

41^e

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14
DÉCEMBRE 2021

PALAIS DES CONGRÈS • PARIS



Impact du microbiote dans la prise en charge et l'interprétation des prélèvements vaginaux

Rémi Le Guern

Bactériologie – CHU Lille



Prélèvement vaginal

- Réalisation

sur les lésions / leucorrhées après pose de spéculum
ou auto-prélèvement vaginal

- Diagnostic de vaginite

Trichomonas vaginalis = IST

Mycose (souvent *Candida albicans*)

Vaginose bactérienne (déséquilibre du microbiote vaginal)

= diagnostic plus complexe

Vaginose bactérienne

- Cause la plus fréquente de leucorrhées
prévalence de 30% des femmes de 14 à 49 ans aux USA
- Décrit en 1955 par Gardner et al
« *Haemophilus vaginalis* vaginitis » (AJOG)
Initialement relié à *Gardnerella vaginalis*
mais la réalité est plus complexe
- Altération du microbiote vaginal
équilibre entre les microorganismes rompu

Gardner et al. (1955)

- Postulats de Koch:

3^{ème} postulat: « Le micro-organisme cultivé devrait provoquer une maladie lorsqu'il est introduit dans un organisme sain. »

13 volontaires inoculées avec culture pure de *Gardnerella vaginalis*

10 patientes: asymptomatiques, culture négative

2 patientes: asymptomatiques, culture positive

1 patiente: symptomatique, culture positive

Impact d'autres micro-organismes ?

Inoculation directe de sécrétions vaginales chez 15 volontaires

Symptômes chez 11 patientes, culture positive à *G. vaginalis*

CASE NO.	PHYSIOL. STATUS	CONSISTENCY		ODOR		pH		GRADE FLORA BEFORE	BACT. AFTER INOC.	RESULTS
		BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER	BEFORE	AFTER			
1	Not preg.	Curdy	Homo.	0	x	4.5	5.2	II	H.V.	Take
2	Preg.	Curdy	Homo.	x	xx	4.7	5.2	I	H.V.	Take
3	Preg.	Curdy	Homo.	0	0x	4.7	4.7	I	Dip.	Failure
4	Post-partum	Bloody	Homo.	0	x	4.7	5.0	I	H.V.	Take
5	Post-partum	Curdy	Homo.	0	x	5.2	5.5	I	H.V.	Take
6	Preg.	Curdy	Curdy	0	0x	4.7	4.5	I	Lacto.	Failure
7	Preg.	Curdy	Curdy	0	0	4.2	4.2	I	Lacto. Mon.	Failure
8	Postmenopausal	Homo.	Homo.	x	xx	5.5	6.6	I	H.V.	Take
9	Post-partum	Curdy	Homo.	x	x	5.5	5.5	II	Lacto.	Failure
10	Not preg.	Curdy	Homo.	0	xx	4.5	5.2	II	H.V.	Take
11	Post-partum	Curdy	Homo.	0	x	4.7	5.0	I	H.V.	Take
12	Post-partum	Homo.	Homo.	0	x	6.8	6.5	II	H.V.	Take
13	Postmenopausal	Homo.	Homo.	x	x	7.0	7.2	III	H.V.	Take
14	Not preg.	Curdy	Homo.	0	xx	5.0	5.5	I	H.V.	Take
15	Post-partum	Curdy	Homo.	0	x	4.7	5.5	I	H.V.	Take

Critères d'Amsel (1983)

- *Gardnerella vaginalis* est non-spécifique de la vaginose présent chez 55% des femmes sans vaginose (**culture = inutile**)

Totten
JCM 1982

- Diagnostic clinique (≥ 3 critères)

leucorrhées homogènes

présence de clue cells

pH vaginal > 4.5

odeur de poisson lors du test à la potasse

Amsel
Am J Med 1983



Handell 2019

- Dysbiose = altération de la composition et de la fonction du microbiote

Score de Nugent (1991)

- Diagnostic microscopique (coloration Gram) = **gold standard** actuel

Nombre de morphotypes par champs :

Lactobacillus

Gardnerella/Bacteroides

Mobiluncus

TABLE 1. Scoring system (0 to 10) for Gram-stained vaginal smears^a

Score ^b	Lactobacillus morphotypes	<i>Gardnerella</i> and <i>Bacteroides</i> spp. morphotypes	Curved gram-variable rods
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ or 2+
2	2+	2+	3+ or 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

^a Morphotypes are scored as the average number seen per oil immersion field. Note that less weight is given to curved gram-variable rods. Total score = lactobacilli + *G. vaginalis* and *Bacteroides* spp. + curved rods.

^b 0, No morphotypes present; 1, <1 morphotype present; 2, 1 to 4 morphotypes present; 3, 5 to 30 morphotypes present; 4, 30 or more morphotypes present.

Nugent
JCM 1991

Score de Nugent (1991)

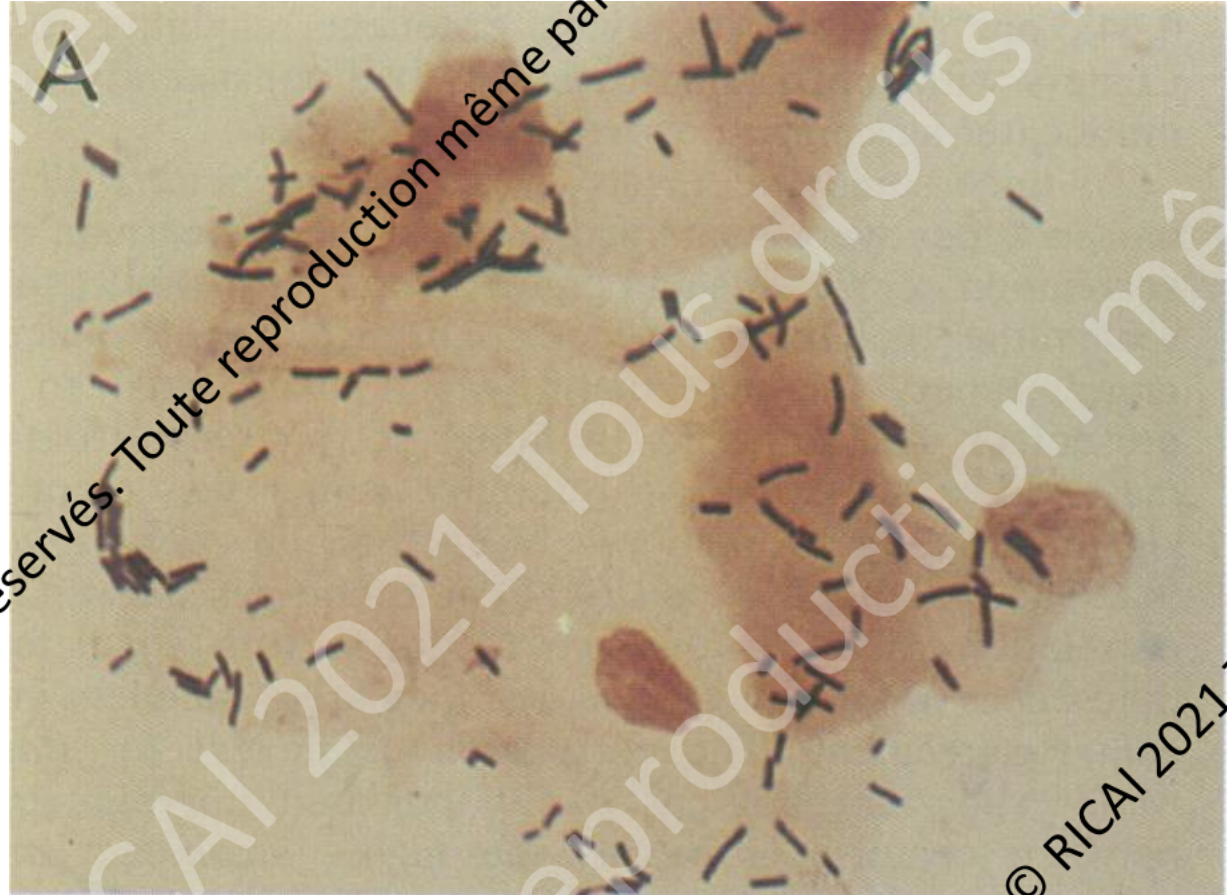
- Score 0 à 3 = flore vaginale normale

Lactobacillus: 4+

Gardnerella/Bacteroides: 0

Mobiluncus: 0

Score de 0 (0+0+0)



