. Inadequacy of rapid immunoassays for intrapartum detection of group B streptococcal carriers. *Obstet Gynecol.* 1996 : 88 : 51-5.
16. Baker C.J. Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol.* 1997 : 24 : 59-70.
17. Baker C.J., Paoletti L.C., Wessels M.R. et al. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib. *J Infect Dis.* 1999 : 179 : 142-50.
18. Benitz W.E., Gould J.B., Druzin M.L. Preventing early-onset group B streptococcal sepsis: strategy development using decision analysis. *Pediatrics.* 1999 : 103 : e76.
19. Benitz W.E., Gould J.B., Druzin M.L. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics.* 1999 : 103 : e77.
20. Benitz W.E., Gould J.B., Druzin M.L. Antimicrobial prevention of early-onset group B streptococcal sepsis: estimates of risk reduction based on a critical literature review. *Pediatrics.* 1999 : 103 : e78.
21. Bergeron M.G., Ke D., Menard C. et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med.* 2000 : 343 : 175-9.
22. Blanc B., Blond M.H., CHAIX C. et al. Les infections cervico-vaginales au cours de la grossesse. Recommandations pour la pratique clinique. *Bull Soc Fr Microbio.* 1998 : 13 : 151-153
23. Blond M.H., Lenclen R., Poulain P., Guillaume S. What are the risks associated with vaginal carriage and lower genital infections for the mother, the fetus and the newborn? *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 1997 : 26 (suppl 3) : 13-28.

24. Blumberg H.M., Stephens D.S., Modansky M. et al. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis.* 1996 : 173 : 365-73.
25. Bourbeau P.P., Heiter B.J., Figdore M. Use of Gen-Probe AccuProbe Group B streptococcus test to detect group B streptococci in broth cultures of vaginal-anorectal specimens from pregnant women: comparison with traditional culture method. *J Clin Microbiol.* 199 : 35 : 144-7.
26. Brady K., Duff P., Schilhab J.C., Herd M. Reliability of a rapid latex fixation test for detecting group B streptococci in the genital tract of parturients at term. *Obstet Gynecol.* 1989 : 73 : 678-81.
27. Boyer K.M., Gotoff S.P. Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease with selective intrapartum chemoprophylaxis. *N Engl J Med.* 1986 : 314 : 1665-9.
28. Boyer KM, Gotoff SP. Antimicrobial prophylaxis of neonatal group B streptococcal sepsis. *Clin Perinatol.* 1988 : 15 : 831-50.
29. Boyer K.M., Gotoff S.P. Alternative algorithms for prevention of perinatal group B streptococcal infections. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 : 17 : 973-9.
30. Carroll K.C., Ballou D., Varner M., Chun H., Traver R., Salyer J. Rapid detection of group B streptococcal colonization of the genital tract by a commercial optical immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 : 15 : 206-210.
31. Center for Diseases Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal diseases: a public health perspective. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1996 : 45 (RR-7) : 1-24.
32. Clark P., Armer T., Duff P., Davidson K. Assessment of a rapid latex agglutination test for group B streptococcal colonization of the genital tract. *Obstet Gynecol.* 1992 : 79 : 358-63.
33. Dillon H.C. Jr, Gray E., Pass M.A., Gray BM. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis.* 1982 : 145 : 794-9.
34. Dillon HC Jr, Khare S, Gray BM. Group B streptococcal carriage and disease: a 6-year prospective study. *J Pediatr.* 1987;110:31-6.
35. Donders G.G., Vereecken A., Salembier G., Spitz B. Accuracy of rapid antigen detection test for group B streptococci in the indigenous vaginal bacterial flora. *Arch Gynecol Obstet.* 1999 : 263 : 34-6.

