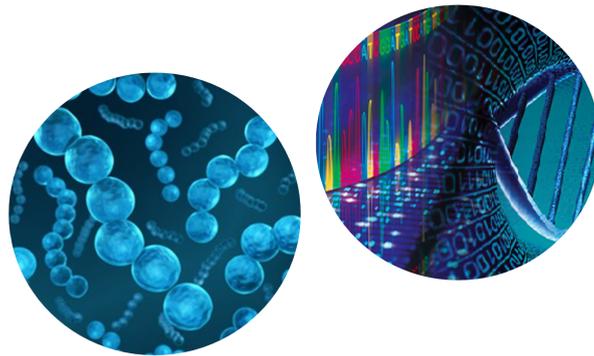


UNIVERSITÉ DE LIÈGE - FACULTÉ DE
MÉDECINE
CHU DE LIÈGE - LABORATOIRE DE
MICROBIOLOGIE



Surveillance épidémiologique
2023-2024 de la colonisation
vagino-rectale à *Streptococcus*
agalactiae chez la femme enceinte

Travail de fin d'études réalisé en vue de l'obtention du grade de
Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie
par Noémie GUBBELS

Superviseur académique:
Rosalie SACHELI

Co-superviseur académique:
Cécile MEEEX



Année académique 2023-2024

Remerciements

À Madame la Professeure Marie-Pierre HAYETTE,

Chef de service du laboratoire de Microbiologie clinique au CHU de Liège.

Merci de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

À Madame la Docteure Rosalie SACHELI,

pour son expertise et ses conseils avisés.

Merci de m'avoir aussi bien aiguillée tout au long de la réalisation de ce mémoire, sans qui il n'aurait pu voir le jour.

À Madame la Pharmacienne Biologiste Cécile MEEEX,

pour sa relecture.

Merci d'avoir consacré du temps à l'amélioration de ce travail de fin d'études.

À Mademoiselle Sabrina EGREK et À Monsieur Khalid EL MOUSSAOUI,

pour leur aide précieuse.

Merci de m'avoir consacré autant de temps, d'avoir été aussi présent et d'avoir tant contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

À toute l'équipe de la plateforme GIGA-Genomics de l'Université de Liège,

d'avoir collaboré sur ce travail.

Merci d'avoir été disponibles pour la réponse aux questions.

À toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie clinique et particulièrement l'équipe du Centre National de Référence Streptococcus agalactiae,

pour leur bienveillance et leur bonne humeur.

Merci d'avoir été disponibles et d'avoir rendu mon expérience au sein du laboratoire des plus agréables possibles.

À ma famille,

sans qui la réalisation de ce mémoire n'aurait été possible.

Merci de m'avoir apporté ce soutien inconditionnel tout au long de mes études.

Abréviations

- ACP = Alpha C Protein
- ALP = Alpha-Like Protein
- CAMP = Christie, Atkinson et Munch-Peterson
- CNA = Colistine et Acide Nalidixique
- CNR = Centre National de Référence
- CPS = Capsular Polysaccharides
- EOD = Early-Onset Disease
- Fbs = Fibrinogen binding protein
- GAG = Glycosamonioglycans
- GBS = Group B Streptococcus
- HvgA = Hypervirulent GBS Adhesin
- HylB = Hyaluronidase
- LOD = Late-Onset Disease
- Lmb = Laminin binding protein
- MALDI-TOF = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
- MLS = Macrolides – Lincosamides – Streptogramines
- MLST = MultiLocus Sequence Typing
- PBP = Penicillin-Binding Protein
- PbsP = Plasminogen binding surface Protein
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- PI = Pilus Island
- SBS = Sequencing By Synthesis
- ScpB = Streptococcal C5a peptidase du groupe B
- Sia = Acide sialique
- SfbA = Streptococcus fibronectin-binding protein A
- SIP = Surface Immunogenic Protein
- ST = Sequence Type
- TLR = Toll-Like Receptors

Résumé

Le *Streptococcus agalactiae*, autrement nommé le streptocoque du groupe B (SGB ou GBS pour group B streptococcus), est une bactérie cocci Gram positif communément retrouvée dans la flore intestinale ainsi que dans la flore vaginale des adultes sains. En revanche, le GBS est la première cause de mortalité néonatale en Belgique en raison de sa transmission au nouveau-né. Un dépistage permettant de déterminer le statut de colonisation de la femme enceinte est réalisé à 35-37 semaines de gestation et une antibioprophylaxie est administrée si celui-ci revient positif.

Ce travail de fin d'étude s'inscrit dans la surveillance épidémiologique des souches circulantes de GBS chez la femme enceinte. En effet, l'objectif est d'actualiser les informations disponibles, en Belgique, quant aux caractéristiques du GBS en vue notamment, du développement d'un vaccin contre cette bactérie.

A cet égard, 62 laboratoires dispersés dans toute la Belgique ont envoyé 5 souches de GBS consécutives comptabilisant, au total pour l'étude, 310 souches récoltées. Ces souches ont été identifiées et leur ADN extrait afin de réaliser du séquençage à haut débit (NGS). Couplé au logiciel WGS typer, ce séquençage sera employé afin de cibler différents marqueurs pour déterminer le sérotype, le sequence type (ST), les protéines de pili, les facteurs de virulence ainsi que les gènes de résistance aux différentes classes d'antibiotiques. La résistance phénotypique à ces différentes classes d'antibiotiques sera également évaluée.

Concernant les données collectées à travers la durée de l'étude, le sérotype le plus prévalent dans cette population est le sérotype Ia avec une fréquence de 21.82%. Le ST-23 est le plus retrouvé comptabilisant une fréquence de 12.7%. La combinaison des gènes des protéines de pili *PI-1*, *PI-2a* est la plus fréquente (50.81%) au sein des souches incluses dans l'étude. Le pourcentage de résistance phénotypique à l'érythromycine s'élève à 35.83% et celui de la clindamycine s'élève à 27.36%. Le phénotype de résistance MLS le plus présent est le phénotype cMLS avec une fréquence de 59.09%. Finalement, l'entièreté des souches sont sensibles à la pénicilline.

Les données obtenues au cours de ce travail sont en accord avec les données disponibles dans la littérature concernant les différents pays et à travers les années ce qui permet d'actualiser ces informations au niveau belge.

Mots clés : épidémiologie, GBS, néo-natal, NGS, vaccin

Summary

Streptococcus agalactiae, also called group B streptococcus (GBS), is a cocci Gram positive bacteria commonly found in the intestinal flora as well as in the vaginal flora of healthy adults. However, GBS is the leading cause of neonatal mortality in Belgium due to the transmission of this bacteria to neonates. A screening allowing to determine the colonization status of the pregnant woman is conducted at 35-37 weeks of gestation and antibiotic prophylaxis is administered if the result is positive.

This project is part of the epidemiological surveillance of GBS circulating strains in pregnant women. Indeed, the goal is to update the information that are available regarding GBS characteristics in Belgium in view, notably, of the development of a vaccine against this bacteria.

In this context, 62 laboratories located throughout Belgium sent 5 consecutive GBS strains, 310 strains were collected in total for the study. These strains were identified, and their DNA were extracted to perform high-throughput sequencing (NGS). Coupled with WGS typer software, this sequencing will be used to target several markers in order to determine the serotype, the sequence type, the pili proteins, the virulence factors as well as the resistance factors to several classes of antibiotics. Phenotypic resistance to these different classes of antibiotics will be also evaluated.

Regarding the data collected over the course of the study, the most prevalent serotype is serotype Ia in this population with a frequency of 21.82%. ST-23 is the most frequently ST identified, accounting for a frequency of 12.7%. The combination of pili protein genes *PI-1*, *PI-2a* is found in this population at a rate of 50.81%. The frequency of phenotypic resistance to erythromycin is 35.83%, and for clindamycin, it is 27.36%. The most common MLS resistance phenotype is the cMLS phenotype, with a frequency of 59.09%. Lastly, all strains are susceptible to penicillin.

The data obtained in this work are consistent with the data available in the literature concerning different countries and over the years, which allows the update of these informations at the Belgian level.

Key words : epidemiology, GBS, neonatal, NGS, vaccine

Table des matières

I	Introduction	1
1	Historique	1
2	Classification	1
2.1	Caractéristiques du GBS	1
2.2	Classification de Lanfield	2
2.3	Sérotypes	2
3	Facteurs de virulence	2
3.1	Facteurs de virulence associée avec le fonctionnement du cervix	3
3.1.1	Capsule	3
3.1.2	Protéines alpha-like (Alp)	3
3.1.3	Protéine BibA	3
3.2	Facteurs de virulence associés avec le fonctionnement vaginal	3
3.2.1	Adhésines	3
3.2.2	Protéine CylB	5
3.3	Facteurs de virulence associés avec l'interaction de l'interface materno-foetale	5
3.3.1	Vésicules membranaires	5
3.4	Facteurs de virulence impliqués dans les infections néonatales	6
3.4.1	Adhésine hypervirulente du GBS (HvgA)	6
3.5	Ribonucléase Z	6
3.6	Protéine RepB	6
3.7	Protéine de surface immunogène (SIP)	6
4	Infection à GBS	6
4.1	Portage et dépistage chez la femme enceinte	7
4.2	Infection chez le nouveau-né	7
4.2.1	Infection précoce (EOD)	7
4.2.2	Infection tardive (LOD)	8
4.3	Infection chez les adultes	8
5	Prophylaxie et traitement	8

6	Mécanismes de résistance aux antibiotiques	9
6.1	Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)	9
6.2	Résistance aux β -lactames	10
6.3	Résistance aux tétracyclines	10
6.4	Résistance aux fluoroquinolones	10
6.5	Résistance aux glycopeptides	11
6.6	Résistance aux aminoglycosides	11
7	Immunoprophylaxie	11
8	Outils de laboratoire	12
8.1	Outils de diagnostic	12
8.1.1	Culture bactérienne	12
8.1.2	MALDI-TOF MS	13
8.2	Outils de recherche approfondis	14
8.2.1	Biologie moléculaire	14
8.2.1.1	Panel PCR méningite/encéphalite	14
8.2.1.2	Séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS)	14
II	Objectif et stratégie expérimentale	16
1	Objectif	16
2	Stratégie expérimentale	16
III	Matériels et méthodes	17
1	Collection des souches	17
2	Mise en culture, identification par MALDI-TOF MS et souchothèque	17
2.1	Matériel	17
2.1.1	Mise en culture et identification par MALDI-TOF MS	17
2.1.2	Souchothèque	18
2.2	Méthode	18
2.2.1	Mise en culture et identification par MALDI-TOF MS	18
2.2.1.1	Interprétation des résultats	19
2.2.2	Souchothèque	19
3	Extraction de l'ADN	19
3.1	Matériel	19
3.2	Méthode	20
4	Dosage de l'ADN au Nanodrop	21
4.1	Matériel	21
4.2	Méthode	21
5	NGS	21

5.1	Analyse des résultats	22
6	Antibiogrammes	22
6.1	Diffusion en milieu gélosé	23
6.1.1	Matériel	23
6.1.2	Méthode	23
6.1.2.1	Interprétation des résultats	23
6.2	Méthode de microdilution Sensititre	24
6.2.1	Matériel	24
6.2.2	Méthode	25
6.2.2.1	Analyse et interprétation des résultats	25
6.3	Analyse statistiques	26
IV	Résultats	27
1	Collection des souches	27
2	Identification du GBS	27
3	Résultats du NGS	27
3.1	Sérotypes	27
3.2	Sequences types	28
3.3	Gènes codant pour les protéines de pili	28
3.4	Gènes des facteurs de virulence	28
3.5	Gènes de résistance	29
4	Résultats des antibiogrammes	30
4.1	Diffusion en milieu gélosé	30
4.2	Méthode de microdilution Sensititre	31
4.3	Phénotype de résistance MLS	32
5	Mise en relation des résultats	32
5.1	Distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes	32
5.2	Distribution des sequence types selon les sérotypes	32
5.3	Phénotype MLS	33
5.4	Phénotype cMLS	33
5.5	Phénotype iMLS	33
5.6	Phénotype M	33
V	Discussion, conclusion et perspectives	34
1	Sérotypes	34
2	Sequence type	35
3	Distribution du sequence type selon les sérotypes	35
4	Distribution des gènes codant pour les protéines de pili	36

5	Distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes	36
6	Gènes des facteurs de virulence	37
6.1	Protéines alpha-like	37
6.2	Adhésines	38
6.2.1	Protéines Srr	38
6.2.2	Protéines Fbs	38
6.3	Autres facteurs de virulence	38
7	Résistances	39
7.1	Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)	39
7.2	β -lactames et céphalosporines	40
8	Discussion complémentaire sur l'analyse des données de NGS	41
9	Conclusion et perspectives	42

I Introduction

1 Historique

La bactérie *Streptococcus agalactiae* fut premièrement identifiée, chez les bovins, en 1887, par Nocard et Mollereau. En effet, elle était responsable de mammites bovines empêchant la production de lait ; c'est d'ailleurs de là qu'elle tiendra son nom « agalactiae ». Par la suite, en 1933, la classification de cette bactérie par Rebecca Lancefield a eu lieu après l'analyse du lait de vaches infectées [1][2]. Celle-ci sera nommée la classification de Lancefield (cf. 2.2 Classification de Lancefield). A cette époque-là, le *Streptococcus agalactiae* était uniquement un pathogène vétérinaire et une source fréquente de mastite bovine [2]. Entre les années 1930 et 1940, quelques cas de septicémie furent rapportés chez les humains à l'âge adulte. Mais ce n'est que vers la fin des années 1960 que cette bactérie fut responsable d'infections néonatales, suivi d'une intensification des ces infections depuis les années 1970. C'est donc à ce moment-là que cette bactérie fut considérée comme un pathogène humain [1]. Depuis, elle est une des premières causes d'infections néonatales dans le monde [2].

2 Classification

Le *Streptococcus agalactiae* fait partie de la famille des Streptococcaceae et du genre des Streptococcus [3]. Autrement nommé le Streptocoque du groupe B ou Group B Streptococcus en anglais (GBS), il s'agit d'une bactérie gram positive, encapsulée, anaérobie facultative, catalase négative, CAMP positive et présentant une morphologie en coque par paire ou en chaînette. De plus, le GBS présente une hémolyse β sur une gélose au sang [1][4][5].

2.1 Caractéristiques du GBS

— Métabolisme

Cette bactérie est caractérisée comme anaérobie facultative ce qui signifie que la présence d'oxygène n'est pas obligatoire à sa croissance. Ce phénomène est rendu possible par la possession de deux chaînes respiratoires, une aérobie et l'autre anaérobie, respectivement dépendante et indépendante de l'oxygène pour leur fonction [6].

— Type d'hémolyse

Une des caractéristiques de cette bactérie est de produire une hémolyse sur une gélose au sang. Cette hémolyse est réalisée par une protéine nommée l'hémolysine qui permet de lyser les globules rouges. En microbiologie, on décrit 3 types d'hémolyses différentes basés sur le phénotype

d'expression : l'hémolyse β (complète), l'hémolyse α (partielle) et l'hémolyse γ (absente). L'hémolyse β , réalisée par la majorité des souches de GBS, se présente sous forme d'un anneau blanchâtre autour des colonies. L'hémolyse γ , elle, qui en réalité représente une absence d'hémolyse sur cette gélose, concerne une infime partie des souches de GBS (cf. **Figure 1**) [7].

2.2 Classification de Lancefield

La classification de Lancefield, établie par Barbara Lancefield, se base sur la spécificité du carbohydrate C, un composant majeur de la paroi cellulaire des bactéries. En effet, elle a découvert que la majorité des streptocoques possédaient ce carbohydrate mais qu'il avait un motif antigénique différent en fonction de l'espèce. En réalité, ce carbohydrate est nommé le polyside C qui permet de classer les bactéries le possédant en 19 sérogroupes différents (désignés par une lettre de A à H, K à P, R à V) [8][9][10]. Certains streptocoques ne possèdent pas ce polyside C ; ils seront donc dits « non groupables » [10]. Le *Streptococcus agalactiae* est classé dans le groupe B dont il est, à ce jour, le seul représentant [8]. Un test antigénique, nommé le test de Lancefield, permet d'identifier les sérogroupes A, B, C, D, F et G à l'aide d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent le motif antigénique du polyside C se trouvant à la surface des bactéries [11].

2.3 Sérotypes

On peut aussi classer le GBS en fonction d'un polysaccharide capsulaire (CPS) possédant également un motif antigénique différent selon les souches de GBS considérées. En effet, ce polysaccharide est codé par un locus nommé « cps » qui possède une région conservée ainsi qu'une région variable. Le motif antigénique est donné par la région variable et permettra de déterminer le sérotype. Actuellement, il existe 10 sérotypes différents : Ia, Ib, II-IX. La distribution de ces sérotypes va dépendre du lieu géographique, du type de pathologie ainsi que de l'âge du patient [12]. En effet, en Belgique, les sérotypes les plus fréquents sont les sérotypes Ia, Ib, II-V [13]. En routine, un test d'agglutination permet d'identifier les sérotypes à l'aide d'anticorps monoclonaux reconnaissant le motif antigénique de ces CPS présents à la surface des bactéries. En revanche, les CPS ne sont pas toujours exprimés et les conditions de croissance peuvent modifier cette expression. C'est pour cette raison que les techniques de biologie moléculaire sont sollicitées [12].

3 Facteurs de virulence

Dans le cadre de la colonisation et de l'infection du GBS, certains facteurs de virulence peuvent augmenter la pathogénicité de la bactérie.

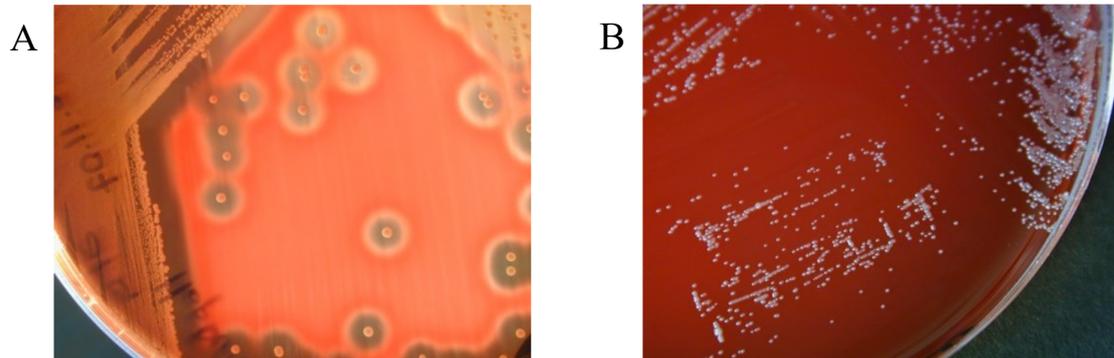


FIGURE 1 – Différents types d'hémolyses (A. Hémolyse β et B. Hémolyse γ) [14]

3.1 Facteurs de virulence associée avec le fonctionnement du cervix

Le col de l'utérus, également nommé le cervix, permet de contrôler l'entrée de microorganismes pathogènes protégeant ainsi la femme enceinte contre la colonisation et le fœtus contre les infections [15].

3.1.1 Capsule

La capsule représente le principal facteur de virulence du GBS. En effet, cette capsule est constituée de polysaccharides permettant de défendre la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte en inhibant la fixation du complément, l'opsonisation et la phagocytose des bactéries. La capsule est aussi constituée d'acide sialique (Sia) qui permet d'inhiber la lyse ainsi que de résister aux antimicrobiens produits par les plaquettes (cf. **Figure 2**) [15].

3.1.2 Protéines alpha-like (Alp)

La famille des protéines Alp contient des protéines chimériques ancrées à la surface des GBS par une région C-terminal commune à toutes. En revanche, elles possèdent une région N-terminale différente constituant un motif antigénique pouvant être ciblé par des anticorps (cf. 7 Immunoprophylaxie). Dans cette famille se trouvent, entre autres, les protéines Alp1, Alp2, Alp3, Alp4, R4/Rib, alpha C (ACP) et finalement la protéine R5 codée par le gène Sar5 [16] [17]. La protéine ACP, étant la plus étudiée de toutes celles présentes dans la famille, facilite l'entrée du GBS à travers les cellules épithéliales du cervix en se liant au glycosaminoglycans (GAG) à la surface des cellules (cf. **Figure 2**) [15].

3.1.3 Protéine BibA

La protéine BibA fait partie de la famille des adhésines. Elle est ancrée dans la paroi du GBS, ce qui permet l'interaction de cette bactérie avec les cellules épithéliales du cervix. Cette protéine possède 4 motifs antigéniques différents (I-IV) ; le IV étant le plus associé avec la souche ST17 (cf. **Figure 2**) [18].

3.2 Facteurs de virulence associés avec le fonctionnement vaginal

Les facteurs de virulence associés à une perturbation du fonctionnement vaginal permettent au GBS de se disséminer, d'échapper au système immunitaire et d'endommager les tissus vaginaux afin de favoriser la survie de cette bactérie dans cet environnement [15].

3.2.1 Adhésines

Les adhésines sont des protéines permettant à la bactérie d'adhérer aux cellules épithéliales du vagin afin de pénétrer la barrière muqueuse de l'hôte et de se répandre dans les tissus de cet hôte [15].

Les adhésines impliquées dans cette fonction sont :

— Srr1/Srr2

Ce sont des glycoprotéines, exprimées par le GBS, qui lient le fibrinogène permettant l'adhésion aux cellules cibles. La protéine Srr 1 lie aussi la kératine ce qui rend possible l'adhésion des bactéries à l'épithélium vaginal et cervical. La protéine Srr2, quant à elle, lie le plasminogène ainsi que la plasmine. Ces adhésions que réalise la protéine Srr2 rendent la souche ST-17/sérotype III très virulente (**cf. Figure 2**) [15].

— Protéines liant le fibrinogène (FbsA, FbsB et FbsC)

Ces 3 protéines qui lient également le fibrinogène permettent l'adhérence aux cellules vaginales et in fine la colonisation de celui-ci. FbsA et FbsB sont les plus retrouvées dans les GBS infectant la femme enceinte. FbsC, quant à elle, forme des biofilms dans le vagin et permet d'aider le passage à travers la barrière hémato-encéphalique en cas de méningite (**cf. Figure 2**) [15].

— Protéines de pili

Les protéines de pili sont des protéines ancrées dans la paroi cellulaire du GBS. Ces protéines sont composées de trois sous-unités différentes :

1. La base du pilus se trouvant dans la paroi
2. Le squelette du pilus
3. La pointe du pilus qui se lie au collagène de type 1

Grâce au séquençage du génome, deux locus différents ont été identifiés pour le gène codant ces protéines. Ceux-ci sont nommés Pilus island 1 (*PI-1*) et Pilus island 2 (*PI-2*). Ce dernier possède deux allèles différents : *PI-2a* et *PI-2b* [19]. A la surface, ces protéines sont aussi bien exprimées seules qu'en concomitance, à l'exception de *PI-2a* et *PI-2b* qui ne seront jamais exprimées ensemble. La combinaison des protéines *PI-1*, *PI-2a* est la plus retrouvée dans le monde [20]. En Belgique, cette combinaison ne varie pas en fonction du type d'infection puisqu'elle est la plus retrouvée pour les infections néonatales (cf. 4.2 Infection chez le nouveau-né) ainsi que pour les infections chez les adultes (cf. 4.3 Infection chez les adultes). En revanche, cette combinaison varie en fonction des manifestations cliniques de l'infection néonatale puisque la combinaison *PI-1*, *PI-2a* est la plus retrouvée pour l'infection précoce (cf. 4.2.1 Infection précoce (EOD)) et la combinaison *PI-1*, *PI-2b* est la plus retrouvée pour l'infection tardive (cf. 4.2.2 Infection tardive (LOD)) (**cf. Figure 2**) [13][21].

— Protéine liant la laminine (Lmb)

Cette protéine, qui se lie à la laminine, est cruciale pour la colonisation ainsi que l'invasion de l'épithélium vaginal par le GBS (**cf. Figure 2**) [15].

— Streptococcus C5a peptidase du groupe B (ScpB)

Cette protéine, liant la fibronectine, est nommée la C5a peptidase car elle empêche l'activation

du complément en dégradant la protéine C5a. Une étude a révélé que l'expression de cette protéine est significativement augmentée au sein des souches impliquées dans les infections néonatales (**cf. Figure 2**) [15].

