

GROSSESSE ET PÉRINATALITÉ :
RÔLE DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

(Barème sur 40 points)

Le suivi médical d'une femme enceinte comprend le dépistage de nombreuses infections (toxoplasmose, rubéole, hépatite B, syphilis) selon un calendrier programmé. D'autres infections peuvent survenir au cours d'une grossesse et le laboratoire de microbiologie joue un rôle important dans le diagnostic et le suivi de la grossesse.

1. Diagnostic de la syphilis.

(10 points)

Le dépistage de la syphilis est un test réalisé avant la fin du 3^{ème} mois de grossesse. Cette infection est due à un spirochète : *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*.

1.1 Proposer un schéma structural légendé du genre *Treponema*.

1.2 Indiquer le(s) mode(s) de transmission de la syphilis.

1.3 Décrire les différents stades de la maladie et indiquer les signes cliniques correspondants.

1.4 Le diagnostic biologique de la syphilis repose dans un premier temps sur deux tests sérologiques qualitatifs : VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) et TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination Assay). Dans le cas d'un résultat positif, un test quantitatif est réalisé.

Un extrait de la fiche technique du TPHA quantitatif est donné en **annexe 1**.

1.4.1 Expliquer la notion de test qualitatif.

1.4.2 Présenter le principe du TPHA qualitatif.

la suite d'un test qualitatif positif chez une femme enceinte, un test TPHA semi-quantitatif est réalisé.

1.4.3 À partir de cette annexe, nommer les contrôles qualité à réaliser pour valider la technique et préciser leur composition.

1.4.4 Schématiser l'aspect des cupules dans le cas d'un contrôle qualité positif lide.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Cupules de 1 à 4 : voile uniforme d'hématies recouvrant le fond de la cupule.
- Cupules de 5 à 7 : sédimentation des hématies au fond de la cupule.

1.4.5 Déterminer le titre du sérum en justifiant la réponse.

1.4.6 Interpréter le sérodiagnostic de la syphilis chez cette femme en début de grossesse.

5. Dépistage anténatal d'un streptocoque agalactiae.

2. Diagnostic de la toxoplasmose.

(10,5 points)

La toxoplasmose est une anthroponose cosmopolite très répandue. L'agent pathogène, *Toxoplasma gondii*, est un protozoaire de l'embranchement des sporozoaires et de l'ordre des sarcosporidies.

La toxoplasmose, pathologie normalement asymptomatique chez le sujet sain, devient une infection redoutable chez la femme enceinte. La séroconversion concerne environ 5000 femmes enceintes par an en France. La fréquence de la toxoplasmose congénitale est estimée entre 1 à 2 cas pour 1000 naissances.

2.1 Le cycle de multiplication du toxoplasme est présenté en **annexe 2**.

2.1.1 Identifier les éléments parasitaires numérotés de 1 à 4.

2.1.2 Décrire les étapes (A à E) du cycle évolutif.

2.1.3 Indiquer en justifiant le(s) hôte(s) définitif(s) et intermédiaire(s).

2.2 Une sérologie mensuelle est recommandée pendant la grossesse afin de déterminer le taux d'IgG et d'IgM sériques.

Une patiente consulte son médecin à 12 semaines d'aménorrhée pour sa déclaration de grossesse. La sérologie de la toxoplasmose est négative.

2.2.1 Préciser et justifier les éventuelles mesures prophylactiques à adopter.

2.2.2 Les résultats des sérologies suivantes sont donnés en **annexe 3**. Interpréter ces résultats.

2.2.3 Préciser les conséquences possibles sur le développement du fœtus.

2.3 Le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par utilisation d'une technique d'immuno-empreinte (Western-blot) permet de dépister rapidement les enfants contaminés asymptomatiques afin de les traiter précocement pour réduire le risque de complications. Le diagnostic utilise un test qualitatif par comparaison des profils immunologiques IgG et IgM entre sang maternel et sang du cordon à la naissance. Le mode opératoire du test est donné en **annexe 4**.