Nugent
JCM 1991

Score de Nugent (1991)

- Score 4 à 6 = flore vaginale intermédiaire

Lactobacillus: 2+

Gardnerella/Bacteroides: 4+

Mobiluncus: 0

Score de 6 (2+4+0)



Nugent
JCM 1991

Score de Nugent (1991)

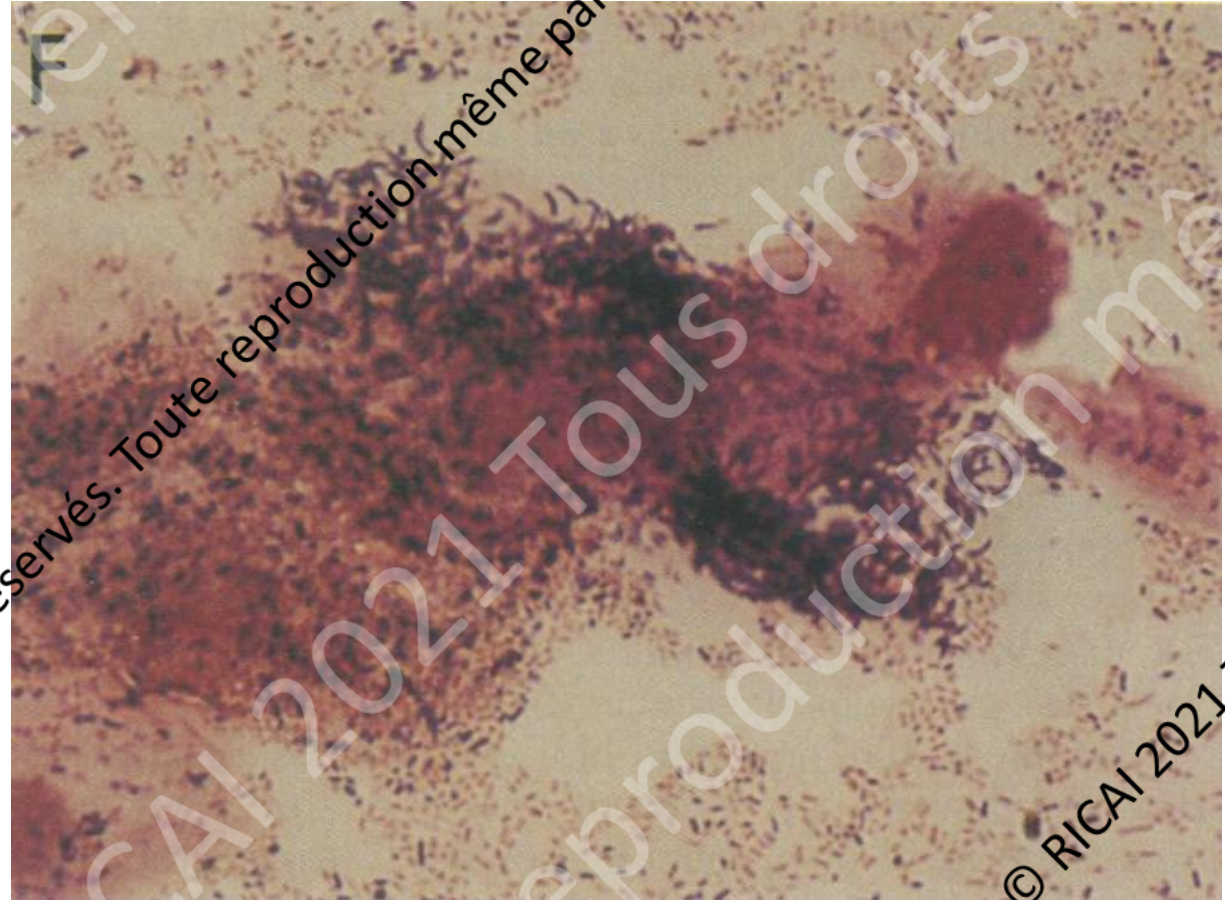
- Score 7 à 10 = vaginose bactérienne

Lactobacillus: 0

Gardnerella/Bacteroides: 4+

Mobiluncus: 4+

Score de 10 (4+4+2)



Nugent
JCM 1991

Score de Nugent (1991)

Intérêt = meilleure reproductibilité (89% dans publication)

- Inconvénients:

nécessite d'avoir du personnel formé +++
prend du temps

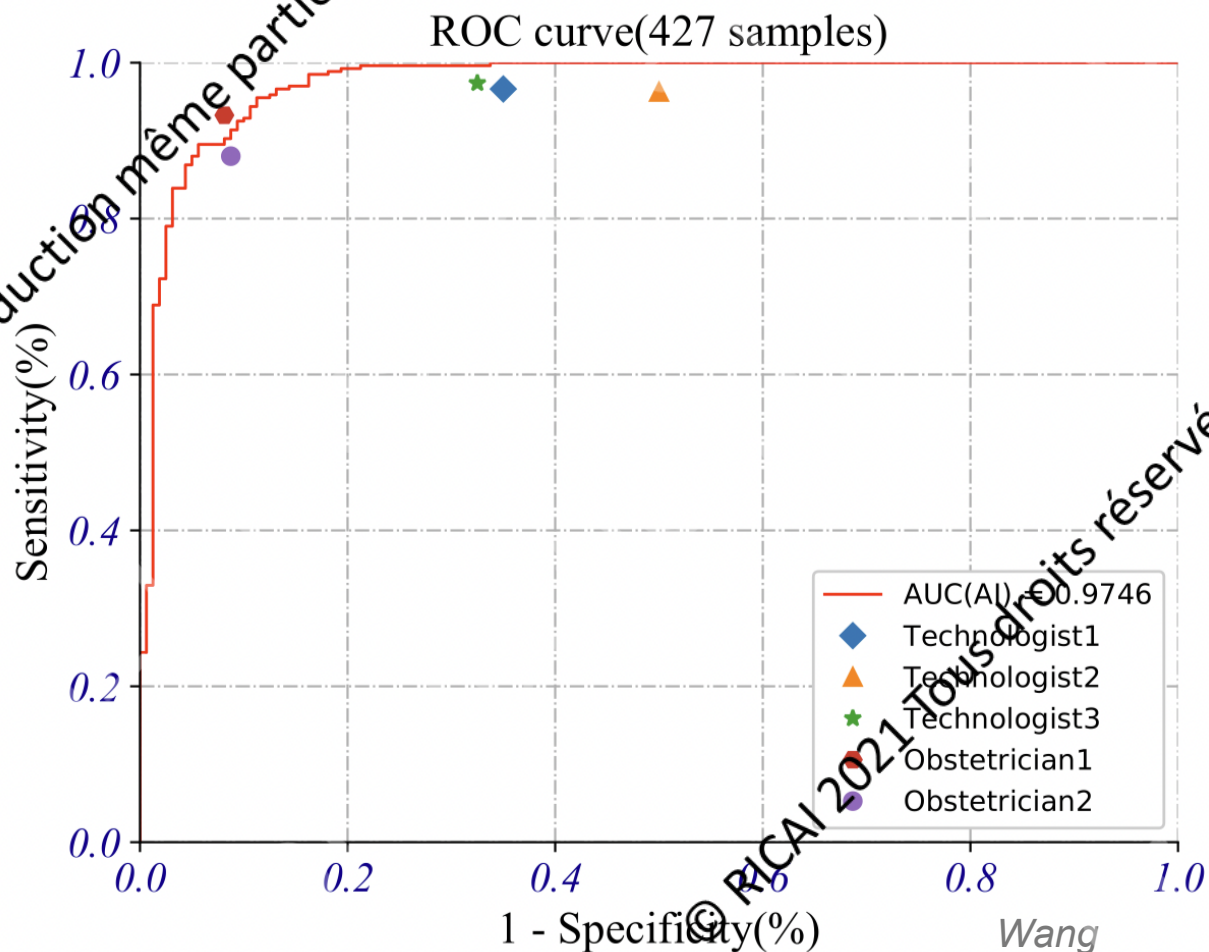
TABLE 2. Intercenter reliability for bacterial morphotypes and diagnostic criteria for bacterial vaginosis from a vaginal smear