— Streptococcus fibronectine-binding protéine A (SfbA)

Tout comme la protéine ScpB (cf. 3.2.1 Adhésines : Streptococcus C5a peptidase du groupe B (ScpB)), la protéine SfbA lie la fibronectine permettant l'invasion des cellules épithéliales du vagin ainsi que du cervix. Cette protéine permet aussi l'invasion de la barrière hémato-encéphalique. De ce fait, elle est impliquée dans la pathogenèse à l'origine de la méningite (**cf. Figure 2**) [22].

— Hyaluronidase (HylB)

La fonction de la protéine HylB est de dégrader l'acide hyaluronique se trouvant dans les membranes. En effet, cette dégradation conduit à la lésion de la membrane materno-fœtale et *in fine*, la translocation de la bactérie vers le fœtus. Cette protéine permet aussi d'échapper au système immunitaire car les fragments d'acide hyaluronique se fixent sur des récepteurs de l'immunité à savoir ceux de la famille des Toll-like récepteurs (TLR) impliqués dans l'inflammation (**cf. Figure 2**) [15].

3.2.2 Protéine CylB

La protéine CylB est codée par l'opéron *cyl* et est impliqué dans l'activité cytotoxique du GBS. En effet, cette protéine fait partie d'un transporteur transmembranaire de la famille des ABC-type transporteurs. Il est responsable de l'efflux des cytotoxines bactériennes permettant d'infecter la femme enceinte ainsi que le fœtus (**cf. Figure 2**) [23].

3.3 Facteurs de virulence associés avec l'interaction de l'interface materno-fœtale

3.3.1 Vésicules membranaires

Les vésicules membranaires sont des vésicules extracellulaires contenant divers facteurs de virulence comme des hyaluronidases (cf. 3.2.1 Adhésines : Hyaluronidases (HylB)) et la C5a peptidase (cf. 3.2.1 Adhésines : Streptococcus C5a peptidase du groupe B (ScpB)). L'activité protéasique de ces vésicules permet de dégrader le collagène ce qui mènera à la dégradation de la membrane fœtale et donc la perte de son intégrité (**cf. Figure 2**) [15].

3.4 Facteurs de virulence impliqués dans les infections néonatales

3.4.1 Adhésine hypervirulente du GBS (HvgA)

La protéine HvgA est principalement retrouvée dans la souche ST17 et se répand dans la circulation sanguine ainsi que le système nerveux central. Ce facteur est impliqué dans l'infection précoce ainsi que l'infection tardive provoquée par le GBS (cf. 4.2.1 Infection précoce (EOD) ; cf. 4.2.2 Infection tardive (LOD)). En revanche, les voies d'infections ne sont pas les mêmes. Concernant l'infection précoce, cette protéine va permettre au GBS de coloniser l'épithélium vaginal ainsi que celui du cervix et d'infecter directement le nouveau-né durant l'accouchement. En ce qui concerne l'infection tardive, ce facteur peut provoquer une méningite ; principal symptôme de l'infection tardive (cf. **Figure 2**) [15].

3.5 Ribonucléase Z

La protéine ribonucléase Z qui est codée par le gène RnZ est une ribonucléase participant aux étapes essentielles du métabolisme de l'ARN à savoir sa maturation ainsi que sa dégradation (cf. **Figure 2**) [24].

3.6 Protéine RepB

La protéine RepB est une protéine initiatrice de la réplication. Elle fait partie d'un plasmide qui a été premièrement isolé chez le GBS. Ce plasmide confère une résistance aux antibiotiques et peut se transmettre entre bactéries (cf. **Figure 2**) [25].

3.7 Protéine de surface immunogène (SIP)

SIP, de son nom entier Surface Immunogenic Protein, est une protéine de surface ancrée dans la paroi du GBS permettant l'adhésion de celui-ci avec diverses structures présentes dans l'environnement externe de la bactérie. Cette protéine est très largement conservée entre les différents sérotypes (cf. 2.3 Serotypes). Cette dernière, lorsqu'elle est ciblée par le système immunitaire du corps, induit une réponse immunitaire croisée. Elle fait donc l'objet d'une cible potentielle pour le développement d'un vaccin contre le GBS (cf. **Figure 2**) [26][27].

4 Infection à GBS

Habituellement, le GBS fait partie de la flore intestinale de l'Homme à une fréquence de 15 à 30% [28]. Il est également présent dans la flore vaginale de la femme, et ce, chez 10% à 30% des femmes [1]. Cependant le GBS est responsable de sévères infections chez les nouveaux-nés après transmission de cette bactérie de la mère à l'enfant ; principal moyen de transmission. En Belgique ainsi que dans le monde, l'infection par le GBS est une cause majeure de mortalité et morbidité néonatale [29] [30].

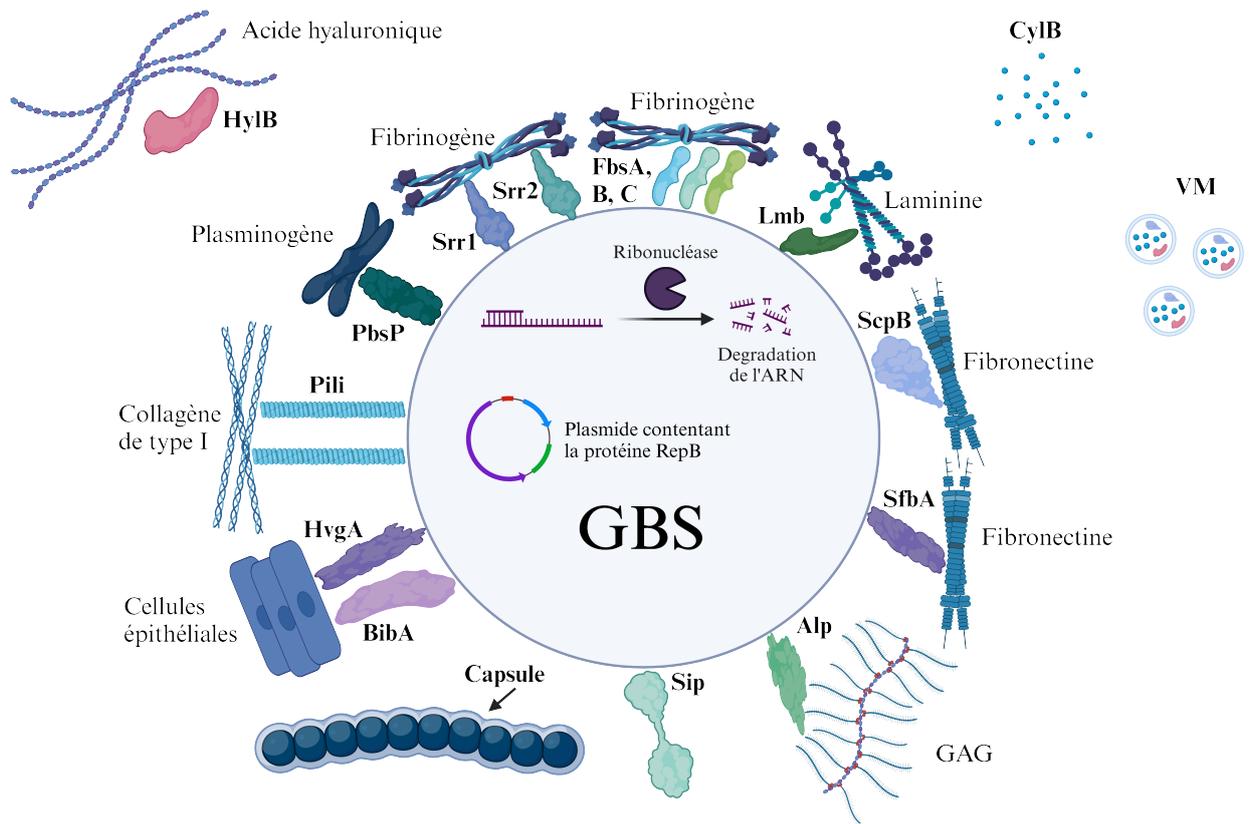


FIGURE 2 – Facteurs de virulence du GBS [31] (adapté de l'article de Liu Y et Liu J [15])

Cette infection peut également, dans une moindre mesure, se déclarer chez les adultes âgés ou ayant des pathologies sous-jacentes [32].

4.1 Portage et dépistage chez la femme enceinte

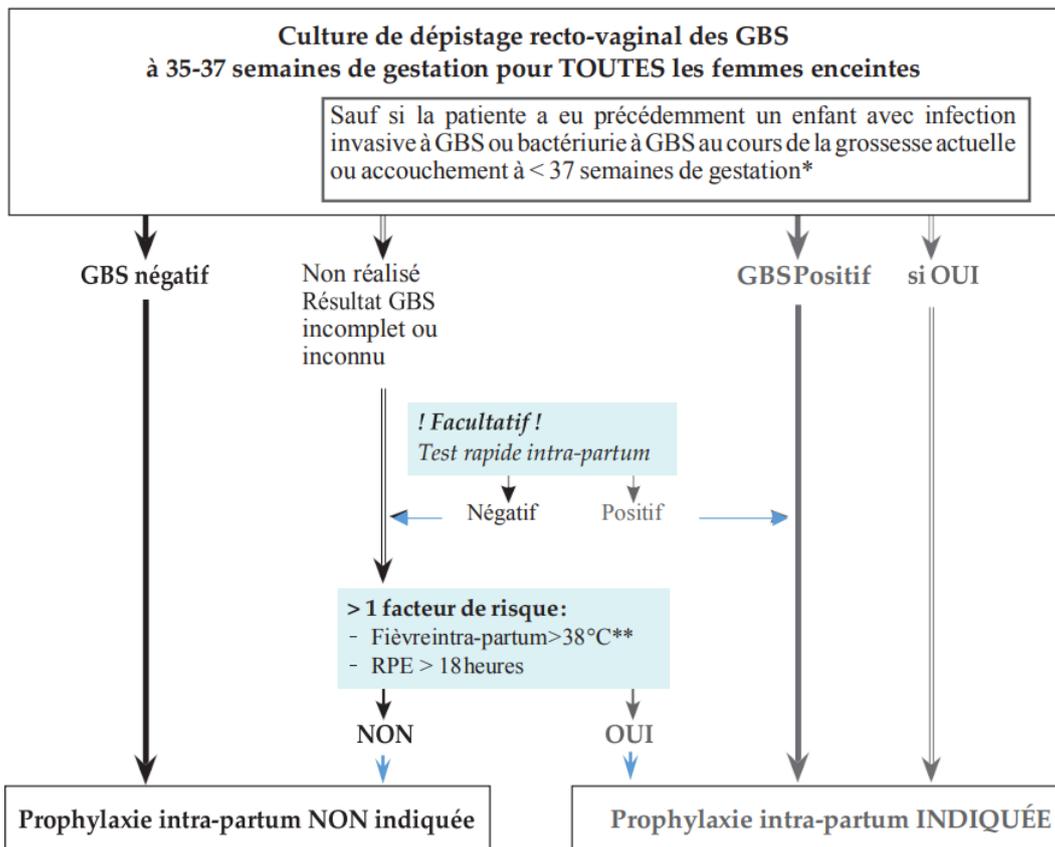
Dans 10% à 30% des cas, la femme enceinte est colonisée par le GBS mais sa présence demeure inoffensive pour sa santé. C'est lors de l'accouchement que la transmission au nouveau-né peut se produire. Plusieurs facteurs peuvent favoriser cette infection chez le nouveau-né comme un accouchement avant la 37^{ème} semaine de gestation, la rupture prolongée de la poche des eaux ainsi que l'accouchement précédent d'un enfant ayant développé une infection à GBS. C'est donc pour cela qu'un dépistage vagino-rectal est requis chez toutes les femmes enceintes afin de déterminer la présence ou l'absence de cette bactérie dans le but de l'administration ou non d'une antibioprophylaxie durant l'accouchement afin de limiter la transmission au bébé. Ce dépistage consiste à la réalisation d'un frottis vagino-rectal chez la femme enceinte entre la 35^{ème} et 37^{ème} semaine de gestation suivi de la mise en culture de ce frottis. Après obtention du résultat, plusieurs cas de figure se présentent. Si la femme enceinte n'est pas porteuse du GBS alors, l'antibioprophylaxie n'est pas recommandée. En revanche, si la femme enceinte est porteuse du GBS ou qu'elle présente plus d'un facteur de risque (fièvre intra-partum plus élevée que 38°C ou la rupture de la poche des eaux de plus de 18 heures) alors, l'antibioprophylaxie est préconisée (cf. 5 Prophylaxie et traitement) (cf. **Figure 3**). En revanche, cette colonisation de la flore vaginale est dynamique ; cela veut dire qu'elle peut être transitoire, intermittente ou chronique. Le GBS peut donc devenir transitoirement pathogène pour la femme enceinte et être responsable de plusieurs infections comme, entre autres, une infection du tractus urinaire [29].

4.2 Infection chez le nouveau-né

L'infection par le GBS chez le nouveau-né présente deux manifestations cliniques : la « Early-Onset Disease (EOD) » et la « Late-Onset Disease (LOD) ». Ceux-ci se distinguent par l'incidence, la période d'apparition des symptômes, la présentation clinique, le pronostic ainsi que le taux de mortalité et de morbidité. Malgré l'existence d'un dépistage et d'une antibioprophylaxie, la morbidité et la mortalité de ces infections restent tout de même élevées [29].

4.2.1 Infection précoce (EOD)

En Belgique, l'infection précoce représente environ 0.3 à 0.8 pour 1000 nouveaux-nés. La transmission est de type vertical lors du travail ou de l'accouchement de la femme enceinte. En effet, lorsque la mère est porteuse du GBS, le bébé sera infecté après un contact avec la flore vaginale de la mère ou via inhalation de liquide amniotique infecté.



* Si le début du travail ou la rupture des membranes amniotiques se produit avant 37 semaines de gestation et qu'il existe un risque significatif d'accouchement avant terme (selon les estimations du clinicien), un algorithme pour la prise en charge de la prophylaxie des GBS est proposé ci- après.

** Si une amniotite est suspectée, un traitement antibiotique à large spectre incluant un agent actif contre les GBS devrait remplacer la prophylaxie GBS

FIGURE 3 – Prévention des infections néonatales du GBS [29]

La plupart du temps, l'infection précoce restera asymptomatique chez le nouveau-né mais dans 2% à 4% des cas, notamment en l'absence d'une antibioprophylaxie, celle-ci évolue vers une infection sévère seulement quelques heures après la naissance. Ce type d'infection se manifeste jusqu'à 6 jours de vie du nouveau-né. Les présentations cliniques sont multiples mais le plus souvent la bactériémie évolue vers un sepsis [29]. La pneumonie est également un symptôme de cette infection [33]. La méningite peut aussi se présenter chez 10% à 15% des nouveau-nés. Concernant la mortalité, elle est estimée à moins de 10% pour les enfants nés à terme mais reste malgré tout de 20% à 40% pour les enfants prématurés [29]. Le sérotype prédominant pour une EOD est le sérotype III (cf. 2.3 Sérotypes) [13].

4.2.2 Infection tardive (LOD)

En Belgique, l'incidence de cette infection est d'environ 0.2 à 0.5 pour 1000 nouveaux-nés. La transmission est de type horizontal. Cela signifie que l'infection se produira après l'accouchement et sera due à un contact entre la mère, le personnel soignant ou toute autre personne étant colonisée par le GBS. Cette infection se manifeste entre le 7^{ème} jour et le 90^{ème} jour de vie. Les présentations cliniques sont sous forme de fièvre ainsi qu'une bactériémie. Dans 35% des cas, cette infection se présentera sous forme de méningite pouvant laisser des séquelles neurosensorielles ou neurologiques. En revanche, la mortalité est plus faible que l'EOD [29]. Concernant l'infection tardive, le sérotype III est prédominant dans ce type d'infection (cf. 2.3 Sérotypes) [13].

4.3 Infection chez les adultes

L'infection par le GBS peut également se manifester chez les adultes. En Belgique, les manifestations cliniques sont diverses. La plus fréquente est la bactériémie suivie de l'infection de la peau et des tissus mous ainsi que des infections d'origine ostéo-articulaire. En général, l'infection se présente chez les personnes âgées de plus de 70 ans ainsi que chez les personnes possédant une comorbidité à savoir un diabète, une immunosuppression ou une insuffisance rénale. Le sérotype V est prédominant chez les adultes, suivi de près par le sérotype Ia et le sérotype III (cf. 2.3 Sérotypes) [13][32].

5 Prophylaxie et traitement

Lorsque la présence du GBS dans la flore vagino-rectale de la femme enceinte est mise en évidence, une antibioprophylaxie de prévention est administrée à cette femme enceinte. Elle consiste en l'administration intraveineuse de pénicilline (autrement nommée benzylpénicilline) minimum 4 heures avant l'accouchement. L'ampicilline peut également être utilisée en prévention même si la pénicilline est à privilégier en raison de son spectre d'action plus étroit. Si le délai de 4 heures ne peut pas être respecté, les antibiotiques doivent tout de même être administrés car ceux-ci atteignent le sang foetal en moins de 5 minutes. Certaines femmes enceintes sont allergiques à la pénicilline, elles ne peuvent donc pas

recevoir cet antibiotique. L'alternative est l'administration de céfazoline, de clindamycine ou d'érythromycine. Si malheureusement, la souche infectant la femme enceinte présente une réaction croisée à la céfazoline avec la pénicilline ou est résistante à l'érythromycine/clindamycine, alors la vancomycine reste l'unique option. Cette antibioprofylaxie a permis de diminuer la transmission verticale du GBS et in fine, le taux d'infection précoce (cf. 4.2.1 Infection précoce (EOD)) chez les nouveau-nés. En effet, en administrant ces antibiotiques, 70% à 80% des infections précoces sont évitées [29]. En revanche, cette prophylaxie n'a pas permis de diminuer le taux d'infection tardive (cf. 4.2.2 Infection tardive (LOD)) [34]. C'est ce que représente la **figure 4** où on peut observer une diminution de l'incidence de l'infection précoce mais pas de l'infection tardive et ce après les années 1990 où l'antibioprofylaxie a commencé à être utilisée [35]. Concernant le traitement de l'infection chez le nouveau-né, les mêmes antibiotiques sont utilisés que pour la femme enceinte [36]. En effet, l'ampicilline en combinaison avec un aminoglycoside comme la gentamicine est le traitement de choix concernant l'infection précoce. Concernant l'infection tardive, la vancomycine est utilisée en cas de méningite [37].

6 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'utilisation abusive ou inadaptée des antibiotiques peut mener à des résistances aux antibiotiques. C'est le cas pour les mécanismes de résistance décrit ci-dessous.

6.1 Résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Depuis ces deux dernières décennies, une augmentation de résistance pour certains antibiotiques comme la clindamycine et l'érythromycine a été observée [36]. Ces deux antibiotiques font, respectivement, partie de la classe des lincosamides et des macrolides. Il existe une résistance croisée entre ces deux classes d'antibiotiques avec la classe des streptogramines. En réalité, ces antibiotiques possèdent un mode d'action similaire ce qui fait que, lorsqu'une résistance à un de ces antibiotiques se développe, cela permet une résistance à un autre de ces antibiotiques; ce phénomène se nomme la résistance croisée. Cette résistance croisée confère un phénotype particulier nommé MLS qui peut soit être inductible soit constitutif. Le phénotype constitutif (cMLS) signifie que la résistance est acquise par la présence de gènes de résistance dans le génome au contraire du phénotype inductible (iMLS) qui signifie que la résistance est induite par la résistance d'un autre antibiotique. Il existe également deux autres types de phénotypes de résistance : le phénotype M et le phénotype L. Le premier confère une résistance uniquement aux macrolides tandis que le second confère une résistance uniquement aux lincosamides. Ces gènes impliqués dans le mécanisme de résistance sont les suivants. Les gènes *MefA* et *MreA* permettent l'efflux du médicament en dehors de la bactérie l'empêchant d'agir sur son site d'action [38]. Les gènes *ErmB*, *ErmTr* ainsi que *ErmT* sont les gènes de résistance les plus répandus. Il existe aussi le gène *ErmC*.

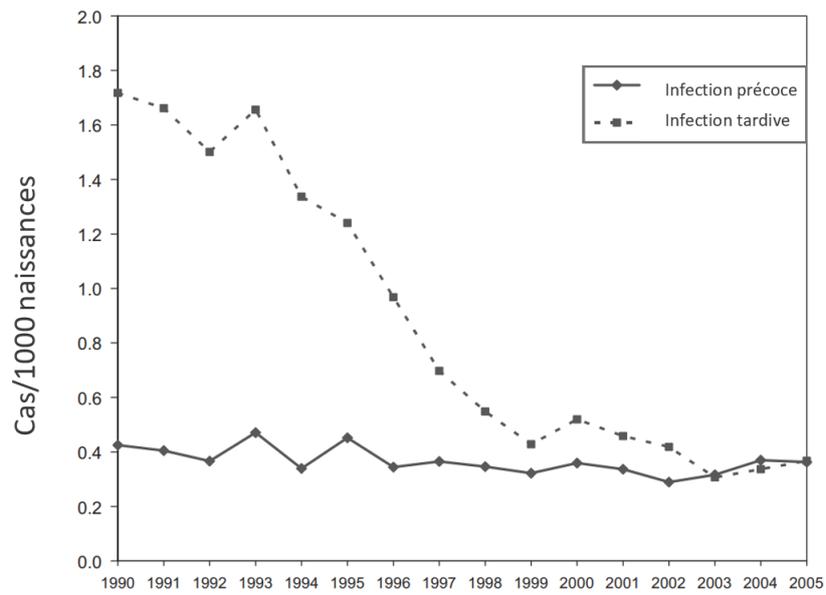


FIGURE 4 – Incidence de l’infection précoce et de l’infection tardive aux Etats-Unis entre 1990 et 2005 [35]

Ces gènes empêchent la fixation de l'antibiotique sur son site d'action par modification de la cible ; ce site étant le ribosome. *LsaC* et *LsaE*, eux, se fixent sur le ribosome ce qui provoque le détachement des antibiotiques de celui-ci. Finalement, *LnuB* et *LnuC* permettent la modification enzymatique de la configuration stérique des antibiotiques les empêchant de se fixer sur la cible (cf. **Figure 5** ; cf. **Tableau 1**) [39].

6.2 Résistance aux β -lactames

Dans la classe des β -lactames se trouve la pénicilline G, aussi nommée la benzypénicilline, qui est l'antibiotique le plus utilisé en prophylaxie et pour traiter une infection induite par le GBS. Les résistances à cet antibiotique restent relativement rares. Le mécanisme de résistance s'exerce via des mutations dans les enzymes nommées « Penicillin-binding protein (PBP) ». Ces enzymes sont nécessaires à la synthèse des peptidoglycane constituant la paroi des bactéries. Les mutations engendrent une modification structurale des PBP et *in fine* diminuent l'efficacité de la liaison entre la pénicilline et ces PBP ; la pénicilline ne peut donc plus exercer son activité bactéricide. Il existe plusieurs enzymes dans la classe des PBP (PBP1a, PBP2a, PBP2b et PBP2x) dont PBP2x est l'enzyme mutée la plus retrouvée chez les GBS (cf. **Figure 5** ; cf. **Tableau 1**) [39].

6.3 Résistance aux tétracyclines

La tétracycline est un antibiotique de la classe des tétracyclines qui est utilisé pour traiter les bactéries Gram négatif ainsi que les bactéries Gram positif. Cet antibiotique possède un champ d'action assez large. Par conséquent, il a été très largement utilisé menant donc à l'émergence de mécanismes de résistance. Environ 80% des GBS sont résistants à la tétracycline. Ces résistances peuvent être mises en évidence par la présence de gènes dans le génome des bactéries tels que les gènes *TetK* et *TetL* qui sont impliqués dans l'efflux de l'antibiotique hors de la bactérie. Ce mécanisme empêche ainsi la liaison de l'antibiotique à sa cible ; cette cible étant le ribosome. Les gènes *TetM* et *TetO*, eux, se fixent sur le ribosome ce qui provoque le détachement des antibiotiques de celui-ci (cf. **Figure 5** ; cf. **Tableau 1**) [39].