36. Ferrieri P. Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogens. *Rev Infect Dis.* 1990 : 12 (Suppl 4) : S394-400.
37. Gardner SE, Yow MD, Leeds LJ, Thompson PK, Mason EO Jr, Clark DJ. Failure of penicillin to eradicate group B streptococcal colonization in the pregnant woman. A couple study. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 : 135 : 1062-5.
38. Gentry Y.M., Hillier S.L., Eschenbach D.A. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay test for detection of group B Streptococcus. *Obstet Gynecol.* 1991 : 78 (3 Pt 1) : 397-401.
39. Goldenberg R.L., Andrews W.W., Yuan A.C., MacKay H.T., St Louis M.E. Sexually transmitted diseases and adverse outcomes of pregnancy. *Clin Perinatol.* 1997 : 24 : 23-41.
40. Granato P.A., Petosa M.T. Evaluation of a rapid screening test for detecting group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol.* 1991 : 29 : 1536-8.
41. Green M., Dashefsky B., Wald E.R., Laifer S., Harger J., Guthrie R. Comparison of two antigen assays for rapid intrapartum detection of vaginal group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol.* 1993 : 31 : 78-82.
42. Greenspoon J.S., Fishman A., Wilcox J.G., Greenspoon R.L., Lewis W. Comparison of culture for group B streptococcus versus enzyme immunoassay and latex agglutination rapid tests: results in 250 patients during labor. *Obstet Gynecol.* 1991 : 77 : 97-100.
43. Hagay Z.J., Miskin A., Goldchmit R., Federman A., Matzkel A., Mogilner B.M. Evaluation of two rapid tests for detection of maternal endocervical group B streptococcus: enzyme-linked immunosorbent assay and gram stain. *Obstet Gynecol.* 1993 : 82 : 84-7.
44. Heelan J.S., Letourneau C., Lamarche D. Detection of group B Streptococcus by immunoassay following enrichment in LIM-selective broth medium. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995 : 22 : 321-4.
45. Hoogkamp-Korstanje J.A., Gerards L.J., Cats B.P. Maternal carriage and neonatal acquisition of group B streptococci. *J Infect Dis.* 1982 : 145 : 800-3.
46. Horaud T., Le Bouguéne C. Streptococcaceae. In : Le Minor L, Véron M eds. *Bactériologie Médicale.* Paris : Flammarion. 1989 : 835-90.
47. Isada N.B., Grossman J.H. 3rd. A rapid screening test for the diagnosis of endocervical group B streptococci in pregnancy: microbiologic results and clinical outcome. *Obstet Gynecol.* 1987 : 70 : 139-41.

48. Kasper D.L., Paoletti L.C., Wessels M.R. et al. Immune response to type III group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Clin Invest.* 1996 : 98 : 2308-14.
49. Ke D., Menard C., Picard F.J. et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem.* 2000 : 46 : 324-31.
50. Kontnick C.M., Edberg S.C. Direct detection of group B streptococci from vaginal specimens compared with quantitative culture. *J Clin Microbiol.* 1990 : 28 : 336-9.
51. Krohn M.A., Hillier S.L., Baker C.J. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J Infect Dis.* 1999 : 179 : 1410-5.
52. Lachenauer C.S., Kasper D.L., Shimada J. et al. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis.* 1999 : 179 : 1030-3.
53. Lejeune C. Epidémiologie des infections périnatales à streptocoques du groupe B. In : 2<sup>ème</sup> journée Parisienne obstétrico-pédiatrique, 1 vol, Doin éd., Paris. 1994 : 71-79.
54. Levine E.M., Ghai V., Barton J.J., Strom C.M. Intrapartum antibiotic prophylaxis increases the incidence of gram-negative neonatal sepsis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999 : 7 : 210-3.
55. Lin F.Y., Clemens J.D., Azimi P.H. et al. Capsular polysaccharide types of group B streptococcal isolates from neonates with early-onset systemic infection. *J Infect Dis.* 1998 : 177 : 790-2.
56. Lotz-Nolan L., Amato T., Iltis J., Wallen W., Packer B. Evaluation of a rapid latex agglutination test for detection of group B streptococci in vaginal specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989 : 8 : 289-93.
57. Madani T.A., Harding G.K., Helewa M., Alfa M.J. Screening pregnant women for group B streptococcal colonization. *Infection.* 1998 : 26 : 288-91.
58. Matorras R., Garcia-Perea A., Omenaca F., Diez-Enciso M., Madero R., Usandizaga J.A. Intrapartum chemoprophylaxis of early-onset group B streptococcal disease. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1991 : 40 : 57-62.
59. Mawn J.A., Simpson A.J., Heard S.R. Detection of the C protein gene among group B streptococci using PCR. *J Clin Pathol.* 1993 : 46 : 633-6.