Morphotype	No. (%) positive		No. (%) in agreement ^a
	Original center	Reference center	
Lactobacilli	161 (83)	180 (93)	157 (81)
<i>G. vaginalis</i>	134 (69)	128 (66)	150 (77)
Small gram-variable rods	135 (70)	127 (66)	151 (78)
Spiegel criteria			
<i>Bacteroides</i> spp.	59 (30)	46 (24)	145 (75)
Gram-positive cocci	83 (43)	138 (72)	97 (51)
Curved gram-variable rods	44 (23)	46 (24)	179 (93)
Summary ^b	115 (59)	94 (48)	128 (66)
Bacterial vaginosis			
Spiegel criteria	56 (29)	66 (34)	160 (83)
Score ≥ 7	56 (29)	61 (31)	172 (89)

Nugent
JCM 1991

Score de Nugent en 2021 : deep learning ?

- Réseaux de neurones artificiels (deep learning)
- 29 095 images microscopiques
23 280: entraînement
5 815: validation
- Comparé à 2 obstétriciens et 3 techniciens
- Modèle meilleur que 4 des 5 humains
Sensibilité 91.4% / Spécificité 91.3%
- Moyenne humains
Sensibilité 94.3% / Spécificité 73.1%



Score de Nugent en 2021 : deep learning ?

- Modèle entraîné en 2h30 sur une GTX 1080 Ti (carte graphique sortie en 2017) versus plusieurs mois pour former un humain
- Analyse 100 images en 2.4 secondes
- Cependant un peu moins bon que les 2 meilleurs humains quand des images prises dans 3 centres différents sont mélangées



Wang
JCM 2021

Methodes moléculaires

- Permet d'aller plus loin que simple réduction des lactobacilles
- Au moins cinq types d'état communitaires (CST) 16S rRNA

CST I : *Lactobacillus crispatus*

CST II : *Lactobacillus gasseri*

CST III : *Lactobacillus iners*

CST IV : peu de *Lactobacillus*, groupe divers

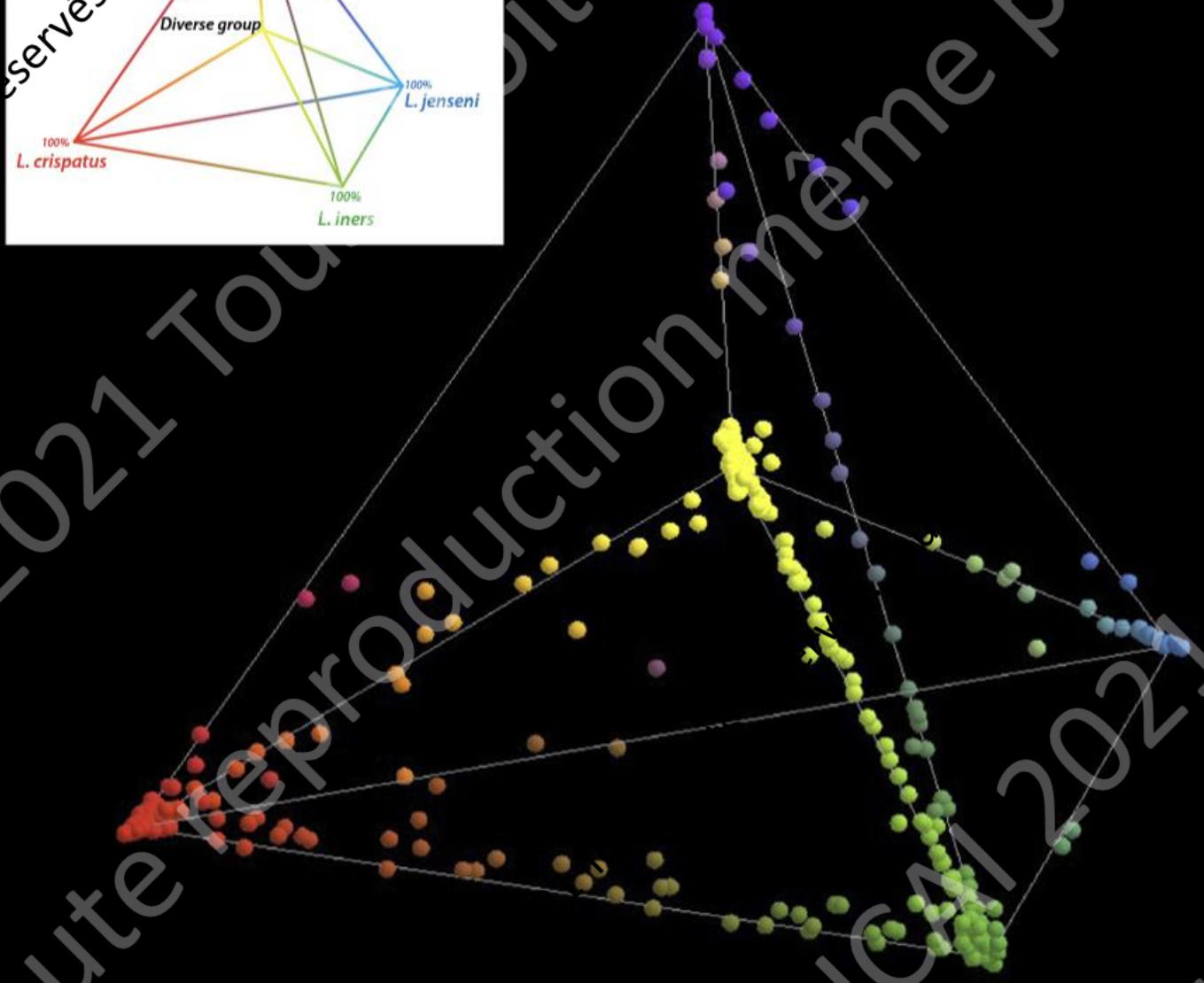
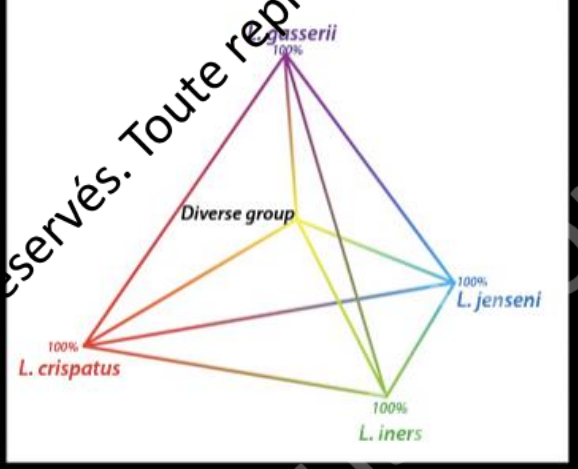
CST V : *Lactobacillus jensenii*

© RICAI 2021 Tous droits réservés.
Ravel
PNAS 2011

as droits réservés. Toute reproduction même partielle sans autorisation écrite de l'éditeur est formellement interdite.