2.3.1 Représenter les différentes étapes du test sous forme de schémas annotés.

2.3.2 Préciser le rôle de chaque lavage.

2.3.3 Exploiter les résultats présentés en **annexe 5**.

3. Diagnostic d'une candidose.

(6,5 points)

La candidose vaginale affecte 70 à 75% des femmes au moins une fois dans leur vie. Au cours du 2^{ème} trimestre de la grossesse, une patiente présente les symptômes d'une candidose vaginale.

3.1 La candidose fait partie des infections opportunistes.

3.1.1 Définir « infection opportuniste ».

3.1.2 Citer deux facteurs favorisant la survenue d'une infection opportuniste.

3.1.3 Décrire l'aspect microscopique caractéristique d'un frottis vaginal coloré au Gram dans le cas d'une candidose.

3.1.4 Afin de préciser le diagnostic, le prélèvement a été ensemencé sur une gélose Sabouraud + chloramphénicol. Justifier l'utilisation de ce milieu.

3.2 Après 24 heures d'incubation à 30°C, les colonies obtenues sur gélose Sabouraud + chloramphénicol sont utilisées pour identifier rapidement la souche. Un test de blastèse est effectué.

3.2.1 Donner le mode opératoire du test de blastèse.

3.2.2 Pour la patiente ce test est positif. Décrire le résultat obtenu et conclure.

3.2.3 Citer un autre test rapide permettant de confirmer le diagnostic.

3.3 Lors d'un précédent épisode de candidose, la patiente a été soignée avec une molécule appartenant aux azolés. Afin de s'assurer qu'aucune résistance n'est apparue, le médecin a prescrit un E-test®. L'**annexe 6** montre le résultat de cet E-test® effectué pour le fluconazole.

3.3.1 Indiquer à quelle catégorie de molécules thérapeutiques appartiennent les azolés.

3.3.2 Réaliser la lecture de l'E-test® donné en **annexe 6**. Conclure sachant que la CMI habituelle vis-à-vis du fluconazole d'une souche sensible de l'espèce identifiée est de 1 mg.L-1.

4. Diagnostic des infections à Cytomégalovirus (CMV). (4 points)

L'infection maternelle à CMV est fréquente. Sa transmission interhumaine se fait par les sécrétions oropharyngées, urogénitales et les transfusions de sang non déleucocyté. Le CMV ou HHV-5 est un virus à ADN qui appartient à la famille des *Herpesviridae*.

4.1 Citer les principaux critères permettant la classification des virus.

4.2 Une représentation schématique du CMV est donnée en **annexe 7**. Reporter les numéros sur la copie et légender.

Lors d'une primo-infection maternelle, le risque de contamination fœtale est de 30 à 50%. L'infection à CMV est recherchée sur le liquide amniotique. La culture cellulaire sur fibroblastes humains (MRC5) met en évidence un antigène très précoce du CMV après 24 à 48 heures. Au bout d'un délai de 7 à 21 jours, un effet cytopathique (ECP) apparaît.

4.3 Donner les caractéristiques des deux types de cellules utilisables en culture cellulaire et discuter de leurs intérêts respectifs.

4.4 Ce virus, comme tous les virus de la famille des *Herpesviridae*, est responsable d'infections latentes pouvant se réactiver.

4.4.1 Expliquer le phénomène de latence.

4.4.2 Citer deux facteurs favorisant la réactivation.

5. Dépistage anténatal d'un streptocoque du groupe B ou *Streptococcus agalactiae*. (9 points)

Streptococcus agalactiae est responsable de 30 à 50% des infections bactériennes néonatales. Dans le cadre de la prévention anténatale de ce risque infectieux, la Haute Autorité de Santé (HAS) préconise une recherche systématique du portage vaginal de streptocoque B en fin de grossesse.

5.1 Citer les infections néonatales impliquant *Streptococcus agalactiae*.

5.2 Un prélèvement vaginal réalisé chez une femme enceinte à 36 semaines d'aménorrhée a été isolé sur gélose au sang + ANC. La composition de ce milieu est donnée en **annexe 8**.

5.2.1 Donner les principales caractéristiques de ce milieu ; préciser les conditions d'incubation dans le cadre d'une recherche de *Streptococcus agalactiae*.