60. McKenna D.S., Iams J.D. Group B streptococcal infections. *Semin Perinatol.* 1998 : 22 : 267-76.
61. Melin P., Schmitz M., De Mol P., Foidart J.M., Rigo J. Group B streptococcus, primary cause of life-threatening infections in infants. *Epidemiology and prevention strategy. Rev Med Liege.* 1999 : 54 : 460-7.
62. Millar B.C., Jiru X., Moore J.E., Earle J.A. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000 : 42 : 139-47.
63. Morales W.J., Lim D.V., Walsh A.F. Prevention of neonatal group B streptococcal sepsis by the use of a rapid screening test and selective intrapartum chemoprophylaxis. *Am J Obstet Gynecol.* 1986 : 155 : 979-83.
64. Morales W.J., Lim D. Reduction of group B streptococcal maternal and neonatal infections in preterm pregnancies with premature rupture of membranes through a rapid identification test. *Am J Obstet Gynecol.* 1987 : 157 : 13-6.
65. Nguyen T.M., Gauthier D.W., Myles T.D., Nuwayhid B.S., Viana M.A., Schreckenberger P.C. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. *J Matern Fetal Med.* 1998 : 7 : 172-6.
66. Park C.H., Ruprai D., Vandel N.M., Hixon D.L., Mecklenburg F.E. Rapid detection of group B streptococcal antigen from vaginal specimens using a new Optical Immuno Assay technique. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996 : 24 : 125-8.
67. Pearlman M.D., Pierson C.L., Faix R.G. Frequent resistance of clinical group B streptococci isolates to clindamycin and erythromycin. *Obstet Gynecol.* 1998 : 92 : 258-61.
68. Platt M.W., McLaughlin J.C., Gilson G.J., Wellhoner M.F., Nims L.J. Increased recovery of group B Streptococcus by the inclusion of rectal culturing and enrichment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995 : 21 : 65-8.
69. Platt R., Adelson-Mitty J., Weissman L., Zaleznik D., Lee M.L., Baker C.J. Resource utilization associated with initial hospital stays complicated by early onset group B streptococcal disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1999 : 18 : 529-33.
70. Pyati S.P., Pildes R.S., Jacobs N.M. et al. Penicillin in infants weighing two kilograms or less with early-onset Group B streptococcal disease. *N Engl J Med.* 1983 : 308 : 1383-9.

71. Pylipow M., Gaddis M., Kinney J.S. Selective intrapartum prophylaxis for group B streptococcus colonization: management and outcome of newborns. *Pediatrics*. 1994 : 93 : 631-5.
72. Ramos E., Gaudier F.L., Hearing L.R., Del Valle G.O., Jenkins S., Briones D. Group B streptococcus colonization in pregnant diabetic women. *Obstet Gynecol*. 1997 : 89 : 257-60.
73. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group*. *Obstet Gynecol*. 1991 : 77 : 604-10.
74. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997 : 245 : 154-60.
75. Rosenstein N.E., Schuchat A. Opportunities for prevention of perinatal group B streptococcal disease: a multistate surveillance analysis. *The Neonatal Group B Streptococcal Disease Study Group*. *Obstet Gynecol*. 1997 : 90 : 901-6.
76. Rouse D.J., Goldenberg R.L., Cliver S.P., Cutter G.R., Mennemeyer S.T., Fargason C.A. Jr. Strategies for the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal sepsis: a decision analysis. *Obstet Gynecol*. 1994 : 83 : 483-94.
77. Rouse D.J., Andrews W.W., Lin F.Y., Mott C.W., Ware J.C., Philips J.B. 3rd. Antibiotic susceptibility profile of group B streptococcus acquired vertically. *Obstet Gynecol*. 1998 : 92 : 931-4.
78. Samadi R., Stek A., Greenspoon J.S. Evaluation of a rapid optical immunoassay-based test for group B streptococcus colonization in intrapartum patients. *J Matern Fetal Med*. 2001 : 10 : 203-8.
79. Schlegel L., Bouvet A. Streptococcaceae : Streptococcus, Abiotrophia, Enterococcus, Lactococcus, Aerococcus et autres genres apparentés. In : Freynet J, Renaud F, Hansen W, Bollet C eds. *Précis de Bactériologie Clinique*. Paris : ESKA. 2000 : 835-90.
80. Schrag S.J., Zywicki S., Farley M.M. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*. 2000 : 342 : 15-20.
81. Schuchat A., Deaver-Robinson K., Plikaytis B.D., Zangwill K.M., Mohle-Boetani J., Wenger J.D. Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. *The Active Surveillance Study Group*. *Pediatr Infect Dis J*. 1994 : 13 : 623-9.