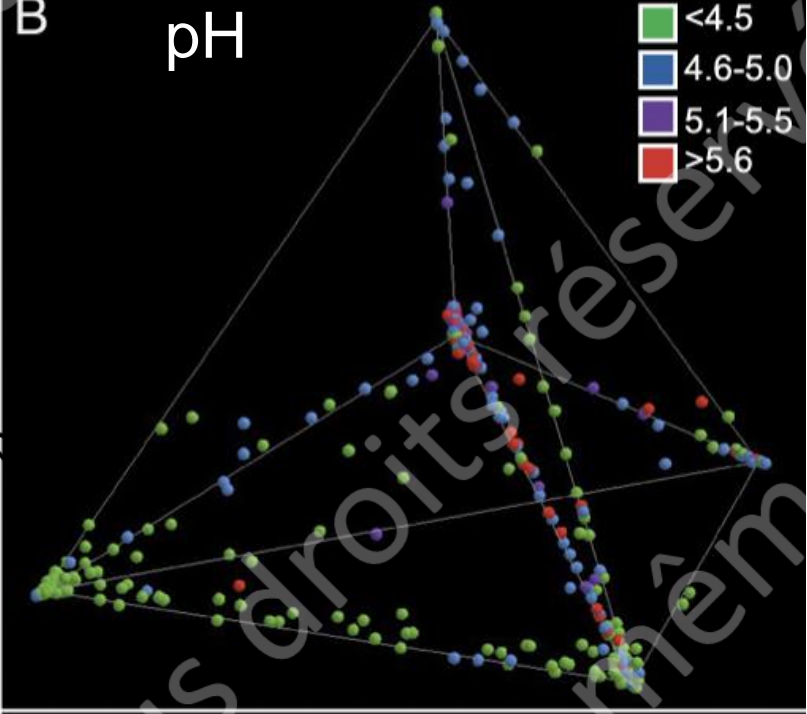
ACP

A



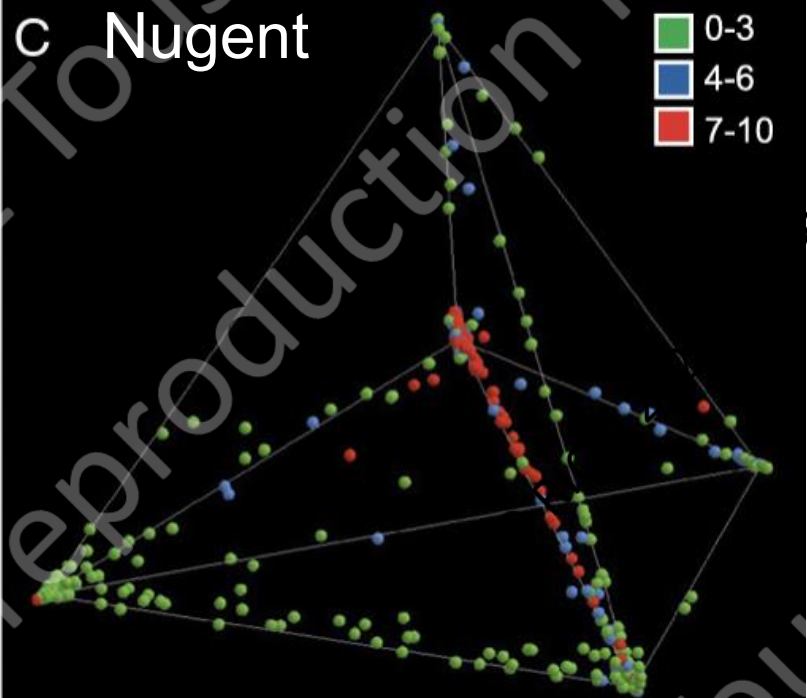
pH

B



Nugent

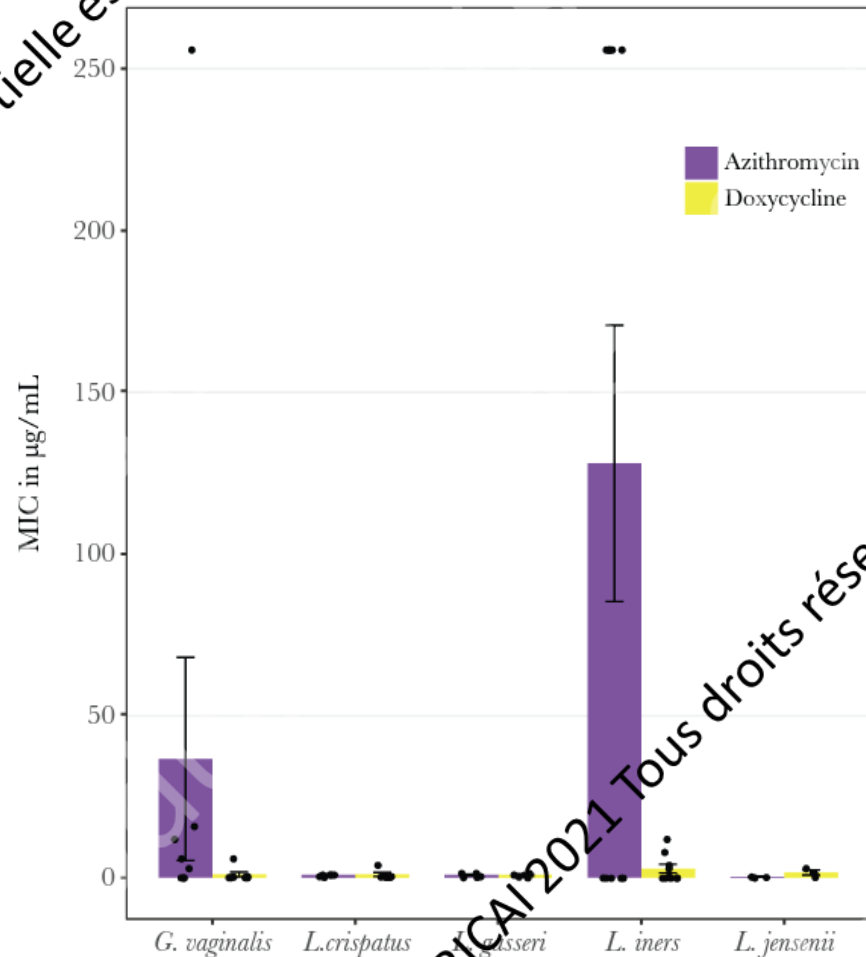
C



Lactobacillus iners

Petits coccobacilles à Gram négatif
(similaire à *G. vaginalis* dans Nugent)

- Ne pousse pas bien sur gélose MRS
- Ne produit pas de D-acide lactique (seulement isomère L)
- Ne produit pas de peroxyde d'hydrogène
- Résistant métronidazole et azithromycine



Tamarelle
J Infect Dis 2020

Lactobacillus iners

- CST III (*L. iners*) associé à:
 - score de Nugent ≥ 7
 - présence de levures
 - cellules inflammatoires
- Mais pas associé à des symptômes de vaginose (leucorrhées, pH vaginal, test à la potasse)

Characteristics	CST III (n=222)	CST I, II and V (n=220)	P value*
Nugent microscopic categories			0.001
Normal (scores 0–3)	160 (72.07)	192 (87.27)	
Intermediate (scores 4–6)	35 (15.77)	14 (6.36)	
BV (scores 7–10)	27 (12.16)	14 (6.36)	
Microscopic Candida-positivity[†]			0.050
No	200 (90.09)	209 (95.00)	
Yes	22 (9.91)	11 (5.00)	
Inflammatory PMN cells (≥ 5 per field)			0.007
No	198 (89.19)	211 (95.91)	
Yes	24 (10.81)	9 (4.09)	

Novak
Sex Transm Infect 2020

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

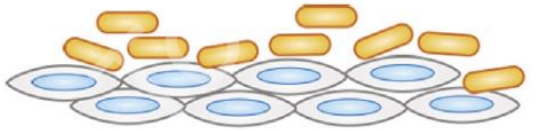
Vaginal microbiota

Healthy state

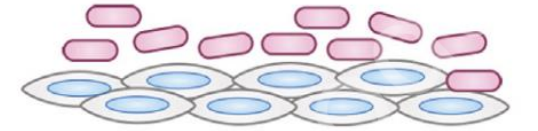
Healthy or transitional?