5.2.2 Donner l'aspect des colonies suspectes de *Streptococcus agalactiae*.

5.2.3 Donner le principe du test rapide permettant d'aboutir à l'identification d'un *Streptococcus agalactiae* à partir des colonies isolées. ✓

5.2.4 De nombreux laboratoires réalisent actuellement l'isolement sur milieu chromogène. Un extrait de la fiche technique d'un milieu chromogène est donné en **annexe 9**. Exploiter le document en dégageant l'intérêt de ce milieu par rapport à la gélose au sang + ANC.

5.3 Un antibiogramme par méthode de diffusion a été réalisé à partir de colonies de streptocoques B isolées. Les résultats de l'antibiogramme sont donnés ci-dessous :

Nom de l'antibiotique	Diamètre d'inhibition en mm
Oxacilline 5 µg	22
Lévofloxacine	23
Gentamicine 500 µg -	20
Lincomycine	24
Vancomycine	20
Erythromycine	26

20% or

5.3.1 Expliquer, en utilisant l'**annexe 10**, comment évaluer la sensibilité des streptocoques à la pénicilline G. Conclure dans le cas de la souche étudiée.

5.3.2 Les streptocoques possèdent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides (ou aminoglycosides).

5.3.2.1 Donner la cible cellulaire des aminosides.

5.3.2.2 Définir la résistance naturelle.

5.3.2.3 Expliquer le mécanisme de la résistance de bas niveau aux aminosides chez les streptocoques.

5.3.3 L'antibiogramme d'un streptocoque doit permettre de rechercher les souches à haut niveau de résistance aux aminosides.

5.3.3.1 Indiquer comment détecter ces souches sur un antibiogramme standard.

5.3.3.2 Conclure dans le cas de la souche étudiée.

5.3.3.3 Expliquer l'intérêt thérapeutique d'une telle recherche en utilisant

l'**annexe 10**.

ANNEXE 1

TPHA quantitatif réalisé sur le sérum de la femme en début de grossesse

• COMPOSITION DES RÉACTIFS :

Réactif 1 (R1)	Hématies -antigène : suspension d'hématies de poules sensibilisées par des composants solubles de <i>Treponema pallidum</i> , azoture de sodium 1g/L.
Réactif 2 (R2)	Diluant (PBS 0,01mol/L - pH 7,2) Azoture de sodium.
Réactif 3 (R3)	Sérum de contrôle positif (humain) de titre connu indiqué en inverse de dilution sur l'étiquette, soit 320 pour le contrôle utilisé.
Réactif 4 (R4)	Sérum de contrôle négatif (humain).

• MODE OPÉRATOIRE : TEST QUANTITATIF EN PLAQUE DE MICROTITRATION :

- Préparer dans un tube une dilution au 1/40^e du sérum à tester et des sérums contrôles R3 et R4 dans le diluant R2.
- Suivre le schéma décrit dans le tableau ci-dessous :

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7
Réactif 2 (R2) (µL)		50	50	50	50	50	50
Sérum à tester dilué au 1/40 (µL)	50						
Volume transféré (µL)							
Réactif R1 (R1) (µL)	50	50	50	50	50	50	50
Titre du sérum	80	160	320	640	1280	2560	5120

50 µL

• CONTRÔLE QUALITÉ :

Le titre du sérum de contrôle positif (R3) doit présenter un titre égal à la valeur indiquée à +/- une dilution.
Le sérum de contrôle négatif (R4) doit être trouvé négatif.

• LECTURE :

Réaction positive : voile uniforme d'hématies recouvrant le fond de la cupule, pouvant être parfois partiellement rétracté en bordure.

Réaction négative : bouton compact d'hématies au fond de la cupule.

Le titre de l'échantillon correspond à l'inverse de la plus grande dilution finale du sérum, qui fournit un résultat positif.