6.4 Résistance aux fluoroquinolones

Les antibiotiques, faisant partie de la classe des fluoroquinolones comme la lévofloxacine ainsi que la moxifloxacine, sont parfois utilisés pour traiter une infection au GBS. Tout comme la tétracycline (cf. 6.3 Résistance aux tétracyclines), les antibiotiques de cette classe traitent aussi bien les infections bactériennes à Gram positif que Gram négatif. Les résistances pour ces antibiotiques augmentent à travers le monde mais restent relativement faibles en Belgique avec un taux de résistance de 3.32%. Les gènes impliqués dans la résistance à ces antibiotiques se nomment *GyrA* et *ParC*.

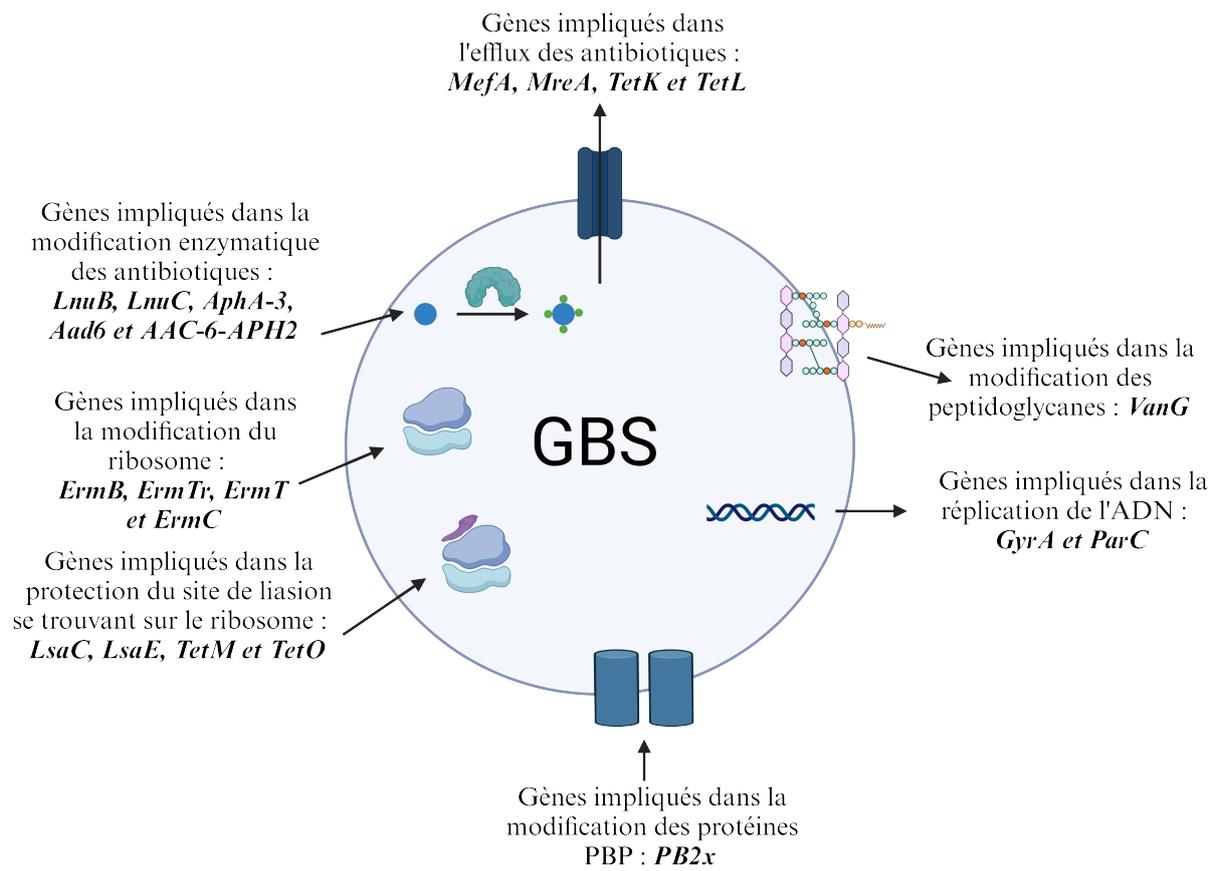


FIGURE 5 – Gènes de résistance [31] (adapté de l'article de Hayes K et al. [39])

Des mutations dans ces derniers affectent le site de liaison des antibiotiques et donc diminuent leur efficacité, n'étant plus capables d'inhiber la réplication de l'ADN (**cf. Figure 5 ; cf. Tableau 1**) [39].

6.5 Résistance aux glycopeptides

Dans la classe des glycopeptides se trouve la vancomycine. Le taux de résistance à cet antibiotique est assez faible étant donné qu'uniquement deux souches de GBS ont été renseignées comme résistantes à la vancomycine. La résistance est principalement liée à la présence du gène *VanG* qui modifie la cible du médicament. Ces cibles sont les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries. Ce mécanisme diminue donc l'affinité de la cible pour l'antibiotique (**cf. Figure 5 ; cf. Tableau 1**) [39].

6.6 Résistance aux aminoglycosides

La classe des aminoglycosides comprend notamment la gentamicine. Cet antibiotique n'est utilisé qu'en combinaison avec la pénicilline lors d'endocardites à streptocoques [40]. Le taux de résistance à la gentamicine, évalué à environ 8.8% en France, reste assez faible [39]. Les gènes conférant une résistance à cet antibiotique sont *Aph-A3* ainsi que *Aad-6*. Une enzyme codée par ces gènes va modifier les aminoglycosides qui seront donc empêchés d'agir sur leur cible ; cette cible étant le ribosome [41][42]. Un autre gène également impliqué dans la résistance aux aminoglycosides se nomme le gène *AAC-6-APH2*. Une enzyme bifonctionnelle codée par ce gène va permettre la modification enzymatique des antibiotiques. Ce mécanisme de résistance est la plupart du temps observé pour les souches de GBS possédant une résistance accrue envers la gentamicine [43]. Ces souches sont rarement rencontrées en Europe (**cf. Figure 5 ; cf. Tableau 1**) [44].

7 Immunoprophylaxie

Malgré l'existence d'une antibioprofylaxie de prévention, l'infection à GBS demeure toujours présente chez les nouveaux-nés. L'utilisation des antibiotiques favorise l'émergence des résistances et l'utilisation d'antibiotiques chez le nouveau-né perturbe sa flore intestinale et *in fine*, cela favorise l'émergence d'autres infections chez celui-ci. Pour ces raisons, l'existence d'un vaccin contre cette bactérie serait la solution idéale. En effet, les anticorps produits chez la femme enceinte peuvent traverser la barrière placentaire et permettent donc une couverture de l'enfant contre les pathogènes. A ce jour, aucun vaccin n'est disponible pour prévenir la colonisation et l'infection à GBS. En revanche, plusieurs vaccins sont en cours d'essais cliniques [45][46].

Parmi les plus prometteurs, un vaccin développé par la firme Minervax, cible quatre protéines de la famille des Alp (cf. 3.1.2 Protéines alfa-like (Alp)) à savoir Alp1, Alp2/3, AlphaC et Rib. Ces protéines possèdent un domaine N-terminal ; ces quatre domaines étant retrouvés sur 99.3% des GBS.

Classe des antibiotiques et gènes de résistance	Mécanisme d'action
Macrolides	
<i>MefA</i> et <i>MreA</i>	Efflux du médicament hors de la bactérie.
<i>ErmB</i> , <i>ErmTr</i> , <i>ErmT</i> et <i>ErmC</i>	Empêchent la fixation de l'antibiotique sur le ribosome.
Lincosamides	
<i>LsaC</i> et <i>LsaE</i>	Fixation sur le ribosome provoquant le détachement des antibiotiques de celui-ci.
<i>LnuB</i> et <i>LnuC</i>	Modification enzymatique des antibiotiques.
β-lactames	
<i>PBP2x</i>	Modification de la configuration stérique de la cible diminuant l'efficacité de la liaison de cet antibiotique à sa cible.
Tétracyclines	
<i>TetK</i> et <i>TetL</i>	Efflux de l'antibiotique hors de la bactérie.
<i>TetM</i> , <i>TetO</i>	Fixation sur le ribosome provoquant le détachement des antibiotiques de celui-ci.
Fluoroquinolones	
<i>GyrA</i> et <i>ParC</i>	Affectent le site de liaison des antibiotiques et donc diminuent leur efficacité n'étant plus capable d'inhiber la réplication de l'ADN.
Glycopeptides	
<i>VanG</i>	Modification de la cible diminuant l'efficacité de la liaison de cet antibiotique à cette cible.
Aminoglycosides	
<i>Aph-A3</i> , <i>Aad-6</i> et <i>AAC-6-APH2</i>	Modification enzymatique des antibiotiques.

TABLE 1 – Mécanismes de résistances [36][39][41][42][43]

Ce vaccin est actuellement en test clinique de phase 2 chez la femme enceinte. En effet, la phase 1 a montré une efficacité pour la production d'anticorps contre le GBS. La phase 3 est déjà annoncée par la firme [45][47].

Un autre vaccin est développé par la firme Pfizer et cible cette fois ci les CPS (cf. 2.3 Sérotypes). En effet, le vaccin cible les sérotypes les plus fréquents mondialement à savoir les sérotypes Ia, Ib et II-V. Ce vaccin est également en test clinique de phase 2 chez la femme enceinte et a également montré une efficacité pour la production d'anticorps contre le GBS ainsi qu'une protection chez le nouveau-né [46].

8 Outils de laboratoire

8.1 Outils de diagnostic

8.1.1 Culture bactérienne

Au laboratoire de microbiologie, la culture bactérienne est la technique de première ligne quand il s'agit de détecter un GBS. Actuellement, différents milieux de cultures sont disponibles avec des propriétés qui leurs sont propres.

— Gélose au sang

La gélose au sang est un milieu nutritif permettant la croissance et l'isolement de microorganismes exigeants. Ce qui va permettre de différencier un microorganisme par rapport à un autre est la morphologie que possèdent ceux-ci sur ce type de milieu mais également le type hémolyse que présente ce microorganisme sur cette gélose. Concernant le GBS, les colonies apparaissent de petites tailles ainsi que de couleur blanche-grise [48]. Sur la gélose au sang, les colonies de GBS apparaissent environ en 24 heures à une température de 35°C. A partir de la gélose au sang, des antibiotiques peuvent être ajoutés permettant de la rendre sélective en inhibant la croissance des bactéries gram négatives. Ce type de milieu se nomme la gélose CNA (Colistine et Acide Nalidixique) qui, comme son nom l'indique, est composée de colistine ainsi que d'acide nalidixique permettant de rendre le milieu sélectif. Cette gélose est d'ailleurs utilisée au quotidien dans le laboratoire de microbiologie clinique [49].

— Milieu granada

Le milieu granada permet une identification du *Streptococcus agalactiae* avec une spécificité de 100% [50]. Concernant la détection et l'identification, il s'agit du milieu de culture le plus adapté qui se base sur la capacité unique du GBS à produire un pigment orangé, le granadaene, dans des conditions anaérobies mais ce uniquement pour les GBS hémolytiques [51][52][53]. En effet, l'expression de ce pigment est toujours associée à l'expression de la β -hémolysine étant donné que

les gènes de ceux-ci sont présents sur le même locus. En revanche, ceux présentant une hémolyse γ apparaîtront gris-bleu sur la gélose tout comme les entérocoques et les streptocoques ne faisant pas partie du groupe B de Lancefield. Dans ce cas, une étape d'identification supplémentaire au MALDI-TOF MS est nécessaire (cf. 8.1.2 MALDI-TOF MS) (cf. **Figure 6**) [52].

— Milieu StrepBSelect

Le milieu StrepBSelect est un milieu chromogène sélectif pour le GBS. En effet, grâce à la composition de celui-ci, les colonies de cette bactérie apparaîtront bleues sur ce type de gélose (cf. **Figure 7**) [50]. En revanche, ce milieu n'est pas tout à fait spécifique. En effet, des colonies bleues n'étant pas des GBS peuvent apparaître ainsi que des colonies rose-mauve correspondantes à des entérocoques et des lactobacilles [50][54].

— Bouillon de Lim

Il existe également un milieu de croissance liquide nommé Lim permettant l'enrichissement sélectif des GBS. L'identification est réalisée à la suite d'une sous culture sur gélose à partir de ce milieu et ceci préférentiellement sur un milieu sélectif comme la gélose Granada (cf. 8.1.1 Culture : Milieu granada) ou un milieu chromogène comme le milieu StrepBSelect (cf. 8.1.1 Culture : Milieu StrepBSelect). En effet, divers autres pathogènes cocci gram positifs peuvent croître dans ce milieu [50].

8.1.2 MALDI-TOF MS

Au laboratoire de microbiologie, un spectromètre de masse MALDI-TOF est employé pour confirmer l'identification d'un microorganisme. Le MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) permet d'identifier les bactéries, les champignons ainsi que les levures [55]. Cette méthode d'identification se réalise à la suite d'une culture bactérienne. Le principe du MALDI-TOF MS se base sur le principe de la spectrométrie de masse. Après dépôt du microorganisme sur une cible adaptée et ajout d'une matrice organique, le séchage de la matrice permet la cristallisation de celle-ci et in fine, celle du microorganisme. Un rayon laser est appliqué sur ce microorganisme, ce qui provoque la désorption et l'ionisation de celui-ci. Ensuite, les ions produits sont accélérés et détectés dans le tube de vol suivant leur rapport masse sur charge (m/z). Ce rapport est déterminé par le temps mis par les ions pour traverser le tube de vol. Ceci génère un spectre de masse caractéristique de l'échantillon qui est ensuite comparé à des spectres de références se trouvant dans une base de données [56]. A cette identification est couplée un score qui plus il sera élevé, meilleure sera l'identification. En effet, en dessous de 1.7, l'identification ne peut pas être considérée comme fiable. Entre 1.7 et 1.99, l'identification du genre est fiable mais pas l'identification de l'espèce. Au-dessus de 2, l'identification du genre et de l'espèce est fiable [21] L'identification d'un microorganisme peut aller jusqu'à l'espèce (cf. **Figure 8**) [56].

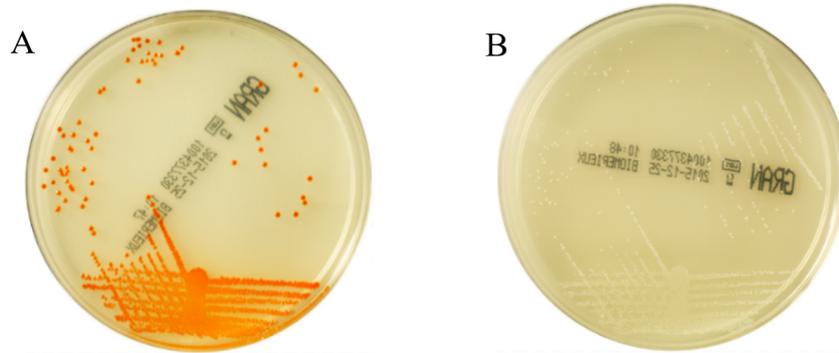


FIGURE 6 – Colonies du GBS sur gélose granada (A. Colonies orangées et B. Colonies bleu-gris [57])



FIGURE 7 – Colonies du GBS sur gélose StrepBSelect (Colonies bleues) [54]

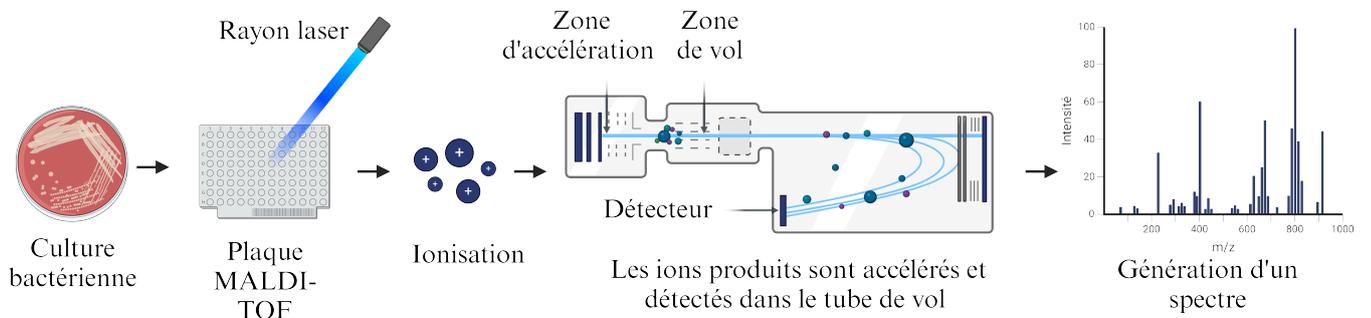


FIGURE 8 – Flux de travail lors de l'utilisation du MALDI-TOF [31] (adapté de Singhal et al. [56])

8.2 Outils de recherche approfondis

8.2.1 Biologie moléculaire

8.2.1.1 Panel PCR méningite/encéphalite Le panel méningite/encéphalite est une méthode de biologie moléculaire qui permet l'identification de l'agent étiologique responsable des infections syndromiques de l'encéphale et des méninges. Ce panel de PCR miniaturisé et automatisé permet en une seule étape de rechercher la présence de 14 microorganismes, dont le GBS fait partie, grâce à la technique de PCR en temps réel [58].

8.2.1.2 Séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS) Le séquençage à haut débit (NGS), également nommé le séquençage de seconde génération, permet de séquencer le génome entier plus rapidement en diminuant les coûts par rapport au séquençage de première génération étant plus fastidieux et plus coûteux. Le NGS a donc permis de réaliser des recherches sur le génome entier à l'échelle de la population [59]. Le NGS comprend deux techniques de séquençage à savoir le séquençage par synthèse ainsi que le séquençage par hybridation [60]. Dans le cadre de ce travail, c'est le séquençage par synthèse qui sera utilisé. Le NGS est composé de 4 étapes majeures (**cf. Figure 14**) [61] :

1. Préparation des bibliothèques

Les bibliothèques sont préparées en fragmentant aléatoirement le génome à l'aide d'une enzyme nommée la transposase [62]. Cette dernière va également ajouter des adaptateurs de chaque côté de ces fragments qui seront nécessaires à l'amplification par PCR ; étape suivant la fragmentation de l'ADN. Lors de la deuxième et dernière étape de la préparation des bibliothèques à savoir l'étape de PCR, plusieurs adaptateurs seront ajoutés :

- (a) P5 et P7 qui permettent la fixation des fragments d'ADN au support nommé « flow cell ».
- (b) Index 1 et index 2 qui permettent d'identifier les fragments lors de l'étape de reconstitution du génome.
- (c) Read 1 et Read 2 correspondants aux amorces nécessaires pour la réalisation du séquençage.

2. Génération clonale des fragments d'ADN

La génération clonale des fragments d'ADN se réalise grâce à la méthode d'amplification en pont (ou « bridge amplification »). En effet, cette technique consiste en l'hybridation des adaptateurs, ajoutés à l'étape précédente, avec les oligonucléotides complémentaires présents sur la « flow cell ». Ensuite la séquence est amplifiée. Les deux séquences, celle nouvellement synthétisée et celle ayant servi de modèle, se détachent l'une de l'autre. Un nouveau cycle peut alors commencer. L'amplification en pont est donc réalisée autant de fois que nécessaire pour obtenir des millions de fragments d'ADN nommés « cluster ».

3. Séquençage par synthèse (SBS)

Le SBS nécessite des nucléotides couplés à des fluorochromes différents; un pour chaque nucléotide existant. La séquence est synthétisée par l'ajout d'un nucléotide qui émet une lumière fluorescente d'une certaine longueur d'onde et d'une certaine intensité permettant l'identification de la base ajoutée. Ce cycle est répété autant de fois que la séquence possède de nucléotides. Une image digitale est prise, convertie en données, qui seront exportées dans un fichier FastQ.

4. Analyse de données

Les données brutes issues du NGS sont placées dans un fichier FastQ qui contient les séquences ainsi que le score de qualité [63]. Ce score représente la probabilité qu'une base soit incorrectement identifiée et donc renseigne sur la probabilité d'erreur de ce séquençage [64]. En ce qui concerne la reconstitution du génome, deux techniques différentes sont envisageables :

- (a) Ces séquences sont alignées à un génome de référence permettant de reconstituer le génome entier.
- (b) Le génome est assemblé par la synthèse de novo. Cette technique consiste à aligner les séquences en faisant correspondre les parties qui se chevauchent afin de reconstruire le génome.

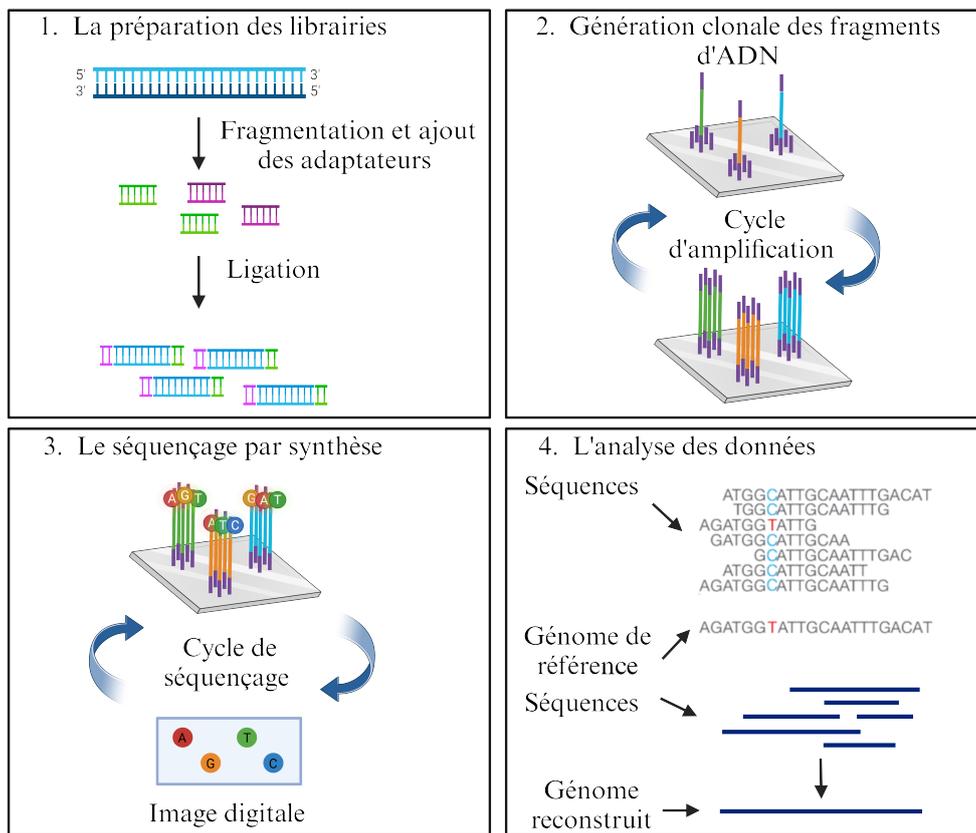


FIGURE 9 – Les étapes du NGS [31] (adapté d'Illumina [61])

II Objectif et stratégie expérimentale

1 Objectif

Ce travail de fin d'étude a été réalisé au Centre National de Référence pour le *Streptococcus agalactiae* (CNR GBS) situé au sein du laboratoire de Microbiologie clinique au CHU de Liège. Une des missions principales de ce centre de référence réside dans le suivi épidémiologique des caractéristiques de souches de GBS provoquant des infections sévères et plus particulièrement des infections sévères périnatales. Un autre rôle du CNR réside dans l'activité de conseil pour les laboratoires agréés concernant les nouvelles technologies disponibles pour la détection du GBS, l'émergence de phénomènes de résistance aux antibiotiques ainsi que sur les recommandations en matière d'antibioprophylaxie [13].

L'objectif de ce travail est le suivi épidémiologique des souches de GBS de colonisation, isolées de frottis vagino-rectaux ou vaginaux pendant la grossesse. De précédentes études du même type ont été réalisées au Centre National de Référence GBS en 2013 et 2018. Ces données permettront d'actualiser les informations disponibles en termes d'épidémiologie des souches de GBS de colonisation circulant chez la femme enceinte en Belgique en vue, entre autres, du développement d'un vaccin contre le GBS.