82. Skoll M.A., Mercer B.M., Baselski V., Gray J.P., Ryan G., Sibai B.M. Evaluation of two rapid group B streptococcal antigen tests in labor and delivery patients. *Obstet Gynecol.* 1991 : 77 : 322-6.
83. Song J.Y., Lin L.L., Shott S. et al. Evaluation of the Strep B OIA test compared to standard culture methods for detection of group B streptococci. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1999 : 7 : 202-5.
84. Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect.* 2000 : 2 : 1733-42.
85. Stoll B.J., Schuchat A. Maternal carriage of group B streptococci in developing countries. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 : 17 : 499-503.
86. Tamura G.S., Rubens C.E. Host-bacterial interactions in the pathogenesis of group B streptococcal infection. *Current Opinion in infectious diseases.* 1994 : 7 : 317-22.
87. Towers C.V., Garite T.J., Friedman W.W., Pircon R.A., Nageotte M.P. Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test and the Gram stain for detection of group B streptococcus in high-risk antepartum patients. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 : 163 : 965-7.
88. Towers C.V., Carr M.H., Padilla G., Asrat T. Potential consequences of widespread antepartal use of ampicillin. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 : 179 : 879-83.
89. Tuppurainen N., Hallman M. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: intrapartum detection and chemoprophylaxis of heavily colonized parturients. *Obstet Gynecol.* 1989 : 73 : 583-7.
90. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997 : 22 : 130-8.
91. Wittwer C.T., Ririe K.M., Andrew R.V., David D.A., Gundry R.A., Balis U.J. The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997 : 22 : 176-81.
92. Wust J., Hebisch G., Peters K. Evaluation of two enzyme immunoassays for rapid detection of group B streptococci in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993 : 12 : 124-7.
93. Yancey M.K., Armer T., Clark P., Duff P. Assessment of rapid identification tests for genital carriage of group B streptococci. *Obstet Gynecol.* 1992 : 80 : 1038-47.

94. Yancey M.K., Duff P. An analysis of the cost-effectiveness of selected protocols for the prevention of neonatal group B streptococcal infection. *Obstet Gynecol.* 1994 : 83 : 367-71.
95. Yancey M.K., Schuchat A., Brown L.K., Ventura V.L., Markenson G.R. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. *Obstet Gynecol.* 1996 : 88 : 811-5.
96. Yow M.D., Mason E.O., Leeds L.J., Thompson P.K., Clark D.J., Gardner S.E. Ampicillin prevents intrapartum transmission of group B streptococcus. *JAMA.* 1979 : 241 : 1245-7.
97. Yow M.D., Leeds L.J., Thompson P.K., Mason E.O. Jr, Clark D.J., Beachler C.W. The natural history of group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 : 137 : 34-8.

# **ANNEXES**

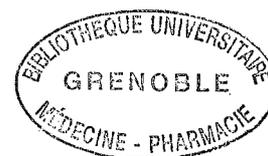
## LISTE DES ABREVIATIONS

AAP :	American Academy of Pediatrics
ACOG :	American College of Obstetrics and Gynecology
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANAES :	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
CDC :	Center for Diseases Control and Prevention
CFU :	Colony forming units
C <sub>T</sub> :	Cycle seuil de fluorescence
FDA :	Food and Drug Administration
GC :	Gélose Columbia
GS :	Gélose au sang
IV :	Intra-veineuse
LED :	Light emitting diode
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PM :	Poids moléculaire
PV :	Prélèvements vaginaux
RPM :	Rupture prématurée des membranes
TH :	Bouillon Todd-Hewitt
T <sub>m</sub> :	Température de fusion
UV :	Ultra-violets