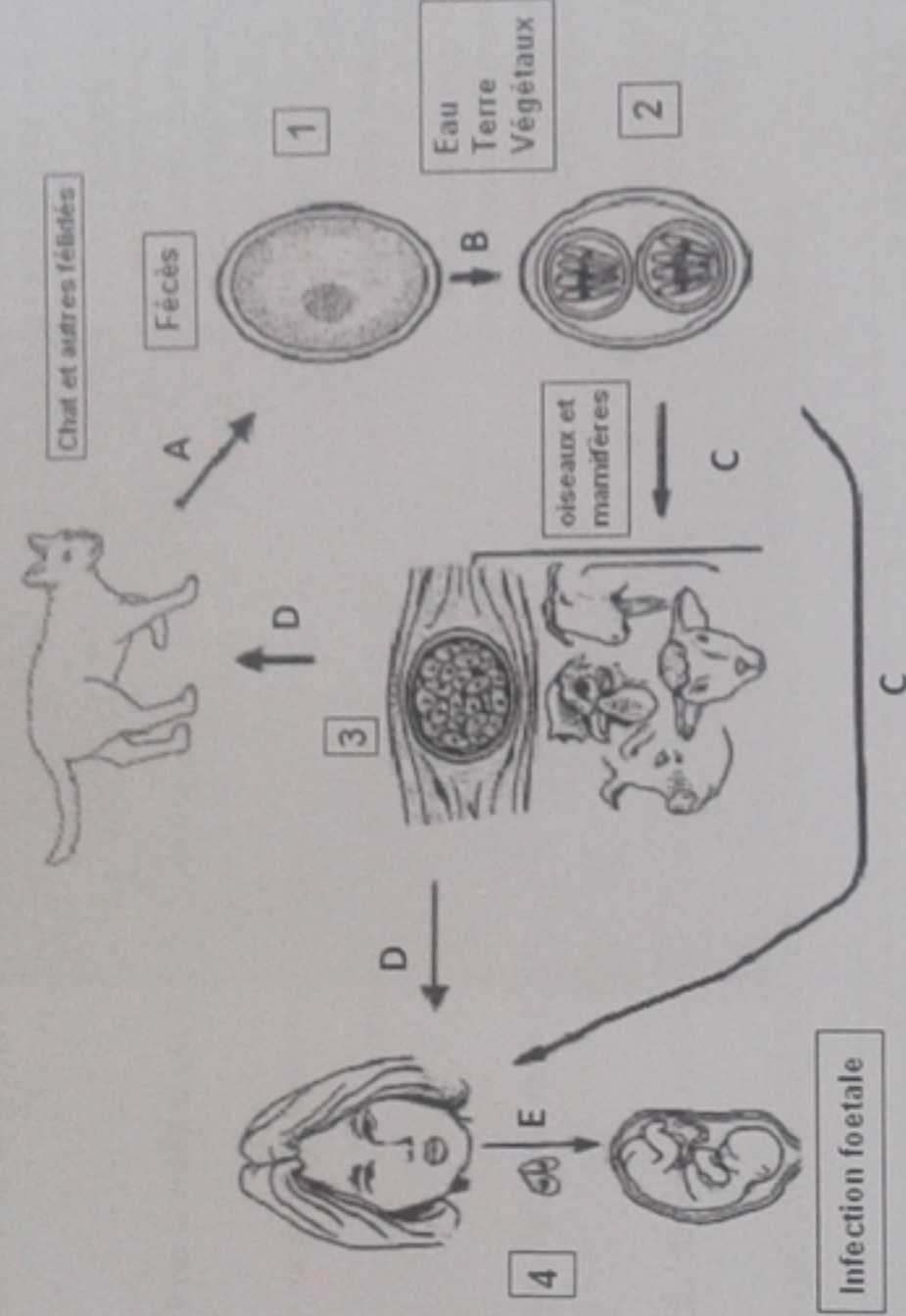
• INTERPRÉTATION :

Un titre du sérum supérieur à 80, lors du test quantitatif, correspond soit à un début de syphilis, soit à la cicatrice sérologique d'une syphilis traitée. Un autre échantillon prélevé plus tardivement doit alors être examiné pour mettre en évidence une éventuelle augmentation du taux d'anticorps.

Extrait de la fiche technique TPHA 100 (BioMérieux ®).

ANNEXE 2

Cycle de multiplication de *Toxoplasma gondii*



ANNEXE 3

Résultats des sérologies de la patiente au cours de la grossesse

Semaines d'aménorrhée	16	20	24
Taux d'IgG	négatif	négatif	positif
Taux d'IgM	négatif	négatif	positif

ANNEXE 4

Fiche technique Immuno-empreinte

Origine et description des bandelettes :

Après lyse du parasite, les antigènes de *Toxoplasma gondii* sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférés à la surface de bandelettes de nitrocellulose (technique du Western blot). Les bandelettes sont fournies prêtes à l'emploi.