2 Stratégie expérimentale

Afin de réaliser cet objectif, les souches réceptionnées sont mises en culture sur une gélose au sang et identifiées par le MALDI-TOF MS de façon à s'assurer que ces souches sont effectivement des GBS. L'extraction de l'ADN, avec une colonne à membrane de silice, est l'étape suivante qui permettra d'obtenir l'ADN nécessaire au séquençage du génome de ces souches. Pour réaliser ce séquençage la technique de « Whole Genome Sequencing » (WGS) sur le NovaSeq 6000 de chez illumina sera utilisée, couplée au logiciel WGS typer pour analyser les données. Ceci permettra de caractériser les souches de GBS collectées, notamment de déterminer les sérotypes capsulaires circulant en Belgique, de spécifier le sequence type (ST), d'établir l'expression des protéines de pili, de définir la présence de facteurs de virulence ainsi que le profil de résistance aux antibiotiques. La détermination phénotypique de la sensibilité des souches de GBS à différents antibiotiques sera réalisée par la méthode de diffusion en disque sur gélose ainsi que par la méthode de microdilution Sensititre ce qui permettra d'observer l'évolution de cette sensibilité au cours du temps en Belgique.

III Matériels et méthodes

1 Collection des souches

Le Centre National de Référence *Streptococcus agalactiae* (CNR GBS) a préalablement contacté des laboratoires se trouvant dans toute la Belgique afin de les inviter à envoyer 5 souches de GBS provenant d'une culture de dépistage prénatal sur frottis vagino-rectal. Pour ce faire, un formulaire en français ou en néerlandais (cf. Annexes) ainsi que 5 écouvillons de transport ont été envoyés aux laboratoires participants. Tous les échantillons ont été réceptionnés, encodés et mis en souchothèque au CNR GBS. Un numéro pour chaque souche allant de c23 001 à c23 310 a été attribué.

2 Mise en culture, identification par MALDI-TOF MS et souchothèque

Après la réception et la mise en culture des souches de l'étude, celles-ci ont été stockées dans du lait écrémé à -80°C . Ce processus permet de conserver la bactérie dans des conditions optimales. Une identification par MALDI-TOF MS a également été réalisée afin de s'assurer que la souche présente était bien un GBS. Dans le cas où la souche était contaminée, un ré-isolément sur un milieu spécifique tel que le milieu Granada a été réalisé. Les souches contaminées ont été écartées.

2.1 Matériel

2.1.1 Mise en culture et identification par MALDI-TOF MS

- Bruker, MALDI BiotyperTMMBTTM smart
- Memmert INE600, Incubateur à 35°C contenant 5% à 7% de CO_2
- Bruker, MSP 96 target polished steel BS, Plaque MALDI-TOF
- COPAN Diagnostics Inc., TransystemTM 108C, Ecouvillon de microbiologie (réf : 108C.USE)
- BD, Gélose au sang Columbia avec 5% de sang de mouton (réf : 05062)
- VWR, Inoculateur rigide stériles calibrées à 1 μl
- Merck Millipore, Acide formique 98%-100%, PM : 46.03 g/mol (réf : 64-18-6)
- Bruker, Matrice pour MALDI-TOF-MS HCCA portioned (réf : 8255344)
- Merck, Sigma-Aldrich, Solvant standard Bruker pour MALDI, 50% ACN + 47.5% H_2O + 2.5% TFA (réf : 76-05-1)
- Merck, Sigma-Aldrich, Eau pour HPLC, PM : 18.02 g/mol (réf : 7732-18-5)

- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (0.5 μ l - 10 μ l)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette (20 μ l)

2.1.2 Souchothèque

- EppendorfTM, Congélateur à -80°C CryoCubeTM F440n avec enregistreur et système de secours LN2
- ThermoFisher SCIENTIFIC, CryoBoxesTM, 132 x 132 x 52 mm
- ThermoFisher SCIENTIFIC, NuncTM Biobanking and Cell Cultures Cryogenic Tubes de 1 ml
- LABSOLUTE[®], Pipettes Pasteur graduée en polyéthylène non stérile de 1 ml
- APTACA, Ecouvillon en coton stérile avec un bâtonnet en bois de 150 mm
- Lait écrémé

2.2 Méthode

2.2.1 Mise en culture et identification par MALDI-TOF MS

Afin de réaliser la mise en culture bactérienne, la méthode des stries est utilisée et représentée dans la **figure 10**. Avec l'écouvillon se trouvant dans le milieu gélosé, la gélose au sang estensemencée en réalisant une masse sur $\frac{1}{3}$ de la gélose. Cette gélose est ensuite tournée d' $\frac{1}{4}$ de tour et avec un inoculateur, 3-4 stries partant de cette masse sont réalisées. La gélose est à nouveau tournée d' $\frac{1}{4}$ de tour et 3-4 stries, partant des stries précédentes, sont à nouveau réalisées. La manipulation est réalisée une dernière fois. Ensuite, la gélose est incubée pendant environ 24 heures à 35°C.

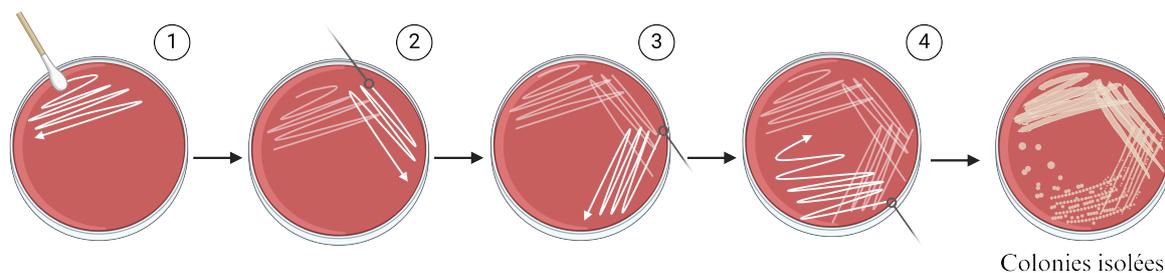


FIGURE 10 – Méthode des stries [21][31]

Ensuite, la préparation de la plaque MALDI-TOF MS est réalisée et expliquée par la **figure 11**. A partir de la culture bactérienne fraîche de 24 heures et à l'aide d'un tips, une colonie de la gélose est prélevée ainsi qu'étalée sur la plaque MALDI-TOF. Ensuite, 1 μ l d'acide formique est ajouté sur le spot où la colonie vient d'être étalée. Après, 1 μ l de matrice est ajouté sur l'acide formique séché. Une fois la matrice séchée, la plaque MALDI-TOF MS peut être traitée dans l'appareil MALDI-TOF MS.

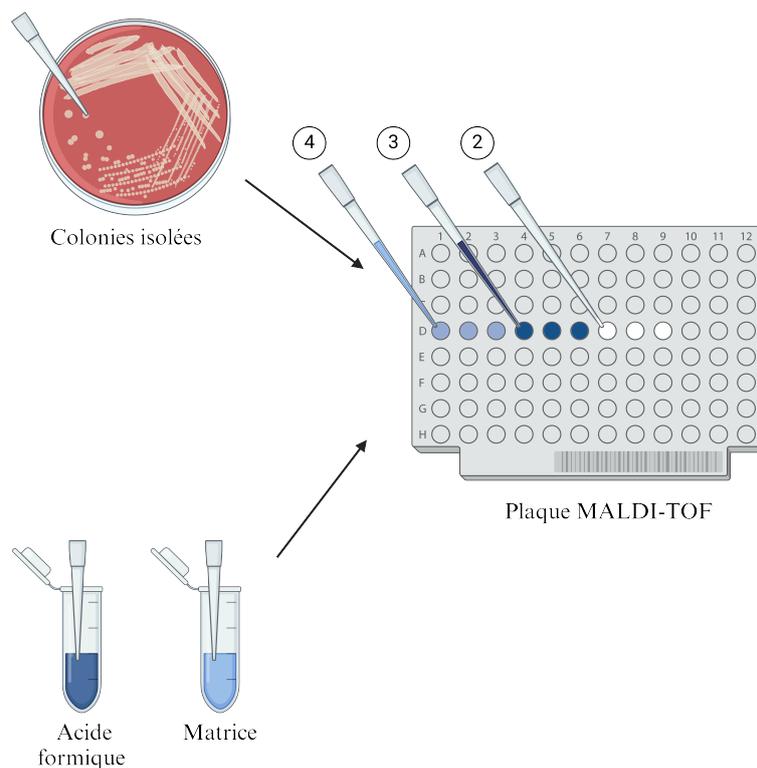


FIGURE 11 – Préparation de la plaque MALDI-TOF [31] (adapté de l'article de Suarez et al. [65])

2.2.1.1 Interprétation des résultats Un score est obtenu pour chaque identification. Si celui-ci est supérieur ou égal à 2, l'identification est fiable au genre et à l'espèce. Si le score est compris entre 1.7 et 1.99 inclus alors il faut que les 3 premiers résultats soient identiques au niveau de l'espèce pour accepter l'identification. Si le score est inférieur à 1.7, l'identification n'est pas fiable.

2.2.2 Souchothèque

Afin de réaliser la souchothèque, 0.5 ml de lait écrémé sont ajoutés dans un cryotube de conservation avec une pipette Pasteur en plastique. Les colonies ainsi que la masse se trouvant sur la gélose sont prélevées avec un écouvillon en coton et mélangées avec le lait dans le cryotube. Le cryotube est ensuite rangé dans sa boîte et conservé dans le congélateur à -80°C .

3 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée afin de procéder au NGS.

3.1 Matériel

- IKA[®], Agitateur-secoueurs, Vortex 2
- eppendorf, Centrifuge 5415D Digital Centrifuge
- StarLab, Dry Bath system (Dual block)

- MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin[®] Blood QuickPure (réf : 740569.250)
 - Colonne avec filtre en silice
 - Tube collecteur
 - Tampon de lyse BQ1, Guanidine hydrochloride 50% - 66%
 - Tampon de lavage BQ2
 - Tampon d'élution, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5
 - Protéinase K
 - Tampon pour la protéinase K
- OMNI International, Tube avec billes de verres (2 ml - 0.5 mm)
- SARSTEDT, Micro Tube PP de 2 ml
- VWR, Inoculateur rigide stériles calibrées à 1 µl
- Promega, Solution de lyse cellulaire (réf : A7933)
- Merck, Sigma-Aldrich, Ethanol pour biologie moléculaire (réf : 64-17-5)
- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (10 µl - 100 µl)
- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (20 µl - 200 µl)
- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (100 µl - 1000 µl)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette (20 µl)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette (20/250 µl)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette Tips (1000 µl)

3.2 Méthode

L'extraction de l'ADN se réalise à partir d'une culture fraîche de 24 heures (cf. 2.1.1 Mise en culture et identification MALDI-TOF MS ; cf. 2.2.1 Mise en culture et identification MALDI-TOF MS). Dans un tube de 2 ml contenant des billes de verres, 350 µl de tampon de lyse sont ajoutés ainsi que 10 µl à 20 µl de la culture avec un inoculateur. Ensuite, 5 cycles comprenant un passage au vortex à 1250 rpm pendant 1 min, puis dans un bloc réfrigérant (-1°C à -20°C) pendant 1 min, puis au bain-marie à 70°C pendant 1 minute sont réalisés. 200 µl du lysat, obtenu après les 5 cycles, ainsi que 200 µl de tampon de lyse BQ1 et 25 µl de protéinase K sont ajoutés dans un tube de 2 ml. Ce mélange est homogénéisé au vortex à 1250 rpm pendant 15 secondes. Ce dernier est incubé au bain-marie à 70°C pendant 15 minutes. Le tampon d'élution est également incubé au bain marie à 70°C jusqu'à utilisation de celui-ci. Une fois les 15 minutes écoulées, 200 µl d'éthanol sont ajouté au lysat obtenu. La solution est passée au vortex à 1250 rpm pendant 15 secondes puis à la centrifugation short-spin à 11,000 g pendant 2 minutes. Le surnageant obtenu après centrifugation (environ 650 µl) est récupéré et ajouté dans la colonne chromatographique avec membrane de silice. Cette colonne ainsi que son tube collecteur sont centrifugés à 11,000 g pendant 1 min. Après centrifugation, le tube collecteur est

vidé et 350 μl de Buffer BQ2 sont ajoutés dans la colonne puis centrifugés à 11,000 g pendant 3 min. Après centrifugation, le tube collecteur est de nouveau vidé et 200 μl de Buffer BQ2 sont ajoutés dans la colonne puis centrifugés à 11,000 g pendant 1 min. Après centrifugation, le tube collecteur est de nouveau vidé et centrifugé avec la colonne à 11,000 g pendant 3 min sans l'ajout de tampon de lavage. Concernant l'élution de l'ADN, le tube collecteur est changé et 50 μl de tampon d'élution préchauffé à 70°C sont ajoutés dans la colonne. Cette dernière est laissée 5 min à température ambiante puis centrifugée à 11,000 g pendant une minute afin d'éluer l'ADN. Celui-ci est ensuite conservé à -80°C.

4 Dosage de l'ADN au Nanodrop

4.1 Matériel

- Nanodrop, spectromètre ND-1000
- Promega, Eau Nuclease-Free (réf : P119C)
- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (0.1 μl - 2 μl)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette (20 μl)

4.2 Méthode

Le Nanodrop est un spectrophotomètre UV-Visible permettant de calculer la concentration de l'ADN dans un échantillon. Pour procéder au dosage de l'ADN, un blanc est réalisé en ajoutant 2 μl d'eau RNase free qui est ensuite analysée par le Nanodrop. Ensuite, 2 μl de chacun des échantillons à doser sont ajoutés et analysés par le Nanodrop. La concentration d'ADN en ng/ μl contenue dans les échantillons est obtenue.

5 NGS

Afin de séquencer le génome entier des bactéries, la méthode du NGS est employée (cf. 8.2.1.2 Le séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS)). Le séquençage à partir de l'ADN extrait, se réalise à la plateforme de génomique au GIGA à l'Université de Liège. Le NovaSeq 6000 de chez Illumina sera le séquenceur utilisé pour réaliser ce séquençage. Cet appareil séquence l'ADN avec la méthode du séquençage par synthèse. A cette fin, le kit Nextera XT également de la firme Illumina est utilisé. Il est nécessaire à la réalisation des bibliothèques, c'est-à-dire à la fragmentation de l'ADN et l'ajout d'adaptateurs à ces fragments. Ce kit est adapté pour les petits génomes bactériens contenant moins de 5 Mb. La taille du génome de *Streptococcus agalactiae* est d'environ 2 Mb. Concernant la quantité d'ADN nécessaire pour le séquençage, celle-ci est de 1 ng. Afin d'analyser les résultats, le logiciel WGS typer est utilisé. Cet outil a été développé, en 2020, par la firme Hedera-22 (Liège, Belgique), sur mesure pour les besoins du Centre National de Référence GBS. Ce logiciel a subi plusieurs mises à

jour depuis. Ce dernier permet d'assembler le génome de novo ainsi que l'analyse de ce génome par la recherche de différents marqueurs et mutations selon des critères définis personnellement par le CNR GBS.

5.1 Analyse des résultats

Les résultats sont analysés par l'outil WGS typer. De nombreux gènes sont ciblés par ce logiciel. Ces derniers concernent notamment les gènes codant pour la capsule polysaccharidique, la détermination du profil clonal par MLST, les protéines de pili, les facteurs de virulence ainsi que les gènes de résistance. Le **tableau 2** représente tous les gènes ciblés par l'outil WGS typer.

Capsule polysaccharidique	Gènes des facteurs de virulence :	Gènes de résistance
Ia	<i>Alp1, Alp2, Alp3, Alp4, Rib, Sar5</i>	<i>MefA, MreA</i>
Ib	<i>BibA</i>	<i>ErmB, ErmT, ErmTR, ErmC</i>
II à IX	<i>Srr1, Srr2</i>	<i>LsaC, LsaE</i>
MLST	<i>FbsA, FbsB, FbsC</i>	<i>LnuB, LnuC</i>
Identification du sequence type	<i>Lmb</i>	<i>PBP2x</i>
Les gènes des protéines de pili	<i>ScpB</i>	<i>Tet, TetK, TetM, TetO</i>
<i>PI-1</i>	<i>SfbA</i>	<i>GyrA, ParC</i>
<i>PI-2a</i>	<i>HylB</i>	<i>VanG</i>
<i>PI-2b</i>	<i>CylB</i>	<i>Aph-A3, Aad6, AAC-6-APH2</i>
	<i>HvgA</i>	
	<i>RnZ</i>	
	<i>RepB</i>	
	<i>SIP</i>	

TABLE 2 – Les marqueurs ciblés par l'outil WGS typer [21]

Après séquençage du génome, le logiciel WGS typer détermine la présence ou non d'un gène en se basant sur la couverture et l'identité du gène présent dans ce génome comparé au gène de référence. La couverture correspond, en termes de taille de séquence, au pourcentage de la séquence d'un gène retrouvé par rapport au gène de référence. L'identité d'une séquence est le degré de similitude entre la séquence du gène dans le génome étudié et la séquence de référence. De ce fait, les critères d'acceptation ont été fixés après discussion avec l'équipe d'Hedera 22 comme suit : si la couverture est inférieure à 20% ou l'identité est inférieure à 60%, le marqueur pour lequel le gène code est considéré comme absent. Si la couverture est comprise entre 20% et 50% ou l'identité est comprise entre 60% et 90%, le marqueur est considéré comme présent mais en dessous du seuil. Finalement, si la couverture est supérieure à 50% et l'identité est supérieure à 90%, le marqueur est considéré comme présent.

6 Antibiogrammes

Les antibiogrammes à savoir la diffusion en milieu gélosé ainsi que la méthode de microdilution Sensititre sont réalisés afin d'obtenir la sensibilité des souches aux différents antibiotiques par des méthodes phénotypiques.

6.1 Diffusion en milieu gélosé

6.1.1 Matériel

- Memmert INE600, Incubateur à 35°C contenant 5 à 7% de CO_2
- BioMérieux, DensiCHEK Plus, densitomètre 21250
- BioMérieux, milieu gélosé Mueller Hinton avec 5% de sang de cheval + 20 mg/L de β -NAD (réf : 43901) (MHF)
- SARSTEDT, tube PS (5 ml, 75x12 mm)
- APTACA, Ecouvillon en coton stérile avec un bâtonnet en bois de 150 mm
- Becton Dickinson BBLTM Sensi-DiscTM, Erythromycine 15 μ g (réf : 231290)
- Becton Dickinson BBLTM Sensi-DiscTM, Clindamycine 2 μ g (réf : 231275)
- Becton Dickinson BBLTM Sensi-DiscTM, Oxacilline 1 μ g (réf : 231319)
- LIOFILCHEM, disque d'antibiotiques, Ceftizoxime 30 μ g (réf : LF9054)
- Bio-Rad, disque de sensibilité, Ceftibuten 30 μ g (réf : 67638)
- BioMérieux, Solution saline (NaCl : 0.45%, pH : 4.5-7.0) (réf : V1204)
- Table European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), version 14.0 du 1 janvier 2024 (Disponible sur : <http://www.eucast.org>)

6.1.2 Méthode

La diffusion en milieu gélosé se réalise à partir d'une culture fraîche de 24 heures (cf. 2.1.1 Mise en culture et identification MALDI-TOF MS ; cf. 2.2.1 Mise en culture et identification MALDI-TOF MS). 3 ml de solution saline sont ajoutés dans un tube de 5 ml. Ce tube est ensuite inséré dans le densitomètre. Avec un écouvillon, des colonies de la culture sont prélevées et mélangées dans la solution saline afin d'obtenir une suspension bactérienne d'une densité optique comprise entre 0.45 et 0.55 McFarland. Avec un second écouvillon imbibé de cette suspension bactérienne, celle-ci est appliquée sur la gélose MHF en suivant le motif de la **figure 12**. Les cinq disques d'antibiotiques sont ajoutés sur la gélose MHF suivant l'ordre de la **figure 13**. Les disques d'érythromycine et de clindamycine ne doivent pas être éloignés de plus de 10-12 mm afin de déterminer s'il y a présence de résistance induite de la clindamycine par l'érythromycine. Cette technique se nomme le D-test. La gélose est incubée pendant 24 heures à 35°C. Une fois ce temps écoulé, le diamètre d'inhibition autour des différents disques d'antibiotiques est mesuré.

6.1.2.1 Interprétation des résultats Concernant l'érythromycine et la clindamycine, le diamètre du disque d'inhibition est interprété avec la table EUCAST. Concernant le D-test, s'il y a présence d'un aplatissement de la zone d'inhibition pour le disque de la clindamycine et que l'érythromycine est résistante, alors le D-test est positif (**cf. Figure 14**).

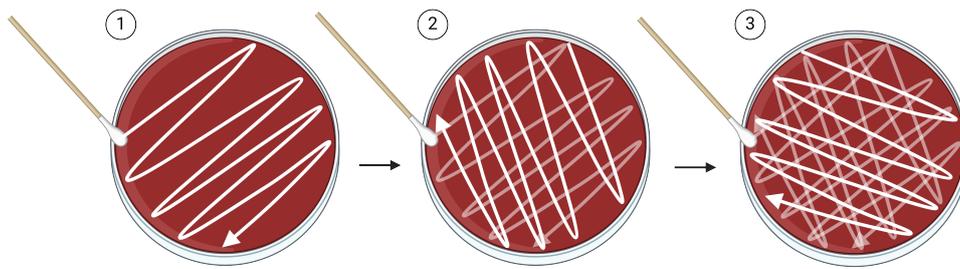


FIGURE 12 – Méthode d’ensemencement des géloses MHF [31]

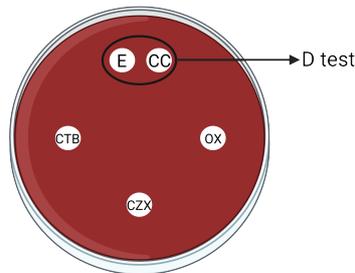


FIGURE 13 – Placement des disques d’antibiotiques [31]



FIGURE 14 – D-test positif [66]

Concernant l’oxacilline, le ceftizoxime ainsi que le ceftibuten, ceux-ci sont uniquement utilisés pour la mise en évidence d’une diminution de la sensibilité éventuelle à la pénicilline. En effet, lorsque le diamètre d’inhibition de l’oxacilline est inférieur à 17 mm, que celui du ceftizoxime est inférieur à 29 mm et que celui du ceftibuten est inférieur à 20 mm, alors une diminution de la sensibilité à la pénicilline est suspectée [67]. Des tests moléculaires devront ensuite le confirmer.

6.2 Méthode de microdilution Sensititre

6.2.1 Matériel

- Memmert INE600, Incubateur à 35°C contenant 5 à 7% de CO_2
- Thermo Fisher Scientific, Sensititre AIM™ System
- Thermo Fisher Scientific, Sensititre Vizion® Digital MIC Viewing System
- IKA®, Agitateur-secoueurs, Vortex 3
- Thermo Fisher Scientific, Sensititre™ Dosing Heads (10x10)

- Thermo Fisher Scientific, Sensititre™ BENRC2 (réf : BENRC2)
- Thermo Fisher Scientific, Sensititre™ Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth w/ TES w/ Lysed Horse Blood (réf : CP112-10)
- Table European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), version 13.1 du 29 juin 2023 (Disponible sur : <http://www.eucastr.org>)
- Mettler Toledo, Pipette manuelle monocanal Pipet-Lite XLS (10 µl - 100 µl)
- Mettler Toledo, Cônes de pipette (20 µl/250 µl)

6.2.2 Méthode

La méthode de microdilution Sensititre s'effectue à partir de la même suspension bactérienne réalisée pour la diffusion en disque (cf. 6.1.2 Méthode). 100 µl de cette suspension bactérienne sont prélevés et ajoutés dans le milieu de culture liquide prévu à cet effet. Le milieu de culture contenant la suspension bactérienne est ensuite vortexé à 2500 rpm pendant 5 secondes. L'appareil Sensititre AIM est réglé avec la configuration de dosage requise pour un volume de 100 µl. Avec cet appareil, la plaque prévue à cet effet est ensemencée. La plaque est ensuite incubée pendant 24 heures à 35°C. A l'aide de l'appareil Sensititre Vizion, la plaque est analysée (par lecture de la croissance bactérienne) afin de déterminer la CMI de l'antibiotique pour le GBS.