Dysbiosis–BV state

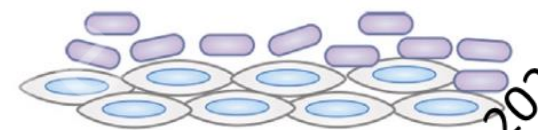
Group I:
L. crispatus-dominated microbiota
pH 4




Group II:
L. gasseri-dominated microbiota
pH 5



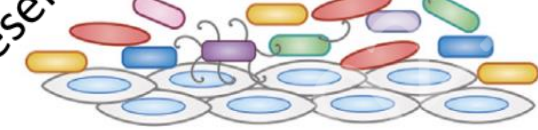
Group V:
L. jensenii-dominated microbiota
pH 4.7



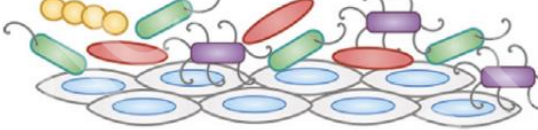
Group III:
L. iners-dominated microbiota
-Moderate lactic acid production
-Isolated from both healthy and BV state
-Dominant spp. following BV treatment
-Isolated from transitional type vaginal microbiota



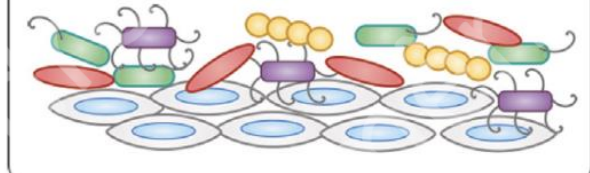
Group IV-A: diverse microbiota
pH 4-5



Group IV-B: diverse microbiota
pH 5.3



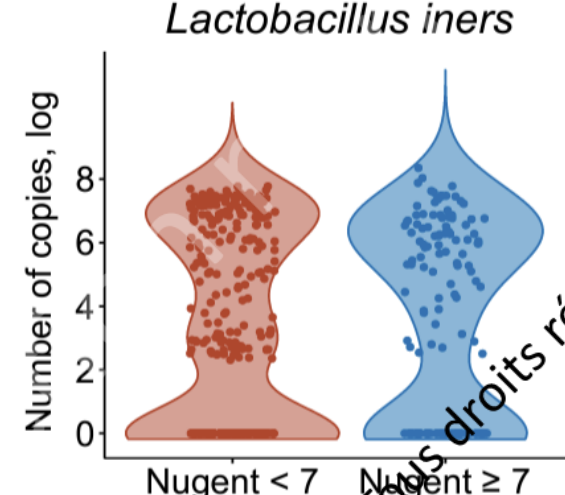
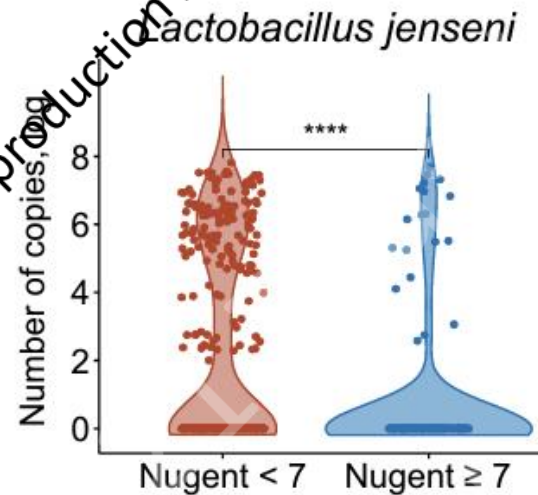
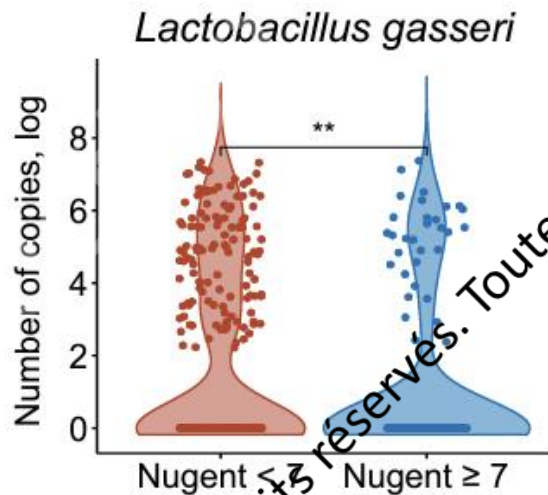
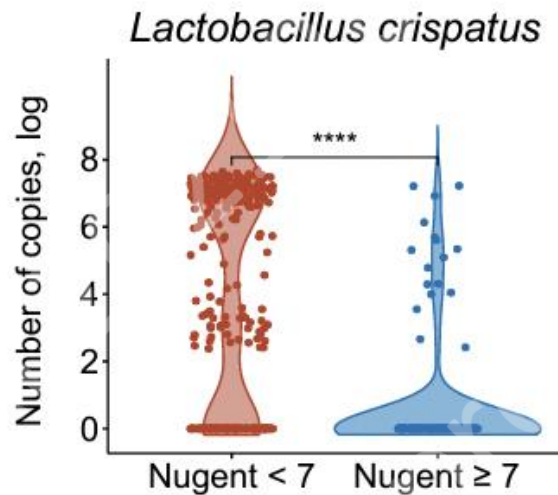
Overgrowth facultative or strict anaerobes:
Gardnerella spp., *Atopobium* Spp.,
Prevotella spp., *Mobiluncus* spp.,
Megasphaera spp., BVAB1/2/3