Déroulement du test :

- **Immuno-empreinte IgG**
- Incubation séparément de deux bandelettes, chacune avec l'un des sérums dont on veut comparer les profils sérologiques
- **Lavage des bandelettes**
- Incubation des bandelettes avec le conjugué anti-IgG humaines-phosphatase alcaline
- **Lavage**
- Incubation des bandelettes avec un substrat de la phosphatase alcaline
- **Lavage**
- Séchage des bandelettes

- **Immuno-empreinte IgM**

Le test est identique en remplaçant le conjugué précédant par un conjugué anti-IgM humaines-phosphatase alcaline

Lecture et interprétation :

Les bandes antigéniques reconnues par les anticorps anti-toxoplasme de classe IgG ou de classe IgM sont révélées par la formation de bandes transversales violettes.

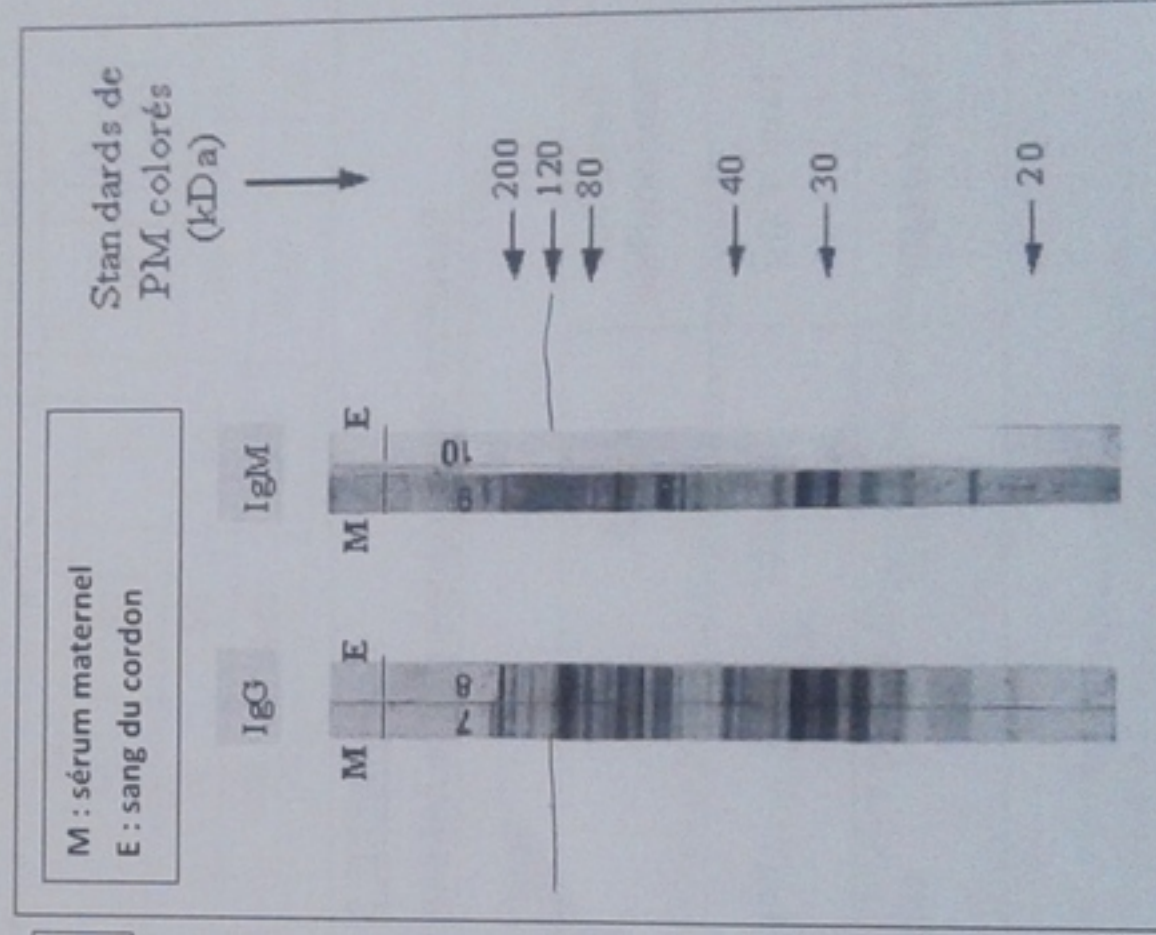
Extrait de la fiche technique *Toxoplasma Western blot IgG-IgM (IDdiagnostics®)*.