6.2.2.1 Analyse et interprétation des résultats Le principe de la méthode de microdilution se base sur la formation d'un culot qui indique une croissance bactérienne. Concernant l'analyse des résultats, la CMI est déterminée par la concentration se trouvant dans le premier puits où un culot n'est pas observé. La **figure 15** représente la configuration de la plaque Sensititre contenant les différents antibiotiques à des concentrations croissantes. Cette plaque a été conçue spécifiquement pour le centre de référence. Concernant l'interprétation des résultats comme étant sensibles ou résistants, elle est réalisée à l'aide du référentiel EUCAST.

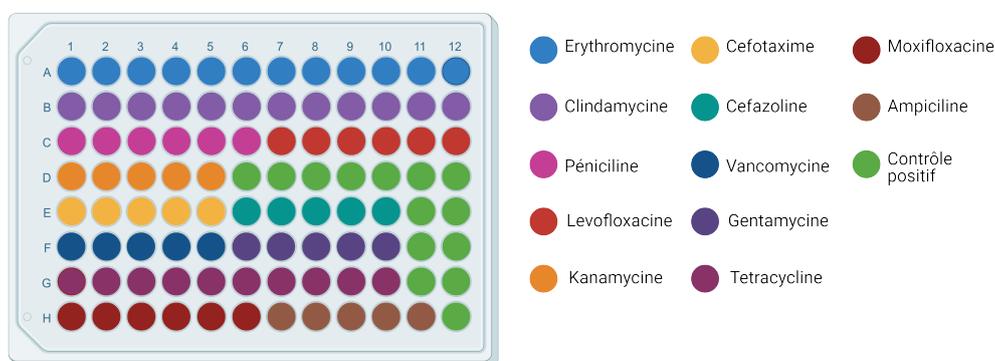


FIGURE 15 – Plaque de microdilution Sensititre [31]

6.3 Analyse statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du Logiciel R (version : i386 4.1.1) dans l'interface R commander. Ces analyses sont utilisées afin de déterminer si une différence statistiquement significative est observée pour la distribution des sérotypes, la distribution des protéines de pili, la distribution du phénotype MLS ainsi que le taux de résistance aux différents antibiotiques utilisés dans les antibiogrammes. Pour réaliser ces statistiques, la proportion de ces variables est comparée avec la proportion de ces mêmes variables obtenues dans la réalisation d'un travail similaire en 2018 [68]. Le test statistique utilisé pour comparer ces proportions est le test du $\tilde{\chi}^2$ si les conditions d'application sont remplies. Si ces conditions ne le sont pas alors, le test exact de Fisher sera utilisé. La p-valeur est fixée à 0,05.

IV Résultats

1 Collection des souches

Afin de collecter les souches nécessaires à cette étude, 62 laboratoires dispersés dans toute la Belgique ont participé. En revanche 2 laboratoires étaient non identifiables ; ils n'ont donc pas été inclus dans les statistiques qui suivent. En Wallonie, le pourcentage de participation s'élève à 35%. En Flandre, ce pourcentage est de 60%. Finalement, dans la région de Bruxelles-Capitale, la fréquence de participation est de 5%. Ces laboratoires ont pour la plupart envoyé 5 souches de GBS au CNR, 310 souches ont été récoltées au cours de cette étude.

2 Identification du GBS

Concernant l'identification des souches, 307 hors des 310 souches ont été identifiées comme étant des *Streptococcus agalactiae*. En revanche, 3 souches ont été identifiées comme *Enterococcus faecalis* après de multiples tentatives d'isolement. Ces dernières ont donc été écartées de l'étude. Par conséquent, les statistiques réalisées dans le cadre de ce travail comptabilisent un effectif total de 307 souches. Dans les résultats, cet effectif est indiqué par la lettre « n ».

3 Résultats du NGS

La réalisation du NGS a permis de déterminer le sérotype, le sequence type, les gènes des protéines de pili, les gènes des facteurs de virulence ainsi que les gènes de résistance aux antibiotiques, au sein des 307 GBS identifiés, à l'aide de l'outil WGS typer.

3.1 Sérotypes

En ce qui concerne la distribution des sérotypes en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, celle-ci est illustrée dans la **figure 16**. Sur cette figure, il est possible d'observer les différents sérotypes, parmi lesquels le sérotype II est le plus fréquent, représentant 21,82% (n = 67) des souches incluses dans cette étude. Il est suivi de près par le sérotype V comptabilisant une fréquence de 21.5% (n = 66). Les sérotypes III et Ia sont présents à une fréquence presque similaire de 18.57% (n = 57) et de 17.26% (n = 53) respectivement. Les sérotypes Ib et IV sont retrouvés à une fréquence de 8.47% (n= 26) et de 6.51% (n= 20), respectivement. Les sérotypes les moins représentés sont les sérotypes IX, VII et VI avec une fréquence respective de 3.91% (n = 12), 0.98% (n= 3) et 0.33% (n = 1).

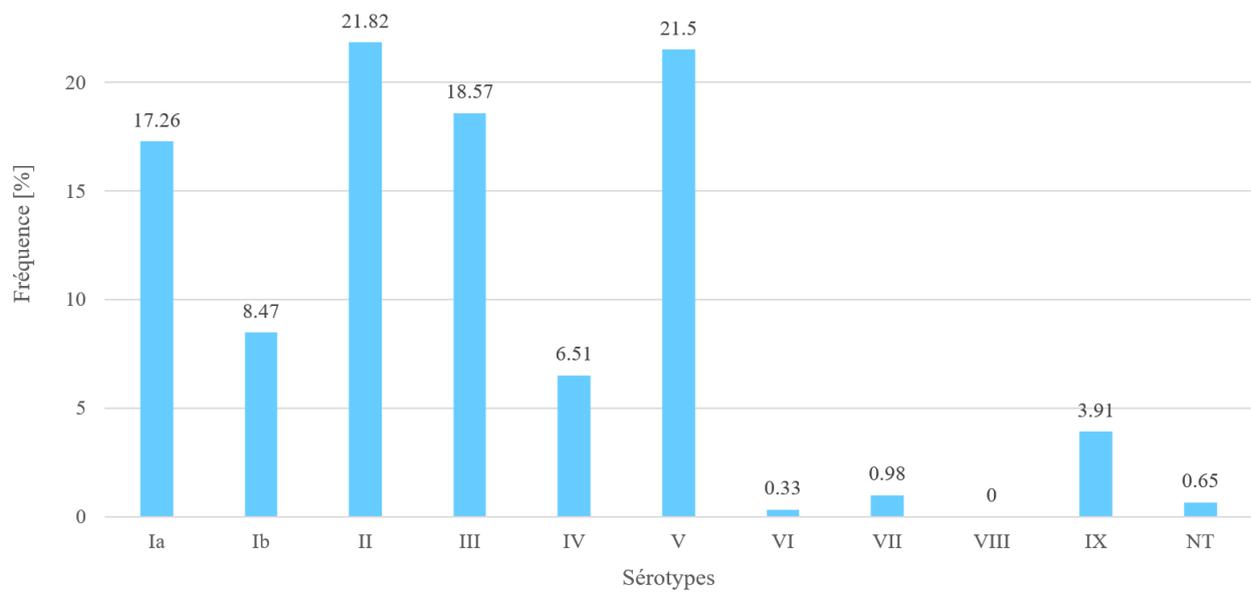


FIGURE 16 – Distribution des sérotypes (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

Les sérotypes les moins représentés sont les sérotypes IX, VII et VI avec une fréquence respective de 3.91% (n = 12), 0.98% (n = 3) et 0.33% (n = 1). Le sérotype VIII n'a pas été retrouvé dans cette étude. Finalement, 0.65% (n = 2) des sérotypes étaient non identifiables même après analyse génotypique (**cf. Figure 16 : NT**).

3.2 Séquences types

La distribution des séquences types les plus fréquents en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023 est représentée par la **figure 17**. En effet, le sequence type le plus retrouvé dans cette population est le ST-23 avec une fréquence de 12.7% (n = 39) suivi de près par le ST-1 représentant une proportion de 11.73% (n = 36) ainsi que le ST-17 comptabilisant une fréquence de 9.45% (n = 29). Le ST-28, le ST-19 et le ST-569 représentent, respectivement, 6.19% (n = 19), 5.86% (n = 18) et 4.56% (n = 14) des souches incluses dans cette étude. Les ST-8 et ST-529, eux, sont présent à la même fréquence de 4.23% (n = 13). En revanche, les sequence types ne représentant qu'une petite partie de la population n'ont pas été représentés dans la figure 22 mais comptabilisent tout de même une fréquence totale de 34.86% (n = 107). Cette dernière portion inclus le ST-2, le ST-4, le ST-10, le ST-12, le ST-22, le ST-24, le ST-26, le ST-27, le ST-61, le ST-88, le ST-109, le ST-130, le ST-144, le ST-182, le ST-196, le ST-287, le ST-291, le ST-314, le ST-330, le ST-335, le ST-347, le ST-358, le ST-459, le ST-486, le ST-498, le ST-532, le ST-861, le ST-890, le ST-1010, le ST-1505, le ST-1254 et le ST-1274. Finalement, 6.19% (n = 19) des souches n'ont pas pu se voir attribuer un ST (NT). En effet, soit celui-ci était non-identifiable soit une suspicion de ST existant était émise mais ne pouvait être confirmé à cause de discordances dans un ou plusieurs allèles nécessaires à l'identification du sequence type. Pour le ST non identifiable (non connu), la nouvelle combinaison d'allèles ainsi que l'assemblage du génome complet ont été soumis à PUBMLST GBS afin d'enrichir cette base de données partagée.

3.3 Gènes codant pour les protéines de pili

La **figure 18** représente la distribution des gènes codant pour les protéines de pili en Belgique relatives au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023. Dans cette population, une expression concomitante des gènes *PI-1*, *PI-2a* est présente avec une fréquence de 50.81% (n = 156). Suivie par l'expression seule du gène *PI-2a* comptabilisant une proportion de 32.9% (n = 101). La combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2b* représente 11.4% (n = 35) de cet effectif. Finalement, le gène *PI-2b* exprimé seul est présent dans la population étudiée avec une fréquence de 4.89% (n = 15).

3.4 Gènes des facteurs de virulence

Concernant la distribution des gènes des facteurs de virulence en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, celle-ci est représentée dans le **tableau 3**.

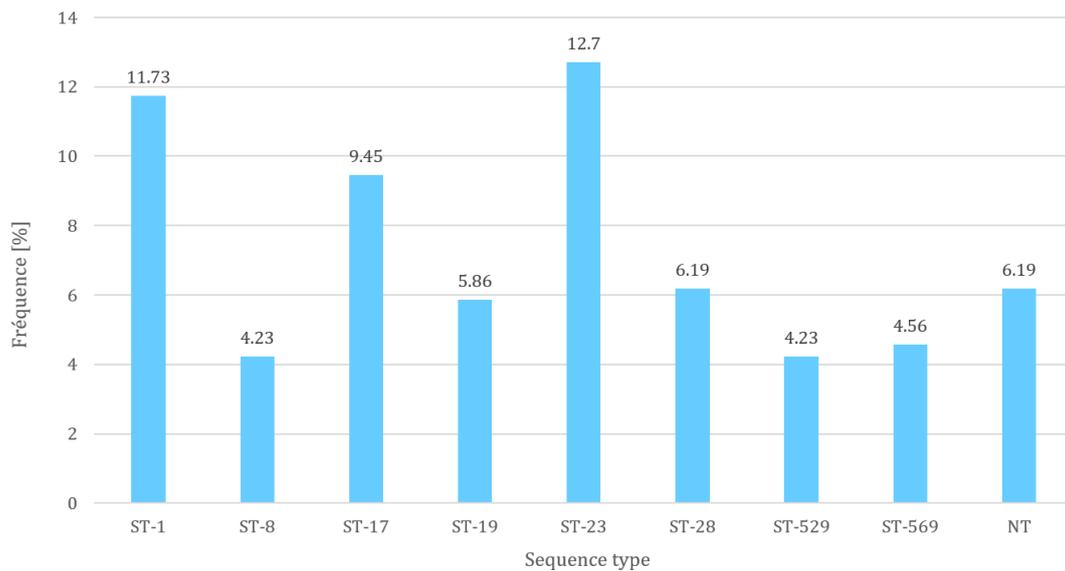


FIGURE 17 – Distribution des sequence types les plus fréquents (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

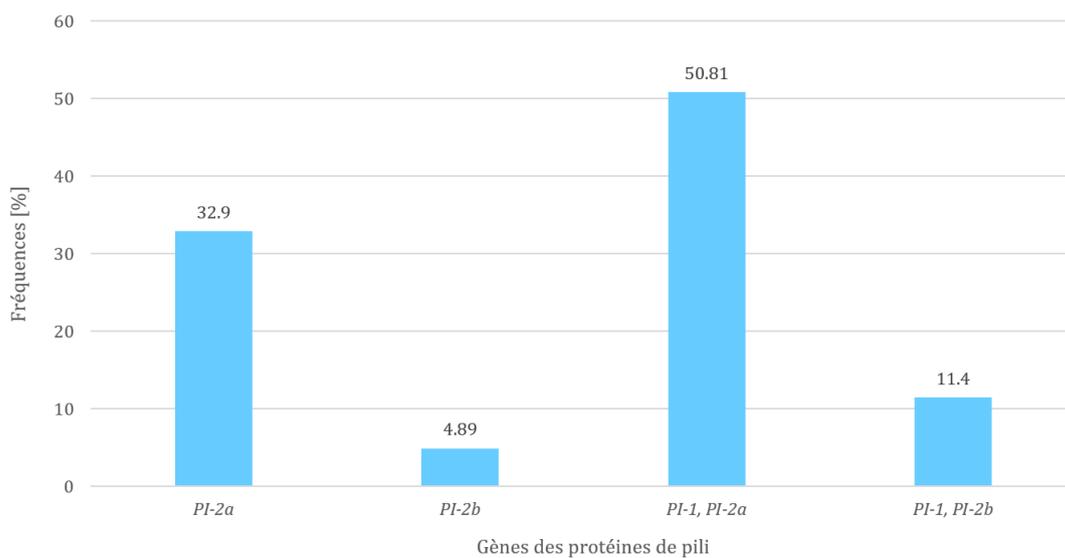


FIGURE 18 – Distribution des gènes codant pour les protéines de pili (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

Dans ce tableau, les fréquences correspondantes à ces gènes sont classées en 3 catégories : les gènes détectés, les gènes détectés en-dessous du seuil et les gènes non détectés. Les gènes codants pour les protéines de la famille alpha-like ainsi que ceux codant pour la famille des adhésines à savoir ceux pour les protéines Srr, les protéines Fbs et les autres d'adhésines sont disponibles dans ce tableau. Il est également représenté les gènes des autres facteurs de virulence.

	Détecté	Détecté en dessous du seuil	Non détecté
Protéines alpha-like			
<i>Alp1</i>	125 (40.72%)	174 (56.68%)	8 (2.60%)
<i>Alp2</i>	40 (13.03%)	253 (82.41%)	14 (4.56%)
<i>Alp3</i>	43 (14.01%)	251 (81.76%)	13 (4.23%)
<i>Alp4</i>	2 (0.65%)	105 (34.2%)	200 (65.15%)
<i>Rib</i>	0 (0.0%)	18 (5.86%)	289 (94.14%)
<i>Sar5</i>	61 (19.87%)	12 (3.91%)	234 (76.22%)
Adhésines			
Protéines Srr			
<i>Srr1</i>	95 (30.94%)	134 (43.65%)	78 (25.41%)
<i>Srr2</i>	38 (12.38%)	3 (0.98%)	266 (86.64%)
Protéines Fbs			
<i>FbsA</i>	100 (32.57%)	205 (66.78%)	2 (0.65%)
<i>FbsB</i>	105 (34.20%)	200 (65.15%)	2 (0.65%)
<i>FbsC</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Autres adhésines			
<i>Lmb</i>	300 (97.72%)	0 (0.0%)	7 (2.28%)
<i>ScpB</i>	298 (97.07%)	0 (0.0%)	9 (2.93%)
<i>SfbA</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>HylB</i>	306 (99.67%)	1 (0.33%)	0 (0.0%)
<i>BibA</i>	59 (19.22%)	239 (77.85%)	9 (2.93%)
Autres facteurs de virulence			
<i>CylB</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>HvgA</i>	39 (12.70%)	238 (77.52%)	30 (9.77%)
<i>RnZ</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>RepB</i>	2 (0.65%)	302 (98.37%)	3 (0.98%)
<i>SIP</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

TABLE 3 – Distribution des gènes des facteurs de virulence (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307) classés en 3 catégories (les gènes détectés, les gènes détectés en-dessous du seuil et les gènes non détectés)

3.5 Gènes de résistance

La distribution des gènes des facteurs de résistance en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023 est illustrée dans le **tableau 4**. Dans ce tableau, les fréquences correspondantes à ces gènes sont classées en 3 catégories : les gènes détectés, les gènes détectés en-dessous du seuil et les gènes non détectés. Les gènes codants pour les facteurs de résistance de la famille des macrolides et des lincosamides ainsi que ceux codant pour la famille des β lactames sont représentés dans ce tableau. Il y figure également les gènes de résistance de la famille des tétracyclines, des fluororquinolones, des glycopeptides et des aminoglycosides.

	Détecté	Détecté en dessous du seuil	Non détecté
Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)			
Macrolides			
<i>MefA</i>	6 (1.95%)	19 (6.19%)	282 (91.86%)
<i>MreA</i>	307 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>ErmB</i>	65 (21.17%)	0 (0.0%)	242 (78.83%)
<i>ErmTr</i>	22 (7.16%)	3 (0.98%)	282 (91.86%)
<i>ErmT</i>	3 (0.98%)	16 (5.21%)	288 (93.81%)
<i>ErmC</i>	65 (21.17%)	1 (0.33%)	241 (78.50%)
Lincosamides			
<i>LsaC</i>	6 (1.95%)	0 (0.0%)	301 (98.05%)
<i>LsaE</i>	1 (0.33%)	0 (0.0%)	306 (99.67%)
<i>LnuB</i>	1 (0.33%)	0 (0.0%)	306 (99.67%)
<i>LnuC</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	307 (100.0%)
β-lactames			
<i>PBP2x</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	307 (100.0%)
Tétracyclines			
<i>Tet</i>	3 (0.98%)	0 (0.0%)	304 (99.02%)
<i>TetK</i>	1 (0.33%)	3 (0.98%)	303 (98.69%)
<i>TetM</i>	228 (74.27%)	37 (12.05%)	42 (13.68%)
<i>TetO</i>	43 (14.00%)	183 (59.61%)	81 (26.39%)
Fluoroquinolones			
<i>GyrA</i>			
Variant S81L	6 (1.95%)	0 (0.0%)	301 (98.05%)
<i>ParC</i>			
Variant S79Y	4 (1.31%)	0 (0.0%)	303 (98.69%)
Variant S79F	6 (1.95%)	0 (0.0%)	301 (98.05%)
Glycopeptides			
<i>VanG</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	307 (100.0%)
Aminoglycosides			
<i>Aph-A3</i>	26 (8.47%)	0 (0.0%)	281 (91.53%)
<i>Aad-6</i>	15 (4.89%)	2 (0.65%)	290 (94.46%)
<i>AAC-6-APH2</i>	6 (1.95%)	2 (0.65%)	299 (97.40%)

TABLE 4 – Distribution des gènes des facteurs de résistance (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307) classés en 3 catégories (les gènes détectés, les gènes détectés en-dessous du seuil et les gènes non détectés)

4 Résultats des antibiogrammes

4.1 Diffusion en milieu gélosé

Concernant les résultats de la diffusion en disque, ceux-ci sont illustrés dans la **figure 19** montrant la distribution des souches résistantes et sensibles à différents antibiotiques obtenue avec la méthode de diffusion en disque en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023. Pour l'érythromycine, un taux de résistance de 35.83% (n = 110) est observé. Concernant la clindamycine, ce taux est de 27.36% (n = 84). Concernant l'oxacilline, une faible résistance de 4.89% (n = 15) est soulignée. La fréquence de résistance au ceftibuten est très faible puisqu'elle est de 0.33% (n= 1). Toutes les souches sont sensibles au ceftizoxime.

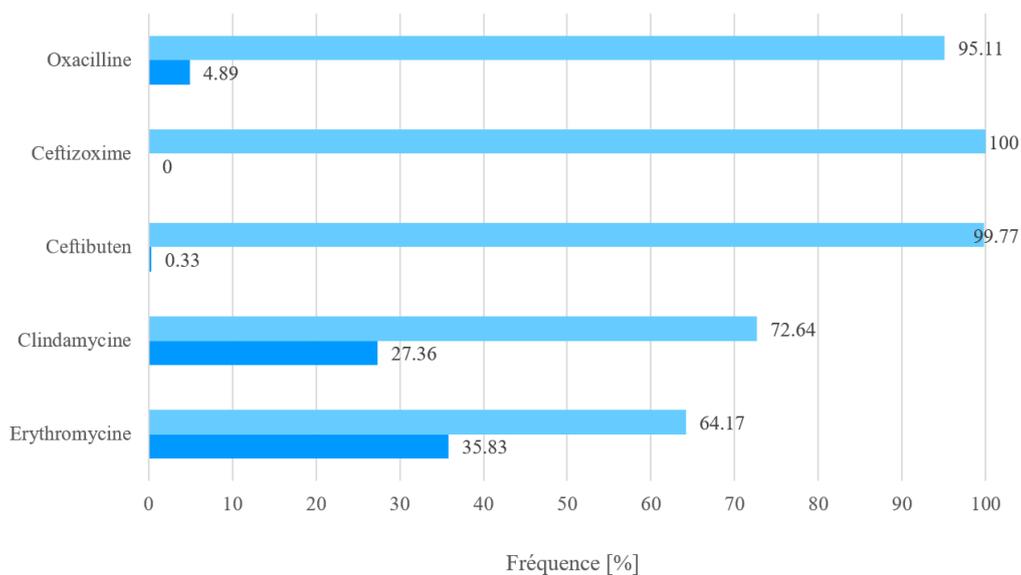


FIGURE 19 – Distribution des souches résistantes et sensibles à différents antibiotiques obtenue avec la méthode de diffusion en disque (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

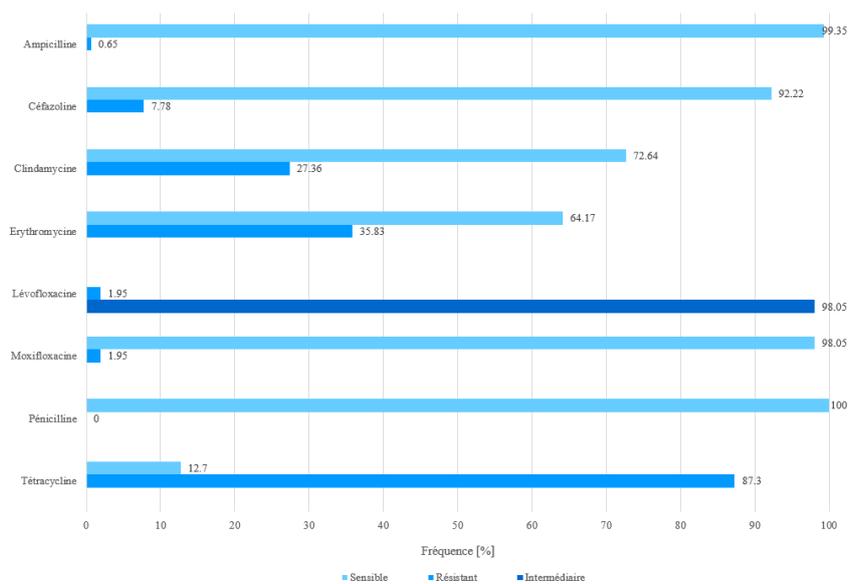


FIGURE 20 – Distribution des souches résistantes et sensibles à différents antibiotiques obtenue avec la méthode de microdilution Sensititre (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

4.2 Méthode de microdilution Sensititre

La méthode de microdilution Sensititre a permis de mettre en évidence la distribution des souches résistantes et sensibles à différents antibiotiques en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023. Les résultats sont représentés en **figure 20**.