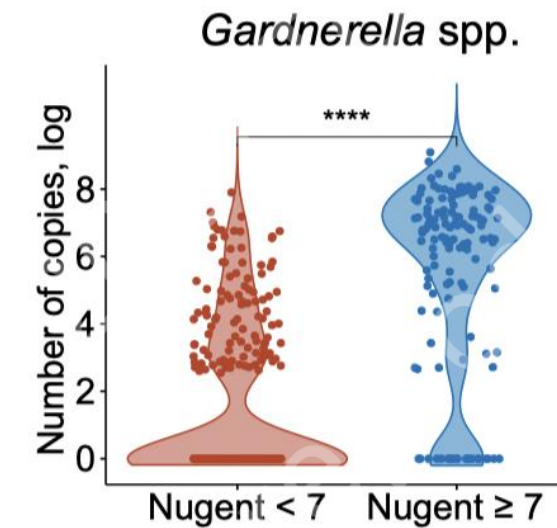
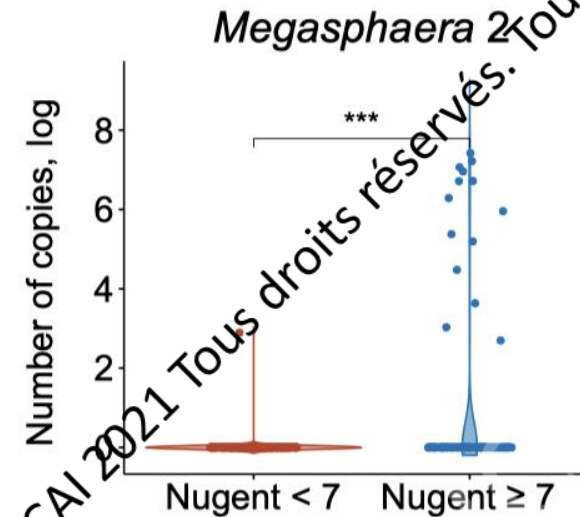
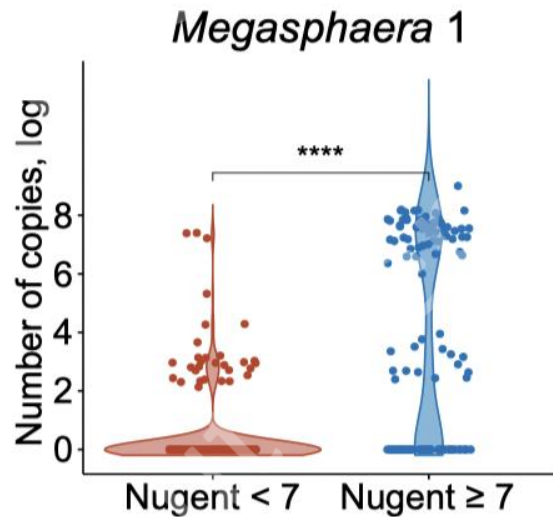
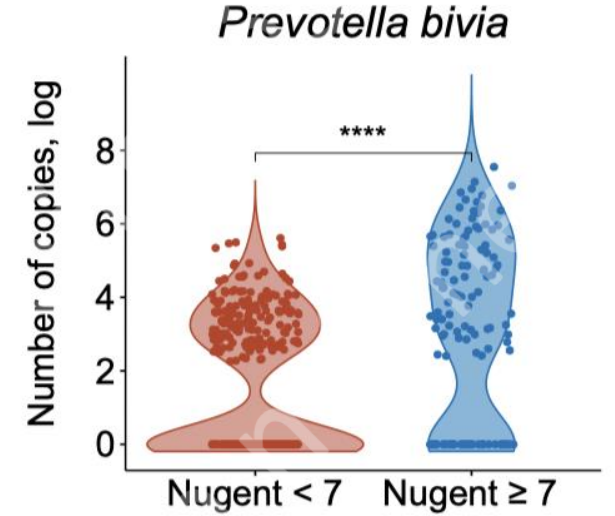
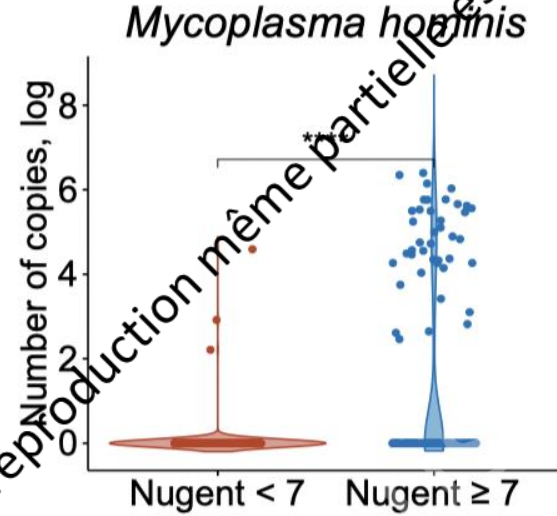
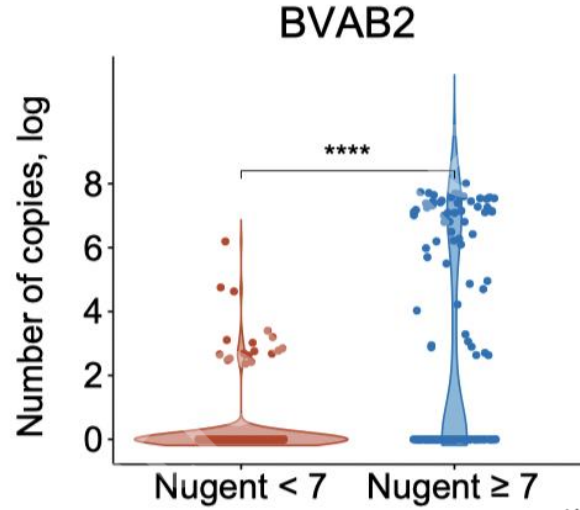
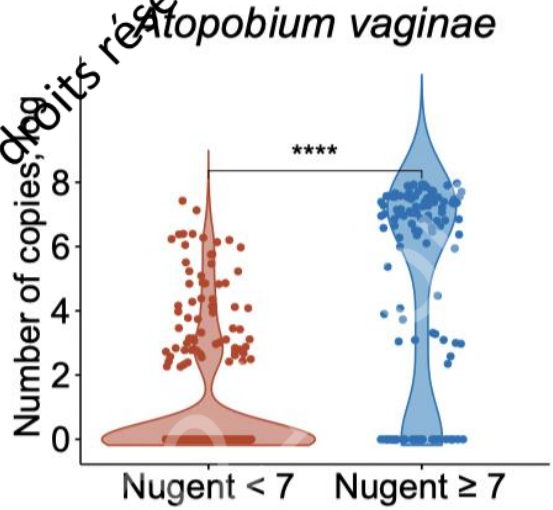


© RICAI 2021 Tous droits réservés.

© RICAI 2021 Tous droits réservés.
Petrova
Trends Microbiol 2017

- Détection de 34 micro-organismes chez 43 patientes





© RICAI 2021 Tous droits réservés.

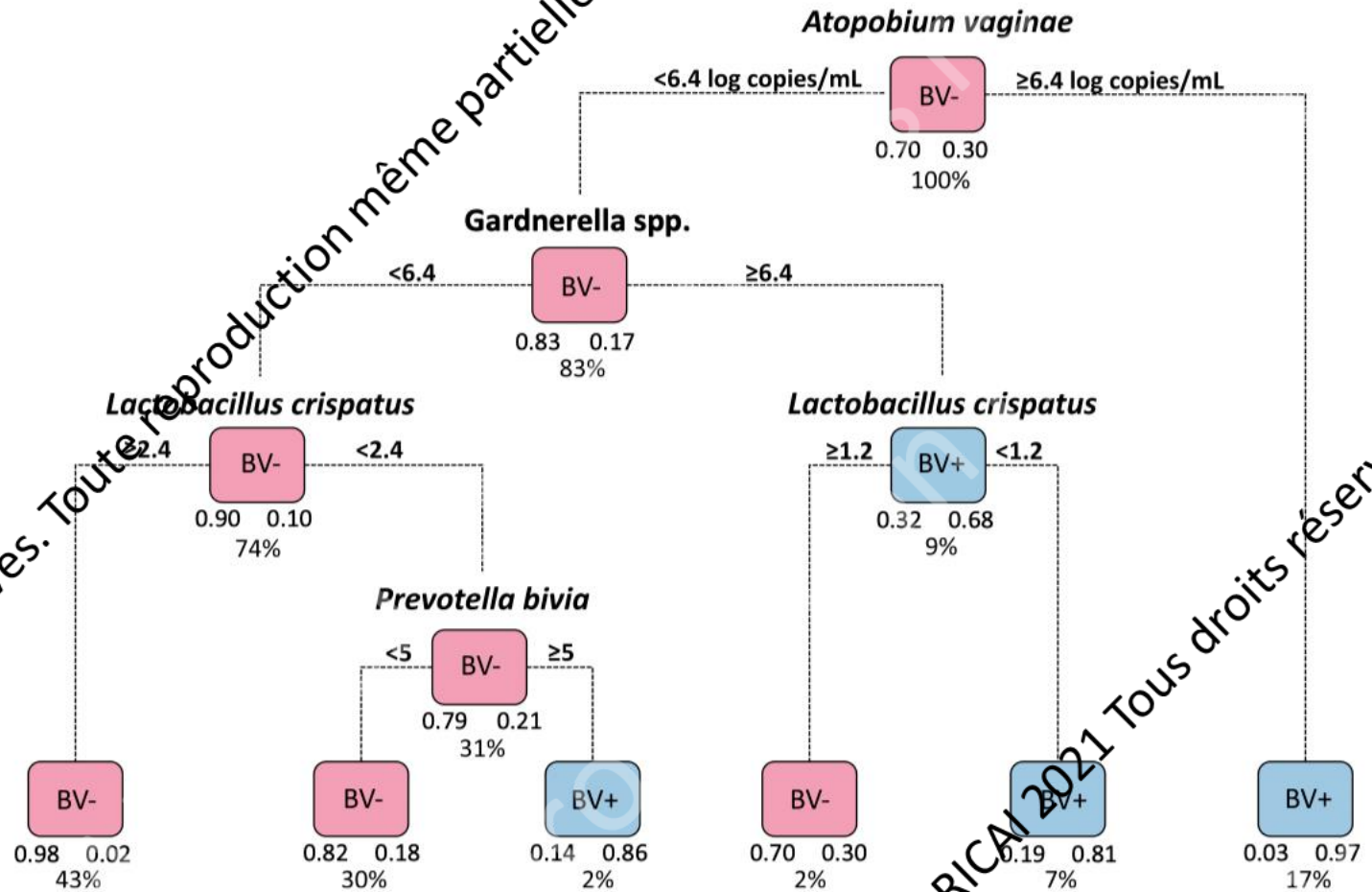
Loquet
J Mol Diagn 2021

Methode CART (Classification and Regression Trees)

Combinaison de 4 bactéries

- *Atopobium vaginae*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Lactobacillus crispatus*
- *Prevotella bivia*

Sensibilité de 77.1% et spécificité de 97.0% comparé au Nugent



Loquet
J Mol Diagn 2021

Test moléculaires commerciaux

TABLE 1 Bacteria detected in commercially available PCR assays

Organism	NuSwab	SureSwab	BD Max	MDL BV panel
<i>A. vaginae</i>	X	X	X	X
<i>G. vaginalis</i>		X	X	X
<i>Megasphaera</i> (type 1, type 2 and/or species)	X	X	X	X
BVAB ^b (type 1 and/or type 2)	X		X	X
<i>Lactobacillus</i> species	X	X	X	X

^aCommercially available PCR assays detect different combinations of indicator organisms.