ANNEXE 5

Résultat du profil mère – enfant

Toute bande, d'un poids moléculaire (PM) inférieur à 120 kDa et présente **uniquement** chez l'enfant, témoigne de la synthèse par l'enfant d'anticorps antitoxoplasme, en faveur d'une toxoplasmose congénitale

IgG et IgM
chez la
mère
IgG chez
l'enfant



ANNEXE 6

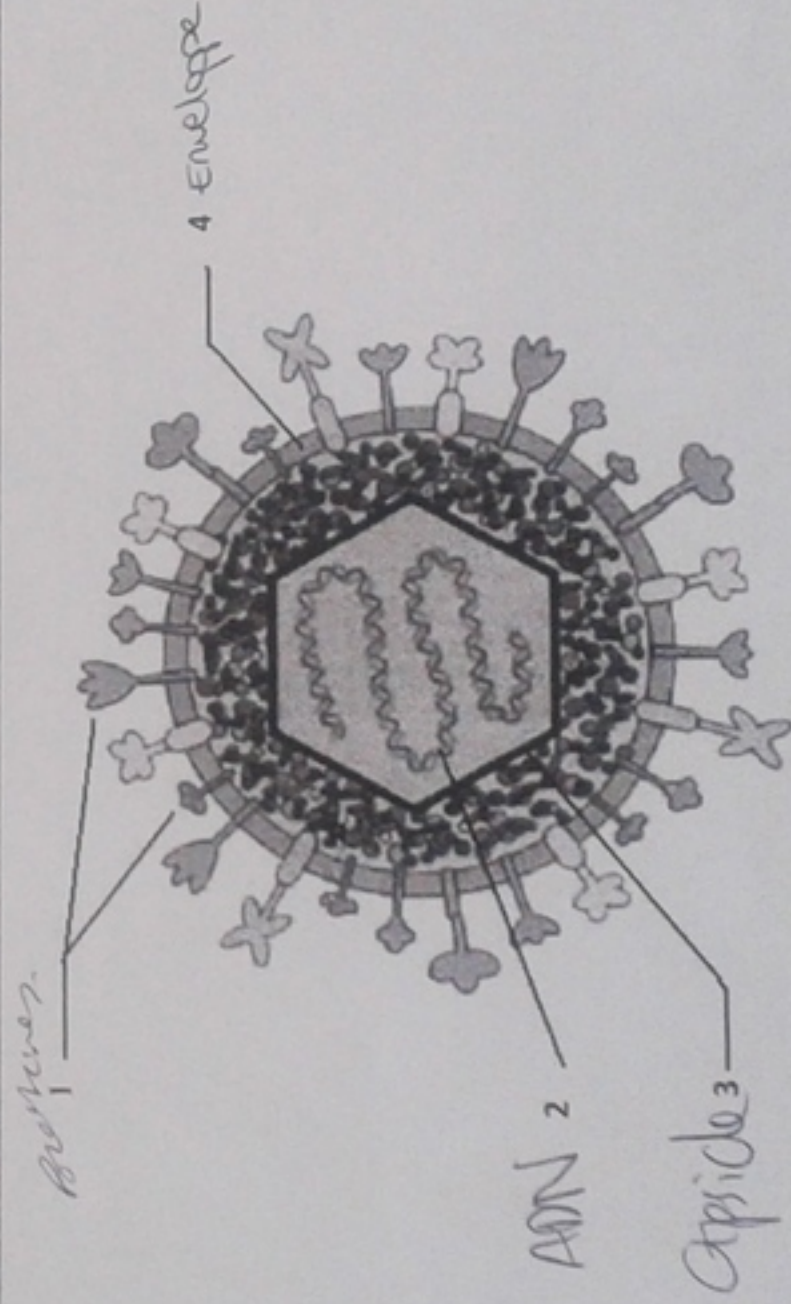
Résultat de l'E-test® effectué pour le fluconazole