Un taux de résistance à la tétracycline assez élevé de 87.3% (n = 268) a été mis en évidence dans cette figure. La gamme de CMI concernant cet antibiotique est comprise entre 0.25 µg/ml et 64 µg/ml. La moyenne géométrique des CMI, pour les souches sensibles et résistantes à la tétracycline, est respectivement de 0.17 µg/ml et 43.53 µg/ml.

Concernant le pourcentage de résistance à l'érythromycine et la clindamycine, une fréquence respective de 35.83% (n = 110) et de 27.36% (n = 84) peut être observée. Sont considérées, dans les souches résistantes à la clindamycine, les souches ayant un phénotype de résistance aussi bien constitutif qu'inductible. La gamme de CMI est comprise entre 0.06 µg/ml et 128 µg/ml pour les deux antibiotiques. Concernant la moyenne géométrique, les souches sensibles à l'érythromycine possèdent une CMI moyenne de 0.069 µg/ml et les souches résistantes possèdent une CMI moyenne de 26.78 µg/ml. Pour la clindamycine, la moyenne géométrique des souches sensibles est de 0.068 µg/ml et la moyenne géométrique des souches résistantes est de 109.25 µg/ml.

Les souches sont faiblement résistantes à la céfazoline, la moxifloxacine, la lévofloxacine ainsi que l'ampicilline avec une fréquence respective de 7.78% (n= 24), 1.95% (n = 6), 1.95% (n = 6) et 0.65% (n = 2). A propos de la gamme de CMI des antibiotiques venant d'être citée, celle-ci est, respectivement, comprise entre 0.12 µg/ml et 0.5 µg/ml, 0.12 µg/ml et 4 µg/ml, 0.12 µg/ml et 4 µg/ml, 0.03 µg/ml et 0.5 µg/ml. Concernant la moyenne géométrique des souches sensibles et résistantes à la céfazoline, celle-ci est de 0.021 µg/ml et 0.5 µg/ml. La moxifloxacine possède une moyenne géométrique de 0.15 µg/ml pour les souches sensibles et de 4 µg/ml pour les souches résistantes. En ce qui concerne la lévofloxacine, cette moyenne géométrique est de 0.5 µg/ml pour les souches intermédiaires et de 4 µg/ml pour les souches résistantes. Finalement, l'ampicilline possède une moyenne géométrique de 0.13 µg/ml pour les souches qui y sont sensibles et de 0.5 µg/ml pour les souches qui y sont résistantes. Au sujet de la pénicilline, toutes les souches y sont sensibles avec une gamme de CMI comprise entre 0.015 µg/ml et 0.12 µg/ml. Concernant la moyenne géométrique, celle-ci est de 0.071 µg/ml.

Au sujet de la pénicilline, toutes les souches y sont sensibles avec une gamme de CMI comprise entre 0.015 µg/ml et 0.12 µg/ml. Concernant la moyenne géométrique, celle-ci est de 0.071 µg/ml.

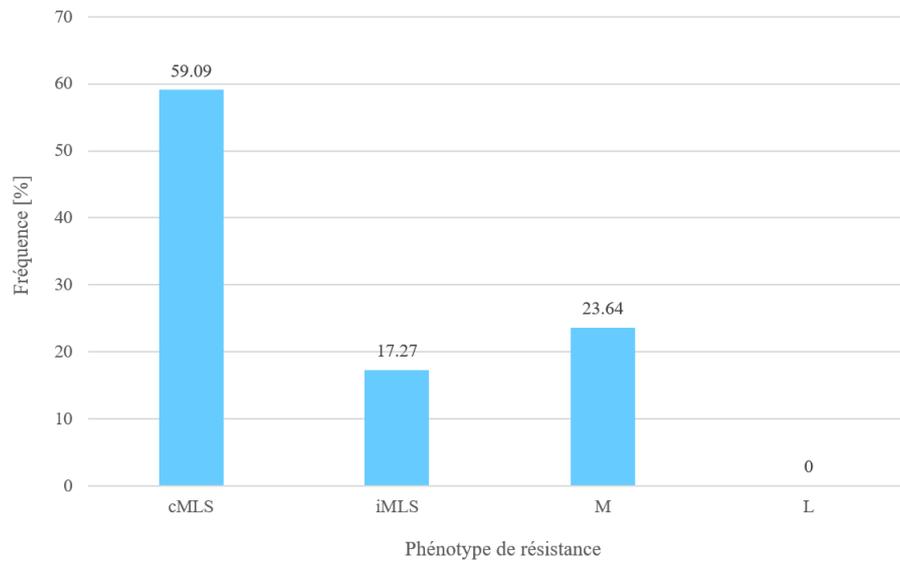


FIGURE 21 – Distribution des différents phénotypes de résistance MLS (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 110)

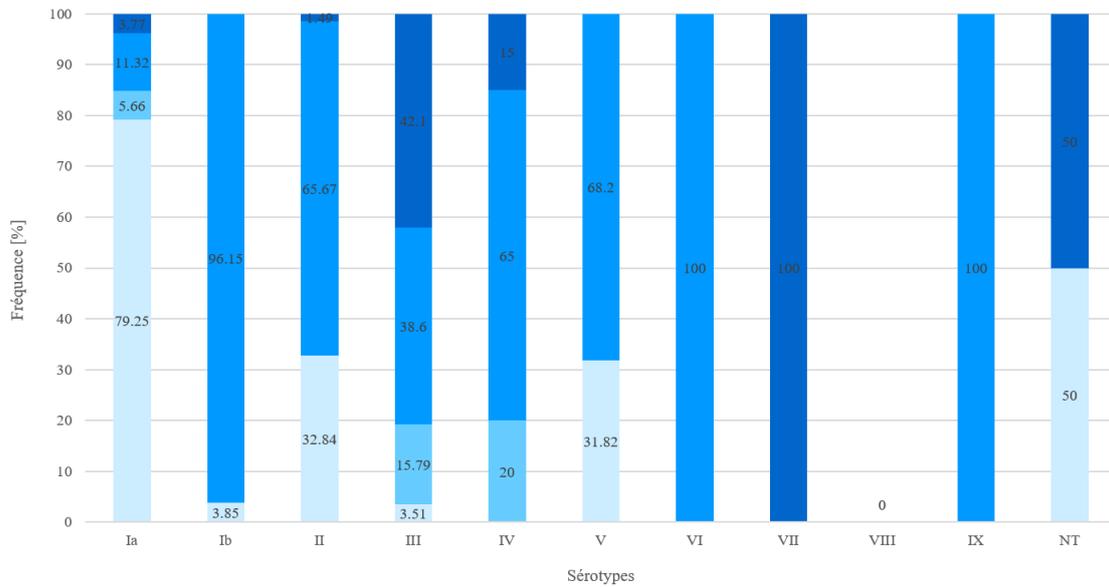


FIGURE 22 – Distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

4.3 Phénotype de résistance MLS

La distribution des différents phénotypes de résistance MLS est reprise dans la **figure 21**. Ce phénotype a été analysé sur 110 souches présentant des résistances MLS. Dans cette étude, le phénotype cMLS est le plus retrouvé avec une fréquence de 59.09% (n = 65). Le phénotype M et iMLS se suivent de près avec une fréquence de 23.64% (n = 26) et de 17.27% (n = 19) respectivement. Finalement, le phénotype L n'a pas été observé pour les souches incluses dans cette étude.

5 Mise en relation des résultats

5.1 Distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes

La **figure 22** illustre la distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023. Le sérotype Ia est le plus souvent associé au gène *PI-2a* avec une fréquence de 79.25% (n = 42/53). Concernant le sérotype Ib, le sérotype II, le sérotype IV, le sérotype V, le sérotype VI et le sérotype IX, ceux-ci sont majoritairement associés avec la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2a* comptabilisant une fréquence respective de 96.15% (n = 25/26), 65.67% (n = 44/67), 65% (n = 13/20), 68.2% (n = 45/66), 100% (n = 1) et 100% (n = 12). Au sujet du sérotype III, ce dernier est aussi bien corrélé à la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2a* qu'à la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2b* totalisant une fréquence respective de 38.6% (n = 22/57) et de 42.1% (n = 24/57). Le sérotype VII est quant à lui associé à 100% (n = 3) à la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2b*.

5.2 Distribution des sequence types selon les sérotypes

La distribution des sequences types selon les sérotypes en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023 est représenté par la **figure 23**. Le sérotype Ia est associé à 71.7% (n = 38/53) au ST-23. Le sérotype Ib, quant à lui, est associé au ST-8 à une fréquence de 50% (n = 13/26). Concernant le sérotype II, ce dernier est associé à 28.87% (n = 18/67) avec le ST-28. Le sérotype III est majoritairement associé avec le ST-17 totalisant une fréquence de 50.88% (n = 29/57) des cas. Le sérotype IV est corrélé à 40% (n = 8/20) avec le ST-196. Concernant les sérotypes V, celui-ci est corrélé à 33.33% (n = 22/66) avec le ST-1 et les sérotypes VI et VII, eux, sont corrélés à 100% (n = 1 et 3) avec le ST-1. Finalement, le sérotype IX est majoritairement associé avec le ST-130 comptabilisant une fréquence de 91.67% (n = 11/12).

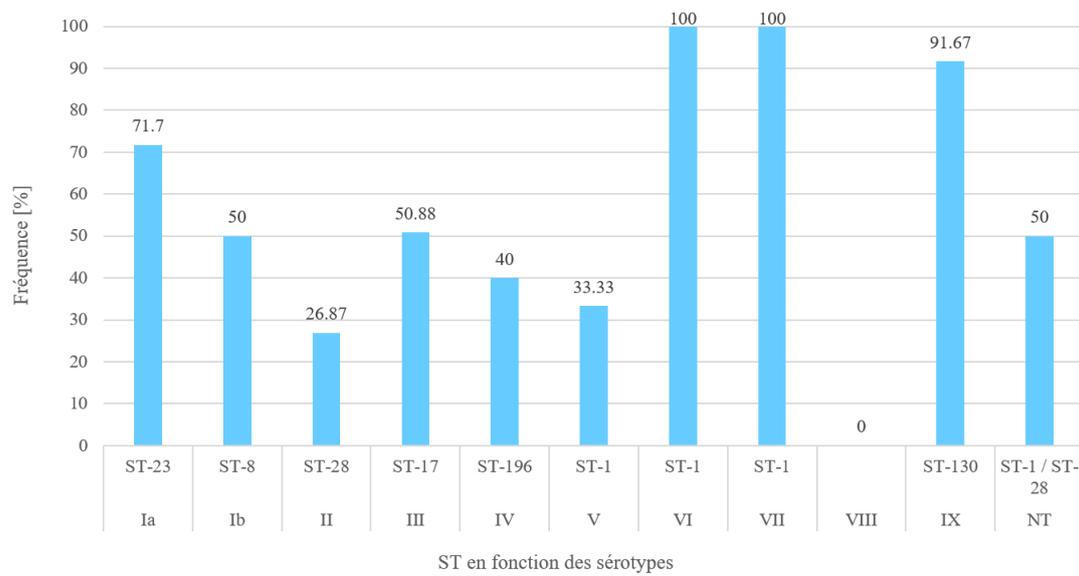


FIGURE 23 – Distribution des sequence types majoritaires selon les sérotypes (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 307)

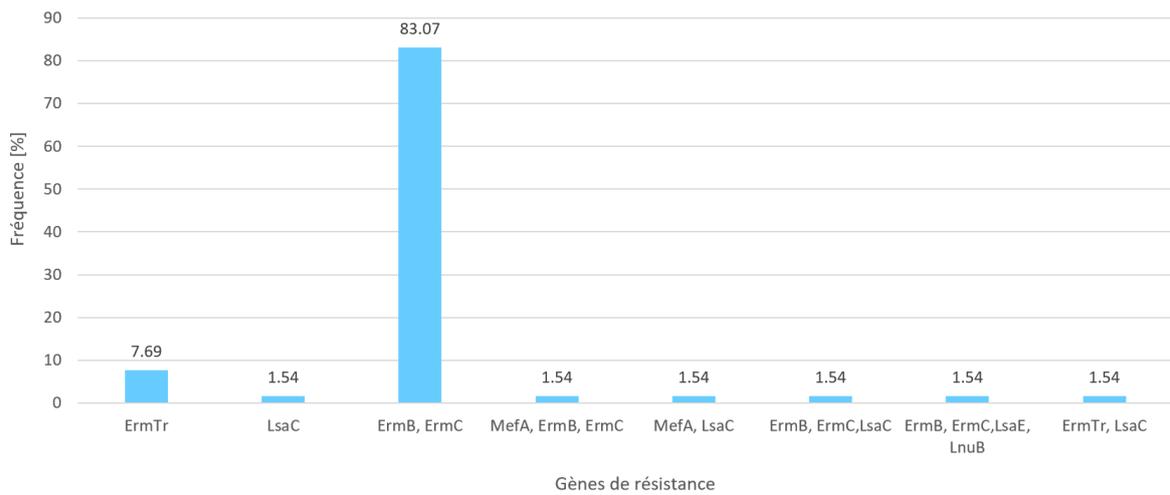


FIGURE 24 – Distribution des gènes de résistance conférant le phénotype cMLS (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 65)

5.3 Phénotype MLS

Les souches étant caractérisées par un phénotype MLS expriment au moins toutes un gène de résistance à l'exception de 26.92% (n = 7/26) des souches du phénotype M n'exprimant aucun gène de résistance. En revanche, 3.05% (n = 6/197) des souches sensibles à ces antibiotiques expriment des gènes de résistance. En effet, le gène *LsaC* est présent pour 1.02% (n = 2/197) de ces souches. De plus les gènes *ErmB* et *ErmC* se retrouvent en association chez 1.52% (n = 2/197) des souches sensibles. Un autre gène de résistance également trouvé est le gène *MefA* ayant une prévalence de 0.51% (n = 1/197) dans la population des souches sensibles.

5.4 Phénotype cMLS

La distribution des gènes de résistance conférant le phénotype cMLS en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023 est illustrée dans la **figure 24**. Le gène *ErmTr* est présent seul chez 7.69% (n = 5) de ces souches résistantes. Un autre gène présent également seul est le gène *LsaC* pour 1.54% (n = 1) des souches. La combinaison de gènes la plus exprimée dans le génome des souches résistantes concerne les gènes *ErmB* et *ErmC* pour 83.1% (n = 54) de ces souches. Concernant les autres combinaisons de gènes se retrouvant dans le génome des souches ayant un phénotype cMLS, ceux-ci sont présent à 1.54% (n = 1).

5.5 Phénotype iMLS

La **figure 25** représente la distribution des gènes de résistance conférant le phénotype iMLS en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023. Les gènes *ErmTr* et *ErmT* sont également présents seuls avec une fréquence respective de 47.38% (n = 9) et de 15.79% (n = 3). Les combinaisons de gènes retrouvés dans le génome de ces souches concernent les gènes *ErmB* et *ErmC*, *MefA* et *ErmTr*, *ErmB* et *ErmTr* présents avec une fréquence respective de 21.05% (n = 4), de 10.53% (n = 2) et de 5.26% (n = 1).

5.6 Phénotype M

Finalement, la **figure 26** illustre la distribution des gènes de résistance conférant le phénotype M. Ainsi, les gènes *MefA* et *ErmTr* sont présents à 61.54% (n = 16) en considérant les facteurs détectés en dessous du seuil et 11.54% (n = 3) respectivement. 26.92% (n = 7/26) souches de phénotype M ne présentent aucun gène de résistance, ou en tout cas aucun gène ciblé par l'outil WGS Typer.

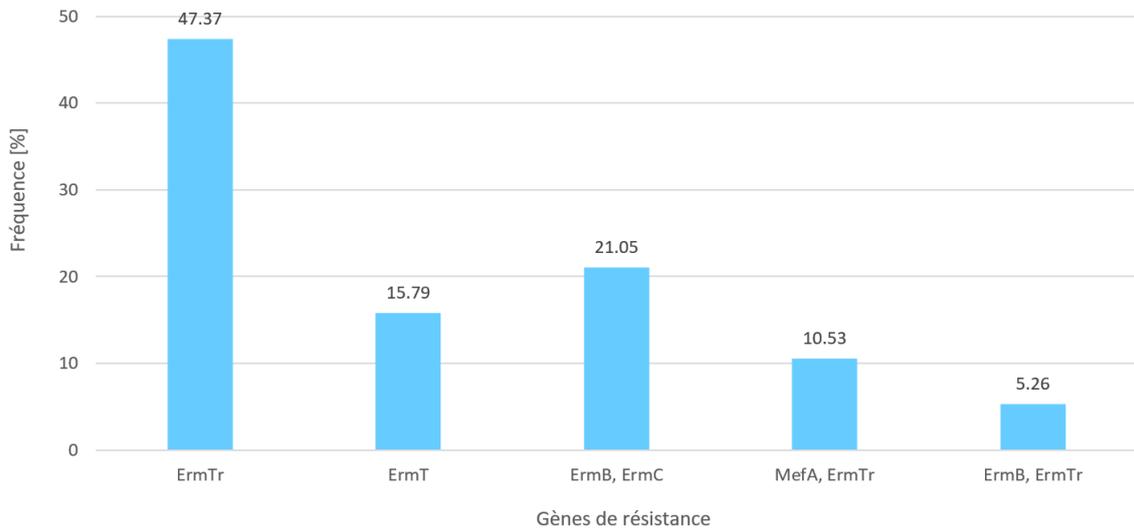


FIGURE 25 – Distribution des gènes de résistance conférant le phénotype iMLS (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 19)

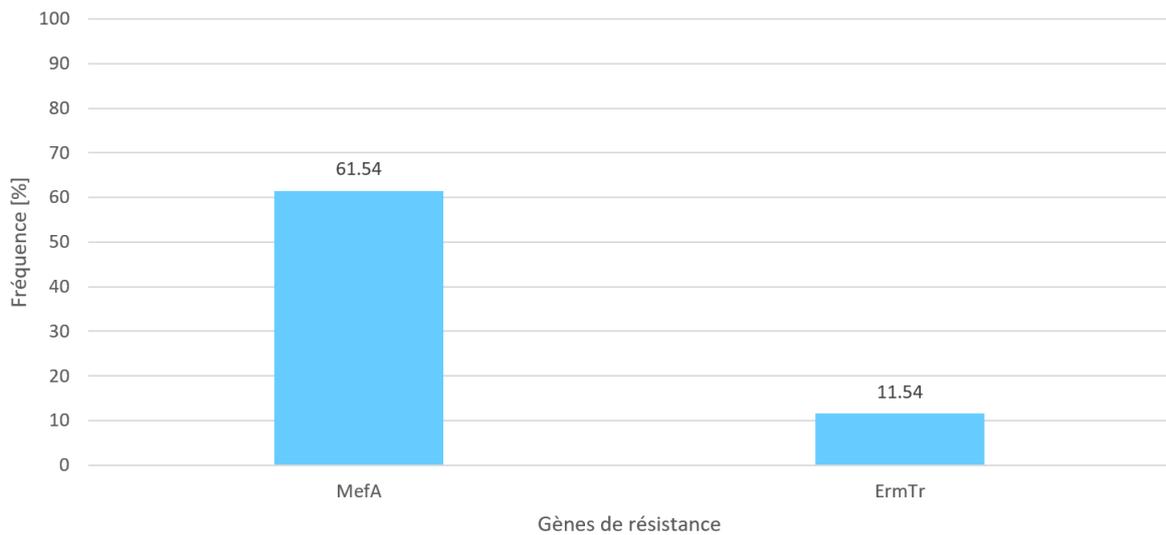


FIGURE 26 – Distribution des gènes de résistance conférant le phénotype M (en %) au sein des GBS colonisant la femme enceinte en 2023, en Belgique (n = 26)

V Discussion, conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail est le suivi épidémiologique des souches de GBS de colonisation, isolées de frottis vagino-rectaux ou vaginaux pendant la grossesse. De précédentes études du même type ont été réalisées au Centre National de Référence GBS du CHU de Liège en 2013 et 2018. Ces données permettront d'actualiser les informations disponibles en termes d'épidémiologie des souches de GBS circulant chez la femme enceinte en Belgique en vue, notamment, du développement d'un vaccin contre le GBS.

1 Sérotypes

L'évolution de la distribution des sérotypes en Belgique au sein des GBS colonisant la femme enceinte entre 2018 et 2023 est statistiquement différente (p-valeur de 0.028 avec le test du χ^2). Cette distribution ne varie pas concernant les sérotypes les plus répandus mais plutôt concernant la fréquence observée de ces sérotypes dans la population des femmes enceintes. En effet, la fréquence relative aux sérotypes Ia, Ib, II, III, IV et V en 2023 se distingue de cette même fréquence en 2018. C'est également le cas, en 2013, dans une étude du même type réalisée par le CHU de Liège. Concernant les sérotypes Ia, III, IV et V, ceux-ci sont moins exprimés en 2023 qu'en 2018. Ces résultats sont également observés en 2013 à l'exception des sérotypes IV et V qui, eux, sont moins exprimés en 2013 qu'en 2023. Les sérotypes Ib et II sont, eux, plus exprimés en 2023 qu'en 2018. C'est également le cas en 2013. Cependant, tout comme les autres années, les sérotypes les plus répandus pour la colonisation par le GBS chez la femme enceinte en 2023 restent les sérotypes Ia, Ib, II, III, IV et V. Quant aux sérotypes VI, VII, VIII et IX ainsi que les souches non typables, ils se retrouvent minoritairement au sein des GBS de colonisation à travers les années [68][69]. Concernant les autres pays du monde, comme la Suède, le Danemark, l'Italie ainsi que le Vietnam, la distribution des sérotypes est assez variable. En effet, en Suède, les sérotypes Ia, Ib, II, III, IV et V sont les plus détectés dans la population des femmes enceintes [70]. Concernant le Danemark, ces sérotypes sont également retrouvés dans cette population excepté le fait que le sérotype IX possède la plus haute fréquence et est donc le sérotype le plus présent [71]. Cependant, les résultats de l'étude danoise sont à prendre avec précaution car seule une méthode d'agglutination phénotypique est utilisée pour le typage et le sérotype IX est en général peu représenté. En Italie, seuls les sérotypes Ia, III et V comptabilisent la plus haute fréquence d'apparition chez les femmes enceintes [72]. C'est également le cas au Vietnam à l'exception du fait que le sérotype Ib est le plus prévalent avec le sérotype III et le sérotype V [73]. Toutefois, au Japon, les sérotypes VI et VII prédominent chez les femmes enceintes étant colonisées par le GBS [74]. En revanche, les sérotypes les plus répandus à travers les pays d'Europe chez les femmes enceintes restent identiques (Ia, Ib, II,

III, IV et V les plus fréquents). Ce qui change est la prévalence de ces sérotypes dans la population. Cette analyse est favorable au développement d'un vaccin ciblé contre les sérotypes les plus répandus dans cette distribution Européenne en vue de lutter contre la colonisation par le GBS chez les femmes enceintes. Ce vaccin est actuellement en développement et fait l'objet d'essais cliniques de phase 2 [46].

2 Sequence type

D'après une revue systématique retraçant la colonisation vaginale du *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes entre 2017 et 2020 à travers le monde entier, les ST les plus retrouvés dans cette population sont, par ordre décroissant de prévalence, le ST-19, le ST-23, le ST-1 et le ST-17 [75]. Ces données sont appuyées par les résultats obtenus dans cette étude. En effet, sont observés par ordre décroissant de prévalence dans la population, le ST-23, le ST-1 et le ST-17. Concernant le ST-19, celui-ci est bien retrouvé dans la population de cette étude mais avec une plus faible fréquence que les autres ST et n'est pas majoritaire contrairement à ce qui avait été observé dans la revue systématique. Globalement, la distribution des sequence types ne semble pas varier, si ce n'est que pour le ST-19, selon la localisation géographique ainsi qu'en fonction des années.