^bBVAB, BV-associated bacteria.

NuSwab: Sensibilité 96.7% Spécificité 92.2% (Nugent+Amstel)

BD Max: Sensibilité 90.5% Spécificité 85.8% (Nugent+Amstel)

MDL BV: Sensibilité 99.0% Spécificité 94.0% (Nugent+Amstel)

Coleman
JCM 2018

Suivi colonisation par des probiotiques

- Traitement par des antibiotiques (métronidazole gel vaginal)
- +/- Probiotiques (Lactin-V = *Lactobacillus crispatus* CTV-05)

Table 2. Bacterial Vaginosis Recurrence Status in the Intention-to-Treat Population.

Variable	Lactin-V (N = 152) no. (%)	Placebo (N = 76)	Risk Ratio (95% CI)*	P Value
Status of recurrence by wk 12				
Recurrence†	46 (30)	34 (45)	0.66 (0.44–0.87)	0.01
No recurrence	87 (57)	30 (39)		
Unknown	19 (12)	12 (16)		
Status of recurrence by wk 24				
Recurrence	59 (39)	41 (54)	0.73 (0.54–0.92)	
No recurrence	63 (41)	21 (28)		
Unknown	30 (20)	14 (18)		

Cohen
NEJM 2020

Suivi colonisation par des probiotiques

- Suivi de la colonisation d'une souche de probiotique spécifique possible par qPCR
- Mais pas d'infos données sur autres *Lactobacillus* et bactéries associées à la vaginose

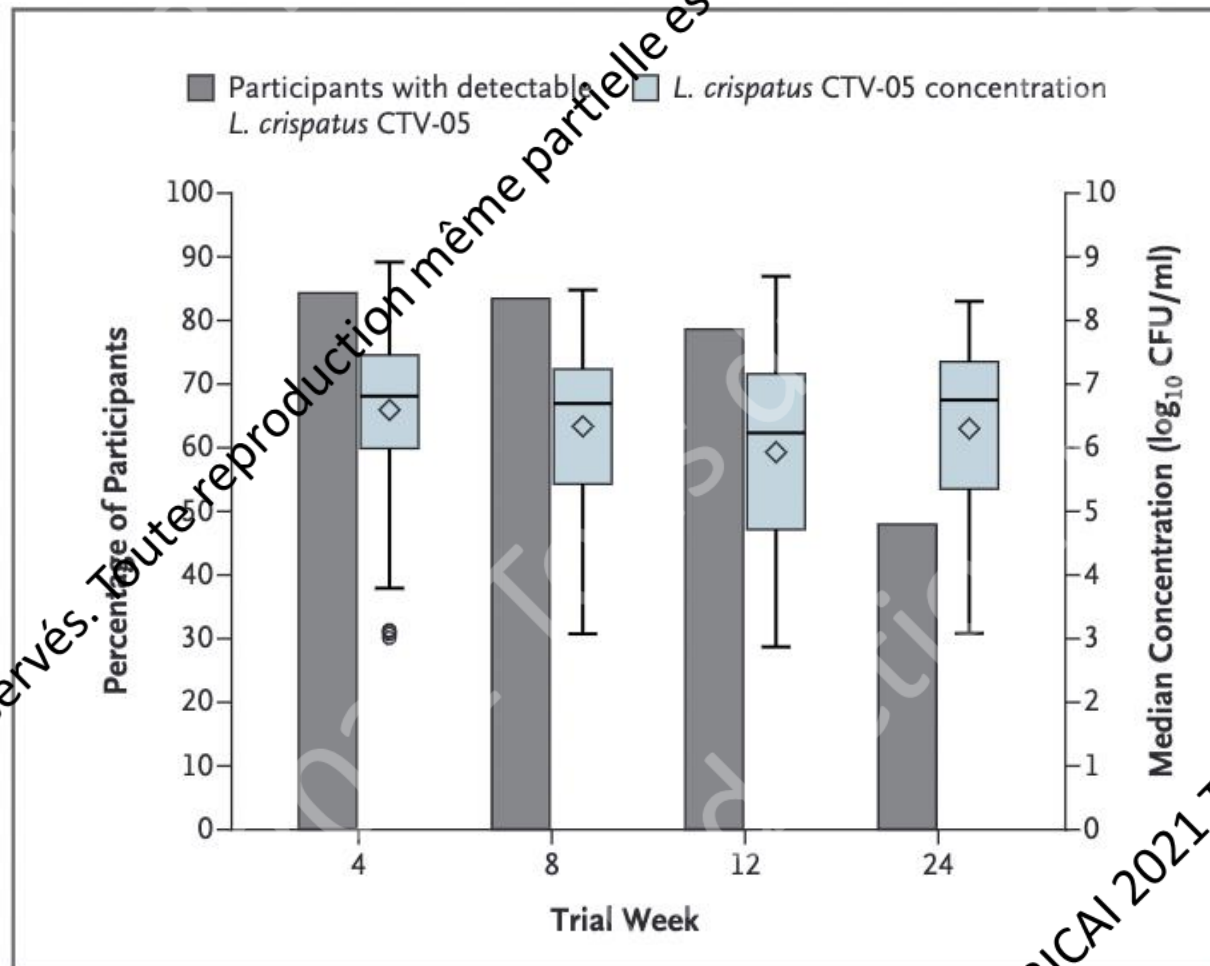


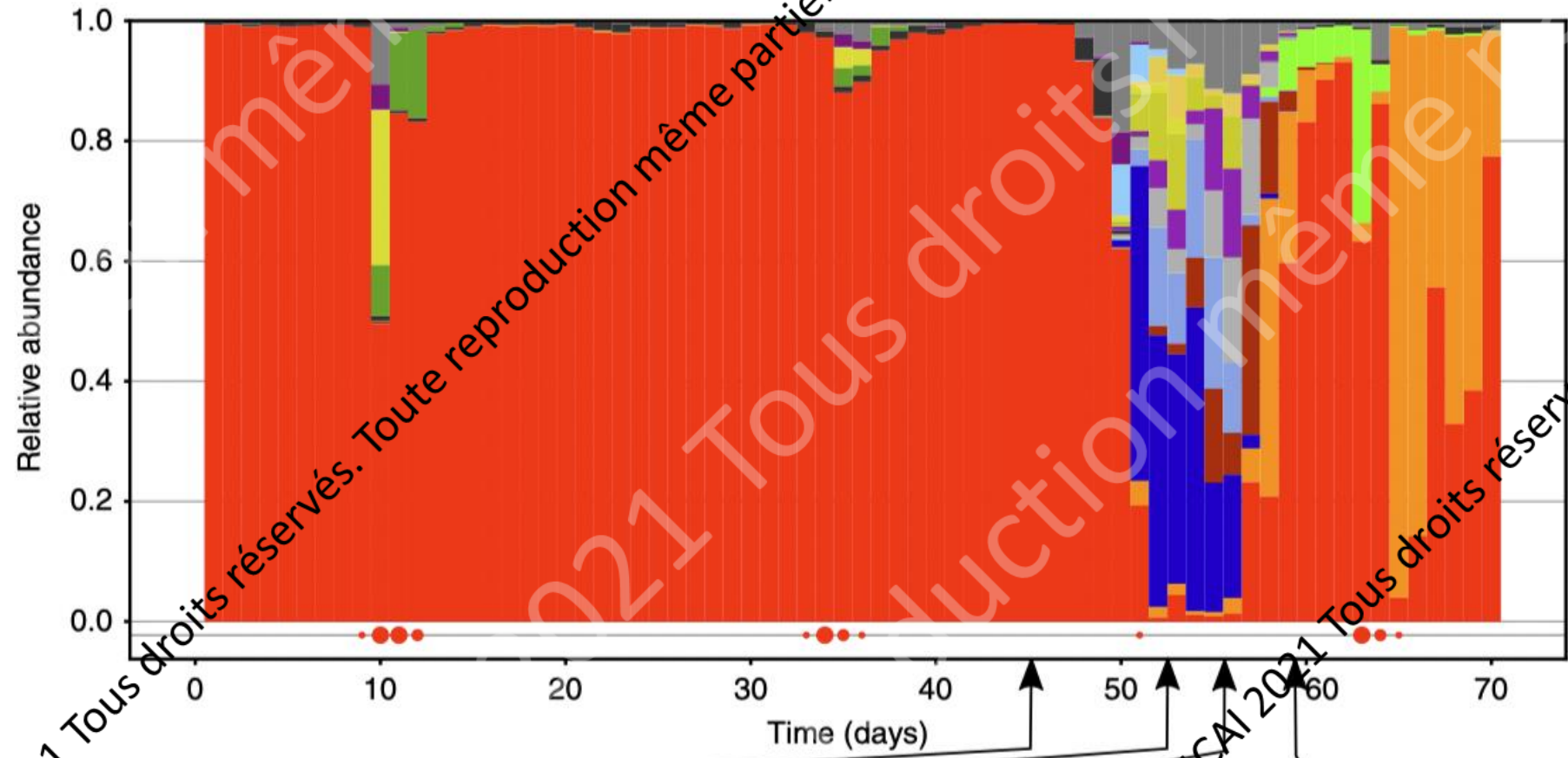
Figure 2. Median Concentration and Incidence of Detectable *Lactobacillus crispatus* CTV-05 in the Lactin-V Group, According to Trial Visit.