Les valeurs indiquées sur la bandelette sont en mg.L^{-1}

ANNEXE 7

Schéma de structure du CMV



ANNEXE 8

Gélose au sang frais + ANC : Composition du milieu en grammes par litre d'eau distillée

Mélange de peptones	13
Hydrolysat de protéines animales et végétales	10
Amidon de maïs	1
Chlorure de sodium	5
Agar	13,5
Acide nalidixique	0,015
Colistine	0,001
Sang frais défibriné de mouton	5%

ANNEXE 9

Extrait de la fiche technique du milieu StrepB Select™ (BioRad)

- Principe :

StrepB Select est un milieu gélosé, sélectif et chromogène particulièrement bien adapté pour la détection et l'identification présumptive des streptocoques du groupe B (SGB) ou *Streptococcus agalactiae* dans les prélèvements vaginaux ou vagino-rectaux de la femme enceinte.

La composition en peptones et substances nutritives favorise la croissance des SGB.

Le mélange sélectif permet d'inhiber la croissance de la plupart des microorganismes, à l'exception des streptocoques, de certains entérocoques et lactobacilles.

Plusieurs substrats chromogéniques permettent la détection d'activités enzymatiques conférant une coloration caractéristique des colonies des espèces suivantes :

- SGB : colonies bleues,
- entérocoques : colonies de couleur rose à violet,
- lactobacilles : petites colonies de couleur rose.

- Utilisation :

Ensemencer directement les produits biologiques sur StrepB Select, selon les techniques conventionnelles d'isolement.

Incuber en atmosphère aérobie, à l'abri de la lumière, à 35-38°C, pendant 24 à 48 heures.

- Lecture –Interprétation :

Colonies bleues : forte présomption de SGB.

Confirmer le groupe de Lancefield par groupage antigénique.

ANNEXE 10

Extrait du tableau XIII du document de la SFM (Société française de microbiologie)- Édition de janvier 2010

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Pénicilline G Ampicilline Amoxicilline Céfotaxime	- - - -	≤ 0,25 ≤ 0,5 ≤ 0,5 ≤ 0,5	>2 >2 >2 >16	- - - -	- - - -	<p>La sensibilité des streptocoques à la pénicilline G est évaluée avec un disque d'oxacilline à 5 µg (OXA-5) selon les critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diamètre OXA-5 ≥ 21 mm : souche sensible à la pénicilline G. Cette interprétation est prédictive de l'activité des autres β-lactamines incluant les streptocoques dans leur spectre - Diamètre OXA-5 < 21 mm : souche I ou R à la pénicilline G. <p>Devant toute souche de sensibilité diminuée, il y a lieu de déterminer la CMI de l'ampicilline, de l'amoxicilline ou du céfotaxime. (...)</p>
Streptomycine Kanamycine Gentamicine	500 µg 1000 µg 500 µg	≤ 250 ≤ 250 ≤ 250	>500 >500 >500	≥14 ≥14 ≥17	<12 <10 <11	<p>Les streptocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau (BNR) à tous les aminoglycosides qui n'empêche pas d'obtenir un effet synergique bactéricide entre un aminoglycoside et une pénicilline ou un glycopeptide. L'acquisition d'un haut niveau de résistance (HNR) aux aminoglycosides, détectée grâce à des disques fortement chargés en streptomycine (500 µg), kanamycine (1000 µg) et gentamicine (500µg) abolit cet effet synergique bactéricide. (...)</p>
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	>8	≥23	<19	Interprétation valable pour thiamphénicol.
Tétracycline	30 UI	≤1	>2	≥23	<21	Interprétation valable pour les autres tétracyclines, sauf pour la minocycline.
Erythromycine	15 UI	≤0,25	>0,5	≥26	<24	Interprétation valable pour azithromycine, clarithromycine, dirithromycine et roxithromycine
Spiramycine	100 µg	≤1	>4	≥24	<19	
Télithromycine	15 µg	≤0,25	>0,5	≥24	<21	