3 Distribution du sequence type selon les sérotypes

L'évaluation du sequence type selon les sérotypes est surtout intéressante pour déterminer l'association du ST-17 et du sérotype III. En effet, cette association est réputée pour être assez virulente concernant les infections néonatales [15]. En dépit du fait que cette étude cible la colonisation vagino-rectale du GBS chez la femme enceinte, si la femme infectée ne reçoit pas une antibioprofylaxie de prévention avant d'accoucher, la bactérie peut se transmettre à l'enfant. Ceci constitue le principal moyen d'infection chez le nouveau-né en regard de l'infection précoce [29]. De plus, le sérotype prédominant concernant cette infection précoce est le sérotype III [13]. Ceci explique l'importance de déterminer l'association du sequence type avec les sérotypes même dans une étude ciblant la femme enceinte. En Belgique, en 2013, chez les femmes enceintes, le ST-17 était le plus fréquemment associé avec le sérotype III [69]. D'après la même revue systématique que cité précédemment qui retrace la colonisation vaginale du *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes entre 2017 et 2020 à travers le monde entier, le ST-17 était également le plus souvent associé avec le sérotype III. Concernant les autres sérotypes, d'après cette étude, le ST-23 est le plus souvent associé au sérotype Ia et le ST-1 est le plus souvent associé au sérotype V [75]. En Belgique, en 2023, le ST-17 est également le plus fréquemment associé au sérotype III. De même pour le ST-23 et le sérotype Ia ainsi que le ST-1 et le sérotype V.

4 Distribution des gènes codant pour les protéines de pili

En Belgique, la distribution des gènes codant pour les protéines de pili reste constante au cours des années puisque cette distribution en 2023 n'est pas statistiquement différente par rapport à cette même distribution en 2018 lors d'une étude similaire organisée par le CNR (p-valeur de 0.76 avec le test du χ^2). De fait, en 2018 et en 2023, la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2a* est la plus prévalente chez les femmes enceintes. Suivie de près par l'expression seule du gène *PI-2a* dans cette population. Ces mêmes résultats sont observés dans l'étude réalisée par le CNR en 2013. En revanche, en 2013, 2018 et en 2023 le gène *PI-1* n'est jamais exprimé seul [68][69]. Une hypothèse peut être émise sur le fait que cette protéine manquerait de virulence quant à la colonisation du GBS et donc une expression seule de cette protéine chez la bactérie lui sera défavorable. En parcourant la littérature, cette hypothèse se confirme puisqu'il est rare de trouver une étude attestant de l'expression seule de ce gène. D'après la même revue systématique que citée précédemment qui retrace la colonisation vaginale du *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes entre 2017 et 2020 à travers le monde entier, les données concernant les gènes des protéines de pili sont identiques aux résultats obtenus dans cette étude [75]. Par conséquent, la distribution des gènes des protéines de pili au sein des GBS colonisant la femme enceinte semble rester constante au cours des années ainsi qu'à travers le monde entier.

5 Distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes

Concernant la distribution des gènes codant pour les protéines de pili selon les sérotypes au sein des GBS colonisant la femme enceinte entre les études réalisées par le CNR en 2018 et 2023, celle-ci est statistiquement constante entre les années (Test exact de Fisher avec une p-valeur > 0.05) excepté la distribution des gènes des protéines de pili au sein du sérotype IX qui est statistiquement différente entre les deux années (test exact de Fisher avec une p-valeur de 0.002). En 2018, l'entièreté des souches étant caractérisées par le sérotype IX expriment le gène *PI-2a* alors qu'en 2023 l'entièreté de ces souches expriment les gènes *PI-1*, *PI-2a*. En 2023, une dominance du gène *PI-2a* peut être observée au sein du sérotype Ia. Au sujet de la combinaison des gènes *PI-1*, *PI-2a*, celle-ci est présente et la plus fréquente au sein de nombreux sérotypes à savoir les sérotypes Ib, II, IV, V et VI. Concernant le sérotype III, c'est la combinaison *PI-1*, *PI-2b* qui se retrouve le plus [68][69]. Ces résultats sont appuyés par les données recensées dans la même revue systématique que citée précédemment qui retrace la colonisation vaginale du *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes entre 2017 et 2020 à travers le monde entier puisque les sérotypes Ia et III sont, respectivement, les plus associés avec les gènes *PI-2a* et *PI-1*, *PI-2b* [75]. Une seconde étude retraçant également la colonisation vaginale du *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes en 2013 (autre que celle réalisée au CHU de Liège) consolide également les

résultats précédemment abordés. Cette étude souligne également l'importance de la distribution des protéines de pili selon le sequence type. En effet, dans cette étude en 2013 et dans notre étude en 2023, le ST-19 est exclusivement associé avec la combinaison *PI-1*, *PI-2a*. Concernant le ST-23, celui-ci est quasi exclusivement associé au gène *PI-2a* [20]. En regard de toutes les données analysées, la combinaison *PI-1*, *PI-2a* pourrait constituer une bonne cible pour le développement d'un vaccin contre le GBS chez la femme enceinte. En effet, retrouver *PI-1* et *PI-2a* dans presque tous les sérotypes avec une fréquence totale de 94.79% (n = 291) et plus particulièrement dans les sérotypes les plus fréquents mène à la conclusion que ces gènes sont adaptés pour de multiples background génétiques et ce vaccin conférerait donc une bonne couverture dans la population des femmes enceintes. Un vaccin ciblant l'unité protéique constitutrice des pili est déjà en cours de développement pour d'autres streptocoques notamment le streptocoque du groupe A [76].

6 Gènes des facteurs de virulence

6.1 Protéines alpha-like

Les protéines de la famille alpha-like constituent des facteurs de virulence importants et intéressants à surveiller épidémiologiquement étant donné qu'un vaccin ciblant ces protéines est en cours de développement par la firme Minervax (cf. 7 Immunoprophylaxie). En effet, ce vaccin cible les protéines alp1, alp2, alp3, ACP et Rib. Ces protéines se lient aux cellules épithéliales du cervix permettant la colonisation de celui-ci. D'après une étude réalisée sur les souches invasives de GBS aux Etats Unis entre 2015 et 2017 et une revue de la littérature, au moins un gène codant pour ces protéines est présent dans le génome de 99.2% des GBS [77]. Dans notre étude réalisée en 2023, seulement 55.05% (n = 169) des GBS expriment au moins un gène d'une protéine de cette famille. Cette fréquence est significativement différente entre les deux études. En revanche, dans les 55.05% de notre étude, n'ont pas été pris en compte les facteurs détectés en dessous du seuil. Si ceux-là sont pris en compte 98.7% (n = 303) des souches possèdent au moins un gène de ces protéines. Cela constitue donc un biais et nécessite de plus amples investigations afin de réellement conclure sur la fréquence de la présence de ces protéines dans la paroi des GBS. Le gène de la protéine ACP n'a pas été analysé dans notre étude. Une analyse de ce gène sera également nécessaire afin de réellement conclure sur cette fréquence. Étonnamment le gène de la protéine Rib n'est exprimé par aucune des bactéries incluses dans notre étude. D'après la même étude que citée précédemment réalisée aux états Unis sur les GBS invasifs, le gène de la protéine Rib est exprimé par 22.2% des GBS. De plus, le domaine N-terminal de la protéine Rib a développé un mécanisme de résistance contre les protections de l'hôte. Cela confirmerait que cette protéine est importante pour l'infection de l'hôte. Une hypothèse serait que la protéine Rib ne soit pas exprimée par les GBS colonisant mais uniquement par les GBS responsable d'infections invasives ce

qui expliquerait son absence dans le cadre de notre étude [47].

6.2 Adhésines

6.2.1 Protéines Srr

Les protéines Srr font partie de la famille des adhésines et lient le fibrinogène ce qui permet l'adhésion aux cellules épithéliales vaginales et in fine, l'invasion de celles-ci. Dans la littérature, peu d'informations sont disponibles quant à la distribution épidémiologique de leur gène. En revanche, certaines informations restent communes à travers plusieurs études réalisées dans différents pays au cours de plusieurs années. En effet, le gène de la protéine Srr1 serait exprimé par la majorité des GBS avec une fréquence de 73.81% dont une expression majeure par les souches possédant le sérotype Ia. Ces faits sont également observés dans notre étude, puisque 74.59% (n = 229) des souches expriment le gène de la protéine Srr1 ainsi que 100% (n = 53) des souches caractérisées par le sérotype Ia. Concernant le gène de la protéine Srr2, celle-ci est presque exclusivement exprimée par les souches possédant le sérotype III. En effet, dans notre étude en 2023, 82.46% (n = 47) des gènes de la protéine Srr2 sont retrouvés dans le génome des souches étant caractérisé par le sérotype III. C'est d'ailleurs cette protéine qui rend, en partie, la souche sérotype III/ST-17 virulente. Nos données concernant ces gènes comptabilisent la proportion des facteurs détectés en dessous du seuil acceptable [15][78][79].

6.2.2 Protéines Fbs

Liant également le fibrinogène, les protéines Fbs permettent la colonisation vaginale par adhésion de ces protéines aux cellules épithéliales. Dans cette famille de protéines, se trouvent les protéines FbsA, FbsB et FbsC. D'après une étude retraçant la colonisation vaginale de la femme enceinte par le GBS entre 2004 et 2014 en Argentine, les gènes de la protéine FbsA et FbsB se retrouvent dans tous les génomes des bactéries analysées. C'est également le cas pour FbsC après analyse de la littérature. Dans notre étude cette observation se confirme puisque que 99.38% (n = 305) des souches possèdent les gènes *FbsA* et *FbsB* ainsi que 100% (n = 307) de ces souches expriment le gène *FbsC*. Nos données comptabilisent la proportion des marqueurs détectés en dessous du seuil acceptable pour les deux protéines FbsA et FbsB [80][81].

6.3 Autres facteurs de virulence

Concernant d'autres facteurs de virulence comme Lmb, ScpB, HylB et CylB, leurs gènes sont présents à une fréquence respective de 97.72% (n = 300), 97.07% (n = 298), 99.67% (n = 306) et 100% (n = 307) dans le génome des GBS inclus dans notre étude. Ces données sont appuyées par l'étude citée précédemment retraçant la colonisation vaginale de la femme enceinte par le GBS entre 2004 et 2014 en Argentine [80]. Quant au gène de la protéine HvgA, celui-ci est quasiment exclusivement retrouvé

dans le génome des GBS caractérisé par le sérotype III [15][77]. En effet, dans notre étude, le gène HvgA est retrouvé avec une fréquence de 82.05% ($n = 32/57$) parmi les souches étant caractérisées par le sérotype III. Finalement, le gène de la protéine SIP se retrouve dans le génome des GBS avec une fréquence de 100% ($n = 307$) dans cette étude. Cette information est intéressante à connaître puisque SIP fait l'objet d'une potentielle cible pour un vaccin. De fait, cette protéine comme antigène, active une immunité croisée chez l'hôte et a déjà fait ses preuves concernant la protection immunitaire contre le GBS dans un modèle animal [26].

7 Résistances

7.1 Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Faisant partie de cette classe, l'érythromycine et la clindamycine, peuvent être utilisés en antibioprofylaxie chez la femme enceinte en cas d'allergie à la pénicilline. En Belgique, à travers les années, une évolution du taux de résistance à l'érythromycine a été mise en évidence. En effet, la résistance à cet antibiotique est statistiquement différente entre les années 2018 et 2023 (p-valeur de 0.045 avec le du $\tilde{\chi}^2$). De ce fait, le taux de résistance à l'érythromycine était de 27.63% en 2018 et augmente à 35.83% ($n = 110$) en 2023. Concernant l'étude similaire sur les GBS de colonisation réalisée au CHU de Liège en 2013, ce taux était de 28.7%. En revanche, la résistance à la clindamycine reste statistiquement constante entre les années 2018 et 2023 (p-valeur de 0.47 avec le du $\tilde{\chi}^2$). En effet, la résistance était de 24.56% en 2018 et augmente légèrement à 27.36% ($n = 84$) en 2023. En 2013, ce taux de résistance était de 26.7% [68][69]. En revanche, deux études réalisées en Pologne et en Iran montrent un taux de résistance à l'érythromycine plus faible aux alentours de 20% mais un taux similaire de résistance à la clindamycine qu'en Belgique en 2013, 2018 et 2023 [82][83].

La distribution des différents phénotypes de résistance MLS reste statistiquement constante à travers les années 2018 et 2023, en Belgique (p-valeur de 0.06 avec le test exact de Fisher). En effet, pour ces deux années, le phénotype cMLS est le plus retrouvé. Même si statistiquement la distribution ne change pas, en 2023, le phénotype M est plus fréquent que le phénotype iMLS ce qui n'était pas le cas en 2018. De plus, le phénotype L n'a pas été observé en 2023 [68]. Ces données sont corroborées par une étude réalisée en Pologne traitant de la colonisation vagino-rectale chez la femme enceinte entre 2016 et 2020 puisque le phénotype cMLS est le plus observé suivi du phénotype M et du phénotype iMLS. En revanche, le phénotype L, lui, est observé dans l'étude polonaise mais à une faible fréquence [82]. La distribution des gènes à travers ces phénotypes peut être analysée. En effet dans notre étude, la présence concomitante des gènes *ErmB* et *ErmC* est la plus observée au sein du phénotype cMLS. Concernant le phénotype iMLS, c'est le gène *ErmTR* qui est le plus observé. Finalement dans le

phénotype M, le gène *MefA* est le plus retrouvé si on prend en compte ces gènes détectés en dessous du seuil. En revanche, par l'existence d'une grande variété de séquences *MefA*, la séquence de référence se trouvant dans le logiciel WGS typer n'est peut-être pas la plus proche des séquences *MefA* des souches étudiées et donc ce marqueur serait détecté comme en-dessous du seuil. La distribution des gènes retrouvés au sein des différents phénotypes de résistance (cMLS, iMLS et M) observée en Belgique en 2018 ainsi qu'en France, en Algérie, en Pologne et en Chine et donc in fine à travers le monde est identique à la distribution de ces gènes en 2023 à l'exception que le gène *ErmB* est trouvé uniquement seul dans ces autres pays. Il est toutefois utile de préciser que ces différentes études ne ciblaient pas le gène *ErmC* [68][84][82][85]. Étonnamment, le gène *MreA* est observé dans le génome de toutes les souches incluses notre étude qu'elles soient résistantes ou non à ces antibiotiques. Les gènes peuvent être présents dans le génome sans être exprimés. Une autre hypothèse serait que ce gène possède une analogie de séquence avec un autre gène présent dans le génome du GBS, peut-être un gène ubiquitaire. Ces deux hypothèses peuvent expliquer la présence du gène *MreA* dans le génome de toutes les souches. Une publication a démontré que le gène *MreA* conférerait une activité métabolique au *Streptococcus agalactiae*, ce qui pourrait expliquer sa présence dans l'entièreté des souches incluses dans cette étude [38]. Quoi qu'il en soit, ce gène ne semble pas être un marqueur judicieux pour la détection de la résistance aux macrolides et sera exclu des prochaines analyses.

Finalement, dans cette étude, certaines souches sensibles expriment certains gènes de résistance comme *ErmB* et *ErmC* en association, *LsaC* et *MefA*. Pour les souches exprimant le gène *LsaC* responsable d'une résistance à la clindamycine, celles-ci ont été identifiées à la limite d'être résistantes par la technique de la diffusion en disque (\varnothing : 17 et 18 mm) ainsi que la méthode de microdilution Sensititre (CMI : 0.5 $\mu\text{g/ml}$) (cf. 6 Antibiogrammes). Ces deux techniques sont dépendantes du manipulateur pour l'analyse des résultats et donc peut être que ces souches étaient tout compte fait résistantes. Il est possible également que les gènes de résistance ne soient pas exprimés mais tout de même bien présents dans le génome.

7.2 β -lactames et céphalosporines

La pénicilline, incluse dans la classe des β -lactames, est utilisée en première intention pour l'antibioprophylaxie à GBS chez la femme enceinte [29]. Dans cette étude, l'entièreté des souches ont été analysées comme sensibles avec la technique de microdilution Sensititre (cf. 6 Antibiogrammes). De plus, d'après Kimura et al. [67], si une résistance est observée par la méthode de diffusion en disque concernant l'oxacilline, le ceftibuten ainsi que le ceftizoxime, les souches correspondantes peuvent présenter une éventuelle diminution de la sensibilité à la pénicilline. Dans cette étude, il a été observé qu'aucune des souches ne possèdent une résistance combinée à ces trois antibiotiques et in fine une

éventuelle diminution de la sensibilité à la pénicilline. Ces résultats sont appuyés par le fait qu'aucune des souches incluses dans l'étude n'exprime la mutation au sein du gène *PBP2x* observée en cas de diminution de la sensibilité à la pénicilline. En Belgique, en 2013 et en 2018, des données équivalentes avaient été observées [68][69]. Au Vietnam, en Afrique et au Brésil, les mêmes constats sont réalisés [73][86][87]. En revanche, certaines souches ont été reportées comme possédant une diminution de la sensibilité à la pénicilline et in fine une éventuelle résistance aux Etats Unis, au Canada, au Japon et en Corée [39]. Il n'est donc pas exclu qu'une résistance à la pénicilline émerge dans les années à venir en Belgique.

Concernant les résultats obtenus pour la céfazoline et l'ampicilline avec la méthode de microdilution Sensititre, ceux-ci mettent en évidence une résistance à ces deux antibiotiques. Normalement, si une résistance à la pénicilline n'est pas observée alors une résistance à ces antibiotiques ne devrait pas l'être non plus. Une erreur de manipulation à certainement du se produire lors de la réalisation de la méthode de microdilution Sensititre. Dans ce cas, il est conseillé de tester la sensibilité à ces antibiotiques avec une méthode alternative comme un E-test ou une PCR.

8 Discussion complémentaire sur l'analyse des données de NGS

Après assemblage des séquences obtenues avec la technique du NGS (cf. 8.2.1.2 NGS) dans le logiciel WGS typer, les marqueurs ciblés dans le génome des bactéries ont pu être déterminés. La séquence de chaque marqueur dans le génome est comparée à la séquence de référence de ce même marqueur. Ceci permet de déterminer si ce facteur est présent ou non dans le génome. En revanche, certains facteurs étaient détectés dans le génome mais en dessous du seuil acceptable. Ce seuil est fixé pour une couverture de plus de 50% et pour une identité de plus de 90% avec le gène de référence correspondant à chaque marqueur. De ce fait, une interrogation se pose sur ces marqueurs détectables en dessous du seuil. Afin de déterminer si ceux-là sont réellement présents ou non, certains facteurs ont été analysés dans plusieurs souches. En effet, les marqueurs détectés en dessous du seuil semblent présents dans le génome de ces souches analysées. Pour un même marqueur, la variabilité entre la séquence présente dans le génome de différentes souches serait à l'origine de ces marqueurs détectés en dessous du seuil. Ceci est avant tout une hypothèse émergeant de tests préliminaires et qui reste à être confirmée. D'autres explications pourraient également convenir sur la présence de ces marqueurs détectés en dessous du seuil acceptable. Afin de clarifier les résultats obtenus avec la technique du NGS, 3 catégories de résultats ont été considérés : 1) Détecté, 2) Détecté en dessous du seuil et 3) Non détecté. Pour une petite minorité de souches (2.6% ; n = 8), un des nombreux marqueurs analysés par souche possédaient plusieurs possibilités (several hits) d'alignement avec le génome de référence du marqueur correspondant. Ces marqueurs ont donc été considérés comme présents dans le génome des

GBS en question. Concernant le sequence type, celui-ci était non identifiable pour une seule souche de l'étude. Une hypothèse serait que cette souche soit caractérisée par un ST non connu à ce jour, la nouvelle combinaison d'allèles ainsi que l'assemblage du génome ont été déposés sur PUBMLST GBS [88]. De plus, 5.86% (n = 18) des souches étaient caractérisées par un ST mais ces souches possédaient des problèmes d'alignements de certains allèles présents dans leur génome avec les allèles présents dans le génome de référence. Ces souches ont donc été considérées avec un ST indéterminé.

9 Conclusion et perspectives

La réalisation de cette étude avait pour but d'actualiser les données épidémiologiques concernant la colonisation par le *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes en Belgique en vue notamment du développement d'un vaccin contre cette bactérie. Pour ce faire, les données concernant le sérotype, le sequence type, les protéines de pili, les facteurs de virulence ainsi que les facteurs de résistance ont été collectées et des conclusions peuvent être tirées. Concernant la distribution des sérotypes, celle-ci est identique à travers les pays de l'Europe puisque les sérotypes Ia, Ib, II, III, IV et V reste les plus répandus chez les femmes enceintes étant colonisées par le GBS. Ce constat est prometteur pour l'efficacité de protection du vaccin ciblant les sérotypes (Ia, Ib, II, III, IV et V) en cours de développement. Concernant la distribution des sequence types et des gènes codant pour les protéines de pili, cette dernière semble rester constante à travers les années et les différents pays. Les facteurs de virulence, eux, semblent également constants dans le temps et dans les pays. Cette analyse est aussi prometteuse pour le corrélat de protection fourni par un vaccin en cours de développement ciblant un des facteurs de virulence du GBS. Concernant les marqueurs de résistance, leur distribution n'évolue pas significativement au cours des années et des pays. Finalement, au sujet des résistances phénotypiques, celles-ci restent constantes à l'exception de la résistance à l'érythromycine qui augmente légèrement avec les années. En revanche, aucun phénomène de résistance n'est observé pour la pénicilline, elle reste donc l'antibioprophylaxie de choix pour le traitement du GBS.

En revanche, des limitations existent concernant cette étude. Une interrogation persiste au sujet des facteurs détectés en dessous du seuil acceptable par le logiciel WGS typer. En effet, Il n'est pas certain que ces facteurs soient réellement présents dans le génome des bactéries. En perspective, une analyse en profondeur concernant ces facteurs doit être réalisée afin de déterminer leur réelle présence ou non dans le génome pour confirmer ou infirmer les hypothèses émises dans le cadre de ce travail.

Bibliographie

- [1] AQ ISMAIL et al. “Cow’s milk and the emergence of group B streptococcal disease in newborn babies”. In : Neonatology 100.4 (2011), p. 404-408. DOI : 10.1159/000328700.
- [2] MEVACP. History and biology of Streptococcus agalactiae. <https://maidenlab.zoo.ox.ac.uk/history-and-biology-istreptococcus-agalactiae>. Consulté le 9 novembre 2023.
- [3] M-F LARTIGUE, C POYART et A TAZI. Streptococcus agalactiae. 2019.
- [4] A SAGAR. Streptococcus agalactiae - An Overview. <https://microbenotes.com/streptococcus-agalactiae/>. Consulté le 10 novembre 2023. 2022.
- [5] A KINET-POLEUR. “Détermination des "Sequence Types" au sein d’une population de Streptococcus agalactiae isolés du tractus génital chez la femme enceinte en Belgique, en 2018”. Mémoire de master. Université de Liège, 2019-2020.
- [6] AC ANDRÉ, L DEBANDE et BS MARTEYN. “The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection”. In : Cell Microbiol 23.8 (2021), e13338. DOI : 10.1111/cmi.13338.
- [7] SY LECLERCQ et al. “Pathogenesis of Streptococcus urinary tract infection depends on bacterial strain and -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence”. In : Sci Rep 6 (2016). Published 2016 Jul 7, p. 29000. DOI : 10.1038/srep29000.
- [8] SD ELLIOT. “Rebecca Craighill Lancefield, 1895-1981”. In : J Gen Microbiol 126.1 (1981), p. 1-4. DOI : 10.1099/00221287-126-1-1.
- [9] S JOSH. “Bacterial Infections of the Equine Respiratory Tract”. In : Equine Respiratory Medicine and Surgery. Sous la dir. de Bruce C. MCGORUM et al. W.B. Saunders, 2007, p. 327-353. DOI : 10.1016/B978-0-7020-2759-8.50028-3.
- [10] K PATRON. “Caractérisation de l’opéron métabolique fru2 de Streptococcus agalactiae : phylogénie, induction, et régulation”. Thèse de doct. Université Francois - Rabelais de Tours, 2015.
- [11] ThermoFisher SCIENTIFIC. Coffret Pour Groupage Des Streptocoques.