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : mécanismes de pathogénicité du streptocoque B	6
<u>Figure 2</u> : répartition des sérotypes de streptocoque B responsables d'infections néonatales	9
<u>Figure 3</u> : algorithme pour la prévention des infections néonatales à streptocoque B. Stratégie basée sur un dépistage à 35-37 semaines de gestation	19
<u>Figure 4</u> : algorithme pour la prévention des infections néonatales à streptocoque B. Stratégie basée sur la présence de facteurs de risque	20
<u>Figure 5</u> : incidence des infections précoces à streptocoque B dans trois zones de surveillance aux Etats-Unis entre 1990 et 1998	21
<u>Figure 6</u> : algorithme pour la prise en charge des enfants nés de mères ayant reçues une antibioprofylaxie per-partum	24
<u>Figure 7</u> : schéma de principe du LightCycler	41
<u>Figure 8</u> : principe du SYBR Green I	42
<u>Figure 9</u> : courbes de fusion et pics de fusion obtenues avec différentes concentrations d'un ADN cible marqué par du SYBR Green I	43
<u>Figure 10</u> : électrophorèse du fragment d'ADN amplifié sur gel d'agarose	47
<u>Figure 11</u> : courbes d'amplification et de fusion de trois concentrations d'ADN de streptocoque B selon différentes concentrations de MgCl <sub>2</sub> et à deux températures d'hybridation	48
<u>Figure 12</u> : courbes d'amplification et de fusion d'une gamme de raison 10 d'ADN de streptocoque B	50
<u>Figure 13</u> : courbes d'amplification et de fusion des sept prélèvements vaginaux positifs en culture pour le streptocoque B	54
<u>Tableau 1</u> : traitements recommandés par le CDC dans le cadre d'une antibioprofylaxie per-partum	22
<u>Tableau 2</u> : comparaison des performances des tests de dépistage du streptocoque B par agglutination	29
<u>Tableau 3</u> : comparaison des performances des tests de dépistage du streptocoque B	

par technique immuno-enzymatique	31
<u>Tableau 4</u> : comparaison des différentes études d'évaluation du STREP B OIA® test	32
<u>Tableau 5</u> : performances des différentes techniques rapides de dépistage du streptocoque B	33
<u>Tableau 6</u> : composition du mélange réactionnel	44
<u>Tableau 7</u> : étapes de la réaction de PCR	44
<u>Tableau 8</u> : comparaison des trois techniques d'extraction d'ADN testées selon trois critères (quantité d'ADN extrait, pureté de l'ADN extrait, et durée de la technique)	46
<u>Tableau 9</u> : valeurs des températures de fusion et des cycles seuil d'émission de fluorescence obtenues dans 12 expériences pour une concentration en ADN de 5pg	51
<u>Tableau 10</u> : résultats de la culture et valeurs des cycles seuil d'émission de fluorescence obtenues par la PCR, pour les prélèvements vaginaux positifs en culture pour le streptocoque B	53





# Serment des Apothécaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



**TITRE :** Détection du streptocoque B par PCR en temps réel dans des prélèvements vaginaux chez la femme enceinte

**RESUME :**

La prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce fait l'objet de recommandations, où la place des infections à streptocoque B est prédominante. Le traitement préventif recommandé consiste à administrer une antibioprofylaxie *per-partum* chez les femmes colonisées par le streptocoque B, identifiées par un dépistage systématique en fin de grossesse. A l'heure actuelle, ce dépistage est réalisé par culture microbiologique.

La biologie moléculaire pourrait être une alternative aux tests immuno-enzymatiques commercialisés pour la détection rapide du streptocoque B au moment de l'accouchement.

Nous avons développé une technique de détection rapide (3h15) du streptocoque B par PCR en temps réel sur un thermocycleur automatisé (LightCycler). La première partie du travail a consisté en la mise au point de la technique, à partir d'une souche de streptocoque B de référence, avec laquelle nous avons obtenu un seuil de sensibilité de 25 copies de génome bactérien.

Dans un second temps, nous avons appliqué cette technique sur des prélèvements vaginaux provenant de femmes enceintes, hospitalisées dans les services de Gynécologie Obstétrique au CHU de Grenoble. Nous avons obtenus sur ces prélèvements, une sensibilité et une spécificité respectivement égales à 87% et 100%, une valeur prédictive positive à 100% et une valeur prédictive négative à 97,3%, par rapport à la culture.

La place de cette technique dans la prévention des infections néonatales à streptocoque B, avec ses avantages et ses inconvénients, reste à définir.

**MOTS CLES :** Streptocoque B, Infection néonatale, PCR en temps réel

**JURY :**  
Président : Madame le Professeur R. Grillot  
Membres : Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin  
Monsieur le Docteur J.M. Ayoubi  
Monsieur le Docteur J. Croizé

**AUTEUR :** Caroll LE RISBE

[Données à caractère personnel]