- [12] Centre National de RÉFÉRENCE (CNR-NRC) S.AGALACTIAE (GBS). Détermination du type de polysaccharides capsulaires. Techniques disponibles. Consulté le 8 janvier 2024. 2024. URL : https://www.chuliege.be/jcms/c2_17561209/centre-national-de-referance-cnr-nrc-s-agalactiae-gbs/determination-du-type-de-polysaccharides-capsulaires.
- [13] Dr.Sc. Sacheli S et Prof. Melin P. Rapport d'activités CNR-GBS 2018. 2018.
- [14] MICROBIOLOGIEMEDICALE.FR. Gélose au sang et gélose au sang + ANC. Consulté le 19 février 2024. 2024. URL : <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-au-sang/>.
- [15] Y LIU et J LIU. "Group B Streptococcus : Virulence Factors and Pathogenic Mechanism". In : Microorganisms 10.12 (2022). Published 2022 Dec 15, p. 2483. DOI : 10 . 3390 / microorganisms10122483.
- [16] AI KVAM et al. "Streptococcus agalactiae alpha-like protein 1 possesses both cross-reacting and Alp1-specific epitopes". In : Clin Vaccine Immunol 18.8 (2011), p. 1365-1370. DOI : 10 . 1128 / CVI . 05005 - 11.
- [17] RT MAVENYENGWA, JA MAELAND et SR MOYO. "Serotype markers in a Streptococcus agalactiae strain collection from Zimbabwe". In : Indian J Med Microbiol 28.4 (2010), p. 313-319. DOI : 10.4103/0255-0857.71819.
- [18] A DOBRUT et M BRZYCHCZY-WŁOCH. "Immunogenic Proteins of Group B Streptococcus- Potential Antigens in Immunodiagnostic Assay for GBS Detection". In : Pathogens 11.1 (2021). Published 2021 Dec 31, p. 43. DOI : 10.3390/pathogens11010043.
- [19] S JIANG et al. "Regulation and function of pilus island 1 in group B streptococcus". In : J Bacteriol 194.10 (2012), p. 2479-2490. DOI : 10.1128/JB.00202-12.
- [20] ER MARTINS et al. "Distribution of pilus islands in Streptococcus agalactiae that cause human infections : insights into evolution and implication for vaccine development". In : Clin Vaccine Immunol 20.2 (2013), p. 313-316. DOI : 10.1128/CVI.00529-12.
- [21] S EGREK. "Evaluation du séquençage à haut débit (NGS) combiné à un outil bioinformatique pour la caractérisation complète de l'infection au streptococcus agalactiae et le remplacement des méthodes actuellement utilisées par le laboratoire". Mémoire de master. Université de Liège, 2021.
- [22] R MU et al. "Identification of a group B streptococcal fibronectin binding protein, SfbA, that contributes to invasion of brain endothelium and development of meningitis". In : Infect Immun 82.6 (2014), p. 2276-2286. DOI : 10.1128/IAI.01559-13.

- [23] CA PRITZLAFF et al. “Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B Streptococcus”. In : Mol Microbiol 39.2 (2001), p. 236-247. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2001.02211.x.
- [24] DH BECHHOFFER et MP DEUTSCHER. “Bacterial ribonucleases and their roles in RNA metabolism”. In : Crit Rev Biochem Mol Biol 54.3 (2019), p. 242-300. DOI : 10.1080/10409238.2019.1651816.
- [25] DR BOER, JA RUIZ-MASÓ, M RUEDA et al. “Conformational plasticity of RepB, the replication initiator protein of promiscuous streptococcal plasmid pMV158”. In : Sci Rep 6 (2016). Published 2016 Feb 15, p. 20915. DOI : 10.1038/srep20915.
- [26] YY YAO, DD CHEN, ZW CUI et al. “Oral vaccination of tilapia against Streptococcus agalactiae using Bacillus subtilis spores expressing Sip”. In : Fish Shellfish Immunol 86 (2019), p. 999-1008. DOI : 10.1016/j.fsi.2018.12.060.
- [27] Z MA, X YIN, P WU et al. “The Recombinant Expression Proteins FnBP and ClfA From Staphylococcus aureus in Addition to GapC and Sip From Streptococcus agalactiae Can Protect BALB/c Mice From Bacterial Infection”. In : Front Vet Sci 8 (2021). Published 2021 Jun 24, p. 666098. DOI : 10.3389/fvets.2021.666098.
- [28] S LANDWEHR-KENZEL et P HENNEKE. “Interaction of Streptococcus agalactiae and Cellular Innate Immunity in Colonization and Disease”. In : Front Immunol 5 (2014). Published 2014 Oct 29, p. 519. DOI : 10.3389/fimmu.2014.00519.
- [29] P MELIN. “Chapitre 42 GBS”. In : Guide de consultation prénatale. De Boeck Supérieur SA, 2022.
- [30] OMS. Un vaccin est nécessaire d’urgence pour prévenir les infections mortelles à GBS. Consulté le 18 février 2024. 2021. URL : <https://www.who.int/fr/news/item/02-11-2021-urgent-need-for-vaccine-to-prevent-deadly-group-b-streptococcus>.
- [31] BIORENDER.COM. Created with BioRender.com. URL : <https://www.biorender.com>.
- [32] A NAVARRO-TORNÉ et al. “Burden of invasive group B Streptococcus disease in non-pregnant adults : A systematic review and meta-analysis”. In : PLoS One 16.9 (2021). Published 2021 Sep 30, e0258030. DOI : 10.1371/journal.pone.0258030.
- [33] K STEPHENS, DS CHARNOCK-JONES et GCS SMITH. “Group B Streptococcus and the risk of perinatal morbidity and mortality following term labor”. In : Am J Obstet Gynecol 228.5S (2023), S1305-S1312. DOI : 10.1016/j.ajog.2022.07.051.
- [34] AK JOHRI, LC PAOLETTI, P GLASER et al. “Group B Streptococcus : global incidence and vaccine development”. In : Nat Rev Microbiol 4.12 (2006), p. 932-942. DOI : 10.1038/nrmicro1552.

- [35] HT JORDAN, MM FARLEY, A CRAIG et al. “Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease : a multistate, population-based analysis”. In : Pediatr Infect Dis J 27.12 (2008), p. 1057-1064. DOI : 10.1097/INF.0b013e318180b3b9.
- [36] NM ALOTAIBI, S ALROQI, A ALHARBI et al. “Clinical Characteristics and Treatment Strategies for Group B Streptococcus (GBS) Infection in Pediatrics : A Systematic Review”. In : Medicina (Kaunas) 59.7 (2023). Published 2023 Jul 9, p. 1279. DOI : 10.3390/medicina59071279.
- [37] KM PUOPOLO et al. “Management of Infants at Risk for Group B Streptococcal Disease [published correction appears in Pediatrics. 2019 Oct ;144(4) :]” in : Pediatrics 144.2 (2019), e20191881. DOI : 10.1542/peds.2019-1881.
- [38] G CLAREBOUT, C VILLERS et R LECLERCQ. “Macrolide resistance gene mreA of Streptococcus agalactiae encodes a flavokinase”. In : Antimicrob Agents Chemother 45.8 (2001), p. 2280-2286. DOI : 10.1128/AAC.45.8.2280-2286.2001.
- [39] K HAYES, F O’HALLORAN et L COTTER. “A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus : the story so far”. In : Crit Rev Microbiol 46.3 (2020), p. 253-269. DOI : 10.1080/1040841X.2020.1758626.
- [40] CENTRE BELGE D’INFORMATION PHARMACOTHERAPEUTIQUE (CBiP). Gentamicine. REPERTOIRE COMMENTE DES MEDICAMENTS. Consulté le 19 janvier 2024. 2024. URL : https://www.cbip.be/fr/chapters/12?expand_positioning=1&frag=9977&view=pvt&vmp_group=14563.
- [41] S GARNEAU-TSODIKOVA et KJ LABBY. “Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics : Overview and Perspectives”. In : Medchemcomm 7.1 (2016), p. 11-27. DOI : 10.1039/C5MD00344J.
- [42] G JAIMEE et PM HALAMI. “High level aminoglycoside resistance in Enterococcus, Pediococcus and Lactobacillus species from farm animals and commercial meat products”. In : Ann Microbiol 66 (2016), p. 101-110. DOI : 10.1007/s13213-015-1086-1.
- [43] M ZAKERIFAR et al. “Antibiotic resistance genes and molecular typing of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women”. In : BMC Pregnancy Childbirth 23.1 (jan. 2023), p. 43. DOI : 10.1186/s12884-023-05380-4.
- [44] R CRETJ et al. “Laboratory breakpoints for assessing high level gentamicin resistance in Streptococcus agalactiae : it is the time for a consensus”. In : Clin Microbiol Infect 28.8 (2022), p. 1050-1052. DOI : 10.1016/j.cmi.2022.04.011.
- [45] C BANKS et al. “Preclinical development of a novel Group B Streptococcus (GBS) vaccine candidate for maternal immunization based upon the alpha-like protein family of GBS surface proteins (Alp)”. In : Birth Defects Res 115.9 (2023), p. 933-944. DOI : 10.1002/bdr2.2173.

- [46] SA MADHI, AS ANDERSON, J ABSALON et al. “Potential for Maternally Administered Vaccine for Infant Group B Streptococcus”. In : N Engl J Med 389.3 (2023), p. 215-227. DOI : 10.1056/NEJMoa2116045.
- [47] M GONZALEZ-MIRO, A PAWLOWSKI, J LEHTONEN et al. “Safety and immunogenicity of the group B streptococcus vaccine AlpN in a placebo-controlled double-blind phase 1 trial”. In : iScience 26.3 (fév. 2023), p. 106261. DOI : 10.1016/j.isci.2023.106261.
- [48] BD. BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood. MODE D’EMPLOI. 2013.
- [49] BD. BD Columbia CAN Agar with 5% Sheep Blood. MODE D’EMPLOI. 2013.
- [50] S BONTEMS. Procédure de mise en culture des GBS sur milieux sélectifs (MBA.DSB.ANA). Vivaldi (Logiciel institutionnel du CHU de Liège). 2018.
- [51] EG GIL et al. “Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women”. In : J Clin Microbiol 37.8 (1999), p. 2648-2651. DOI : 10.1128/JCM.37.8.2648-2651.1999.
- [52] BD. BD Group B Streptococcus Differential Agar (Granada Medium). MODE D’EMPLOI. 2013.
- [53] A TAZI et al. “Evaluation du nouveau milieu chromogène StrepB Select pour le dépistage anténatal des streptocoques du groupe B chez la femme enceinte [Evaluation of the new chromogenic medium StrepB Select for screening of group B Streptococcus in pregnant women]”. In : Pathol Biol (Paris) 57.3 (2009), p. 225-228. DOI : 10.1016/j.patbio.2008.09.002.
- [54] BIO-RAD. StrepBSelect Agar. Consulté le 22 novembre 2023. 2023. URL : <https://www.bio-rad.com/en-be/product/strepbselect-agar?ID=OMERQBKG4>.
- [55] S. BONTEMS. Annexe de procédure de microbiologie clinique (MIC.IDMALDI.ANA.A07). Vivaldi (Logiciel institutionnel du CHU de Liège). 2020.
- [56] Nitin SINGHAL et al. “MALDI-TOF mass spectrometry : an emerging technology for microbial identification and diagnosis”. In : Frontiers in Microbiology 6 (2015). Published 2015 Aug 5, p. 791. DOI : 10.3389/fmicb.2015.00791. URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00791/full>.
- [57] BIOMÉRIEUX. Granada Agar. Consulté le 24 décembre 2023. 2023. URL : <https://www.biomerieux-culturemedia.com/product/12-granada-agar>.
- [58] L. BALESTRA. Le diagnostic syndromique des méningites et méningoencéphalites infectieuses. 2020.

- [59] S. T. PARK et J. KIM. “Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing”. In : International Neurourology Journal 20.Suppl 2 (2016), S76-S83. DOI : 10.5213/inj.1632742.371.
- [60] B. E. SLATKO, A. F. GARDNER et F. M. AUSUBEL. “Overview of Next-Generation Sequencing Technologies”. In : Current Protocols in Molecular Biology 122.1 (2018), e59. DOI : 10.1002/cpmb.59.
- [61] ILLUMINA. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
- [62] B. KURT. Étude nationale belge sur la prévalence de la résistance à la terbinafine. Mémoire de master. Université de Liège. 2022-2023. 2023.
- [63] ILLUMINA. FASTQ files explained. Consulté le 1 janvier 2024. URL : <https://knowledge.illumina.com/software/general/software-general-reference-material-list/000002211>.
- [64] ILLUMINA. Measuring sequencing accuracy. Consulté le 01/01/2024. URL : <https://illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>.
- [65] S. SUAREZ, X. NASSIF et A. FERRONI. “Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique [Applications of MALDI-TOF technology in clinical microbiology]”. In : Pathologie Biologie (Paris) 63.1 (2015), p. 43-52. DOI : 10.1016/j.patbio.2014.10.002.
- [66] PM RANEY et al. “Investigation of inducible clindamycin and telithromycin resistance in isolates of beta-hemolytic streptococci”. In : Diagn Microbiol Infect Dis 55.3 (2006), p. 213-218. DOI : 10.1016/j.diagmicrobio.2006.01.013.
- [67] K KIMURA, J WACHINO, H KUROKAWA et al. “Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility [published correction appears in J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3) :1016]”. In : J Clin Microbiol 47.12 (2009), p. 4154-4157. DOI : 10.1128/JCM.02063-08.
- [68] S DOUILLEZ. “Phenotypic and molecular characterization of strains of Streptococcus agalactiae isolated from vaginal colonization in Belgium, in 2018”. Mémoire de master. Université de Liège, 2019-2020.
- [69] R SACHELI et al. Update of the characteristics of Group B Streptococci (GBS) colonizing pregnant women. Poster presentation. 2017.
- [70] EM HUEBNER, MJ GUDJÓNSDÓTTIR, MB DACANAY et al. “Virulence, phenotype and genotype characteristics of invasive group B Streptococcus isolates obtained from Swedish pregnant women and neonates”. In : Ann Clin Microbiol Antimicrob 21.1 (2022). Published 2022 Oct 13, p. 43. DOI : 10.1186/s12941-022-00534-2.

- [71] HC SLOTVED et al. “The serotype distribution of *Streptococcus agalactiae* (GBS) carriage isolates among pregnant women having risk factors for early-onset GBS disease : a comparative study with GBS causing invasive infections during the same period in Denmark”. In : BMC Infect Dis 21.1 (2021). Published 2021 Nov 1, p. 1129. DOI : 10.1186/s12879-021-06820-2.
- [72] C GENOVESE et al. “*Streptococcus agalactiae* in pregnant women : serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy)”. In : Eur J Clin Microbiol Infect Dis 39.12 (2020), p. 2387-2396. DOI : 10.1007/s10096-020-03992-8.
- [73] C MEEUX et al. Prevalence and capsular-polysaccharide type distribution of colonizing group B streptococci. Poster presentation. Cape Town, South Africa, 2018.
- [74] CS LACHENAUER, DL KASPER, J SHIMADA et al. “Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women”. In : J Infect Dis 179.4 (1999), p. 1030-1033. DOI : 10.1086/314666.
- [75] F. BIANCHI-JASSIR, P. PAUL, K. N. TO et al. “Systematic review of Group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates”. In : Vaccine 38.43 (2020), p. 6682-6694. DOI : 10.1016/j.vaccine.2020.08.052.
- [76] JMS LOH, T RIVERA-HERNANDEZ, R MCGREGOR et al. “A multivalent T-antigen-based vaccine for Group A *Streptococcus*”. In : Sci Rep 11.1 (2021). Published 2021 Feb 23, p. 4353. DOI : 10.1038/s41598-021-83673-4.
- [77] L MCGEE, S CHOCHUA, Z LI et al. “Multistate, Population-Based Distributions of Candidate Vaccine Targets, Clonal Complexes, and Resistance Features of Invasive Group B Streptococci Within the United States, 2015-2017”. In : Clin Infect Dis 72.6 (2021), p. 1004-1013. DOI : 10.1093/cid/ciaa151.
- [78] M GIZACHEW, M TIRUNEH, F MOGES et al. “Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women and newborns at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital, Northwest Ethiopia”. In : BMC Infect Dis 20.1 (2020). Published 2020 Jan 13, p. 35. DOI : 10.1186/s12879-020-4776-7.
- [79] J RODGUS, R PRAKAPAITE, P MITSIDIS et al. “Molecular Epidemiology of Group B Streptococci in Lithuania Identifies Multi-Drug Resistant Clones and Sporadic ST1 Serotypes Ia and Ib”. In : Pathogens 11.9 (2022). Published 2022 Sep 17, p. 1060. DOI : 10.3390/pathogens11091060.
- [80] FJ BOBADILLA, MG NOVOSAK, IJ CORTESE et al. “Prevalence, serotypes and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women with 35-37 weeks of gestation”. In : BMC Infect Dis 21.1 (2021). Published 2021 Jan 14, p. 73. DOI : 10.1186/s12879-020-05603-5.

- [81] M BUSCETTA, S PAPASERGI, A FIRON et al. “FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions”. In : J Biol Chem 289.30 (2014), p. 21003-21015. DOI : 10.1074/jbc.M114.553073.
- [82] D KAMIŃSKA, M RATAJCZAK, DM NOWAK-MALCZEWSKA et al. “Macrolide and lincosamide resistance of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women in Poland”. In : Sci Rep 14.1 (2024). Published 2024 Feb 16, p. 3877. DOI : 10.1038/s41598-024-54521-y.
- [83] F KHADEMI et A SAHEBKAR. “Group B streptococcus drug resistance in pregnant women in Iran : a meta-analysis”. In : Taiwan J Obstet Gynecol 59.5 (2020), p. 635-642. DOI : 10.1016/j.tjog.2020.07.002.
- [84] A BERGAL et al. “Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of *Streptococcus agalactiae* clinical isolates from Guelma, Algeria and Marseille, France”. In : Eur J Clin Microbiol Infect Dis 34.12 (2015), p. 2339-2348. DOI : 10.1007/s10096-015-2487-6.
- [85] Z CHENG, P QU, P KE et al. “Antibiotic Resistance and Molecular Epidemiological Characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Pregnant Women in Guangzhou, South China”. In : Can J Infect Dis Med Microbiol 2020 (2020). Published 2020 Apr 30, p. 1368942. DOI : 10.1155/2020/1368942.
- [86] SC MELO, NC SANTOS, M OLIVEIRA et al. “Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women”. In : Rev Inst Med Trop Sao Paulo 58 (2016). Published 2016 Nov 3, p. 83. DOI : 10.1590/S1678-9946201658083.
- [87] JY BOLUKAOTO, CM MONYAMA, MO CHUKWU et al. “Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa”. In : BMC Res Notes 8 (2015). Published 2015 Aug 20, p. 364. DOI : 10.1186/s13104-015-1328-0.
- [88] PUBMLST. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. <https://pubmlst.org/>. Consulté le 4 juin 2024.

Annexes



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE LIEGE
Service de microbiologie clinique

Centre National de Référence *Streptococcus agalactiae* (groupe B)



Direction
Professeur Pierrette Melin,
Chef de service

Responsable scientifique
Rosalie Sacheli, Lsc, PhD

Collaborateur scientifique
Pharmacien biologiste Cécile Meex,
Chef de laboratoire

Pierrette.Melin@chuliege.be
R.Sacheli@chuliege.be
C.meex@chuliege.be

Liège, le

Surveillance épidémiologique des streptocoques du groupe B isolés de frottis vagino-rectaux ou vaginaux pendant la grossesse

Cher(e) Collègue,

Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à cette enquête épidémiologique relative à la colonisation génito-rectale par *Streptococcus agalactiae* (ou Streptocoque du groupe B, GBS). Ci-joint, vous trouverez une étiquette avec notre adresse ainsi que 5 milieux de transport pour nous envoyer vos 5 souches de GBS.

Ces milieux de transport sont de simples écouvillons de prélèvement avec leur milieu de transport gélosé.

- **Souches à envoyer :**
5 isolats consécutifs de GBS (doublon exclu) provenant de cultures de dépistage prénatal de GBS sur frottis vagino-rectal.
- **Conservation des souches avant envoi :**
 - Soit à 4°C , après isolement sur une gélose au sang.
 - *Si la conservation est supérieure à 2 semaines avant l'envoi, repiquer les souches toutes les 2 semaines sur une nouvelle gélose au sang.*
 - Soit congelées à -50°C/ -80°C , selon votre système habituel de conservation
- **Préparation de l'envoi :**
A partir de vos souches conservées à +4°C ou congelées, préparer une culture fraîche sur gélose au sang et l'incuber une nuit à 35-37°C. Racler la culture obtenue à l'aide de l'écouvillon de transport fourni et le remettre dans son étui de transport. Dans ces conditions les souches de GBS supportent sans problème les conditions de transport par envoi postal classique.
Bien étiqueter et identifier chaque étui comme décrit ci-après :
Votre CODE Labo (comme pour les EQC ISP) + n° 1 à 5.

Pour toute information complémentaire, nous restons bien entendu à votre disposition.

Dans l'attente de recevoir vos souches, veuillez agréer cher(e) Collègue, l'assurance de nos sentiments les meilleurs,

Pierrette Melin

Rosalie Sacheli

Cécile Meex

Votre CODE Labo

Direction
Professeur Pierrette Melin,
Chef de service

Responsable scientifique
Rosalie Sacheli, Lsc, PhD

Collaborateur scientifique
Pharmacien biologiste Cécile Meex,
Chef de laboratoire

Pierrette.Melin@chuliege.be
R.Sacheli@chuliege.be
C.meex@chuliege.be

Surveillance épidémiologique des streptocoques du groupe B isolés de frottis vagino-rectaux ou vaginaux pendant la grossesse

Cher(e) Collègue,

Les infections néonatales causées par le streptocoque β -hémolytique du groupe B (= GBS, ou *Streptococcus agalactiae*) sont toujours un problème important de santé publique en Belgique et dans le monde. Dans notre pays, la prévention des infections néonatales précoces par administration d'une antibioprofylaxie intra veineuse en intrapartum aux femmes identifiées colonisées par GBS lors d'un dépistage anténatal, fait l'objet depuis 2003 de recommandations du Conseil Supérieur de la Santé. Massivement appliquées, ces recommandations ont permis un bon contrôle des infections néonatales, sans toutefois parvenir à leur éviction totale. Dans le monde, l'impact des infections néonatales à GBS est aussi très important mais les mesures de prévention sont variées ou parfois inexistantes. Leur prévention a été identifiée dans les priorités de santé publique de l'O.M.S. En plus des infections du nouveau-né, précoces et tardives, les infections chez l'adulte présentent également une certaine gravité et restent associées à une mortalité significative.

La mise au point de vaccins pour la prévention des infections à GBS reste plus que jamais une nécessité et requiert une bonne connaissance de l'épidémiologie des souches en circulation dans chaque région du monde.

Dans la continuité des précédentes études de surveillance épidémiologique en Belgique menées en 2002, 2013 et 2018, et en complément des études menées en collaboration avec plusieurs pays étrangers, nous souhaiterions à nouveau vous solliciter afin de récolter des souches de GBS de colonisation génito-rectale chez la femme enceinte isolées dans vos laboratoires, ainsi que quelques informations techniques et épidémiologiques.

Le principe de cette nouvelle **collecte de souches** sera identique à celui utilisé lors de l'enquête de 2002, 2013 et 2018 :

En cas d'accord de participation, nous vous demanderons de collecter prospectivement, 5 souches (consécutives, non dupliquées) de *Streptococcus agalactiae* isolées de frottis vagino-rectaux ou vaginaux réalisés chez des femmes enceintes.

Les souches reçues seront caractérisées par différentes méthodes : génotypage capsulaire, génotypage des pili, et caractérisation de divers facteurs de virulence dont HvgA par séquençage entier du génome (WGS), détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques par microdilution, recherche de toute diminution de sensibilité à la pénicilline par des méthodes combinées, caractérisation des gènes responsables de la résistance à l'érythromycine, à la clindamycine et à d'autres antibiotiques par WGS. Un rapport global détaillé vous sera communiqué à la fin de l'étude.

Pourriez-vous nous **confirmer votre participation pour le 1 septembre 2023 au plus tard** après avoir complété et renvoyé la dernière page de ce courrier.

Dès réception de votre souhait de participer, nous vous enverrons les tubes de transport et un formulaire d'accompagnement des souches.

En espérant recevoir une réponse favorable à notre demande, recevez,
Cher Collègue, nos sincères salutations,

Pierrette Melin

Rosalie Sacheli

Cécile Meex