Cohen
NEJM 2020

Metagénomique ciblée sur l'ARN 16S

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

- Lactobacillus crispatus*
- Lactobacillus iners*
- Atopobium vaginae*
- BVAB1
- Clostridiales
- Lactobacillus gasseri*
- Prevotella genogroup 1*
- Lactobacillus jensenii*
- Leptotrichia amnionii*
- Parvimonas micra*
- Streptococcus anginosus*
- Peptostreptococcus anaerobius*
- Peptoniphilus*
- Anaerococcus tetradius*
- Fingoldia magna*
- Other



Épisode de vaginose bactérienne symptomatique

© RICA 2021
Ma
Nat Comm 2020

Vaginose et prématurité

Vaginose pendant grossesse : risque prématurité x 2.19 ?

Leitch
AJOG 2003

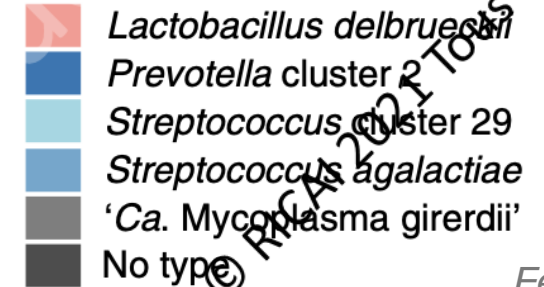
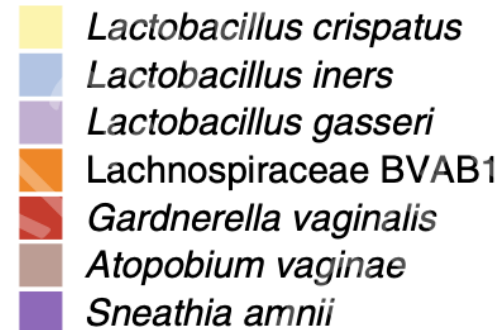
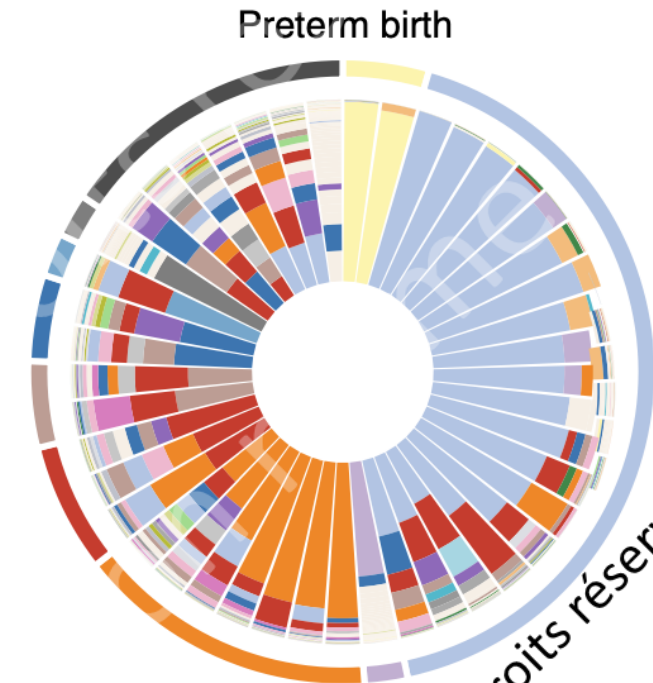
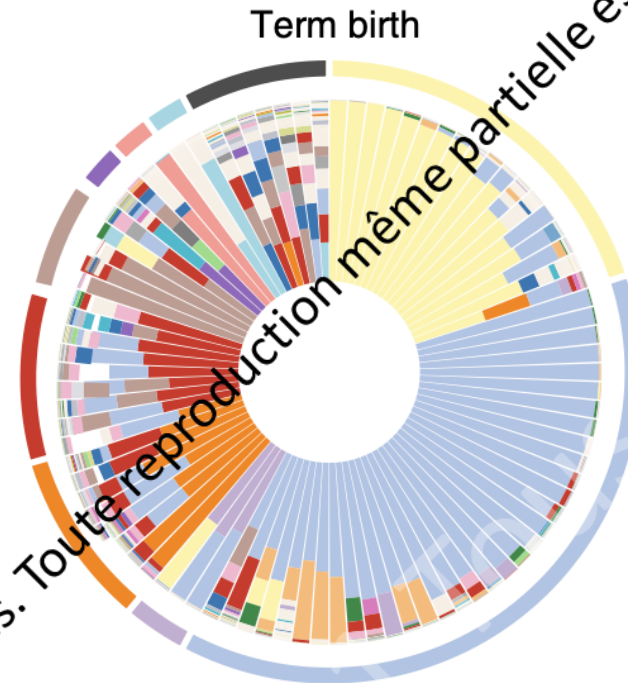
- RCT sur 5630 patientes avec vaginose bactérienne (Nugent) pas de réduction de prématurité après clindamycine

Subtil
JAMA 2018

	Clindamycin			Placebo (n=956)	Relative risk (95% CI); p value
	One course (n=941)	Three courses (n=163)	Total (n=1904)		
Primary outcome					
Late miscarriage or spontaneous very preterm delivery 16–32 weeks (plus 6 days)*	8 (0.8%)	14 (1.5%)	22 (1.2%)	10 (1.0%)	1.10 (0.53–2.32); p=0.82
Secondary outcomes					
Premature rupture of the membranes	147 (15.6%)	128 (13.3%)	275 (14.4%)	141 (14.7%)	0.98 (0.78–1.24); p=0.82
<37 weeks	11 (2.3%)	21 (2.2%)	42 (2.2%)	18 (1.9%)	1.18 (0.65–2.13); p=0.57
≥37 weeks	126 (13.4%)	107 (11.1%)	233 (12.2%)	123 (12.9%)	0.94 (0.74–1.20); p=0.63
Preterm delivery 22–36 weeks (plus 6 days)	62 (6.6%)	66 (6.9%)	128 (6.7%)	56 (5.9%)	1.15 (0.85–1.56); p=0.37
Spontaneous	43 (4.6%)	48 (5.0%)	91 (4.8%)	39 (4.1%)	1.17 (0.81–1.69); p=0.40
Induced	19 (2.0%)	18 (1.9%)	37 (1.9%)	17 (1.8%)	1.09 (0.62–1.93); p=0.76

Metagénomique et prématurité

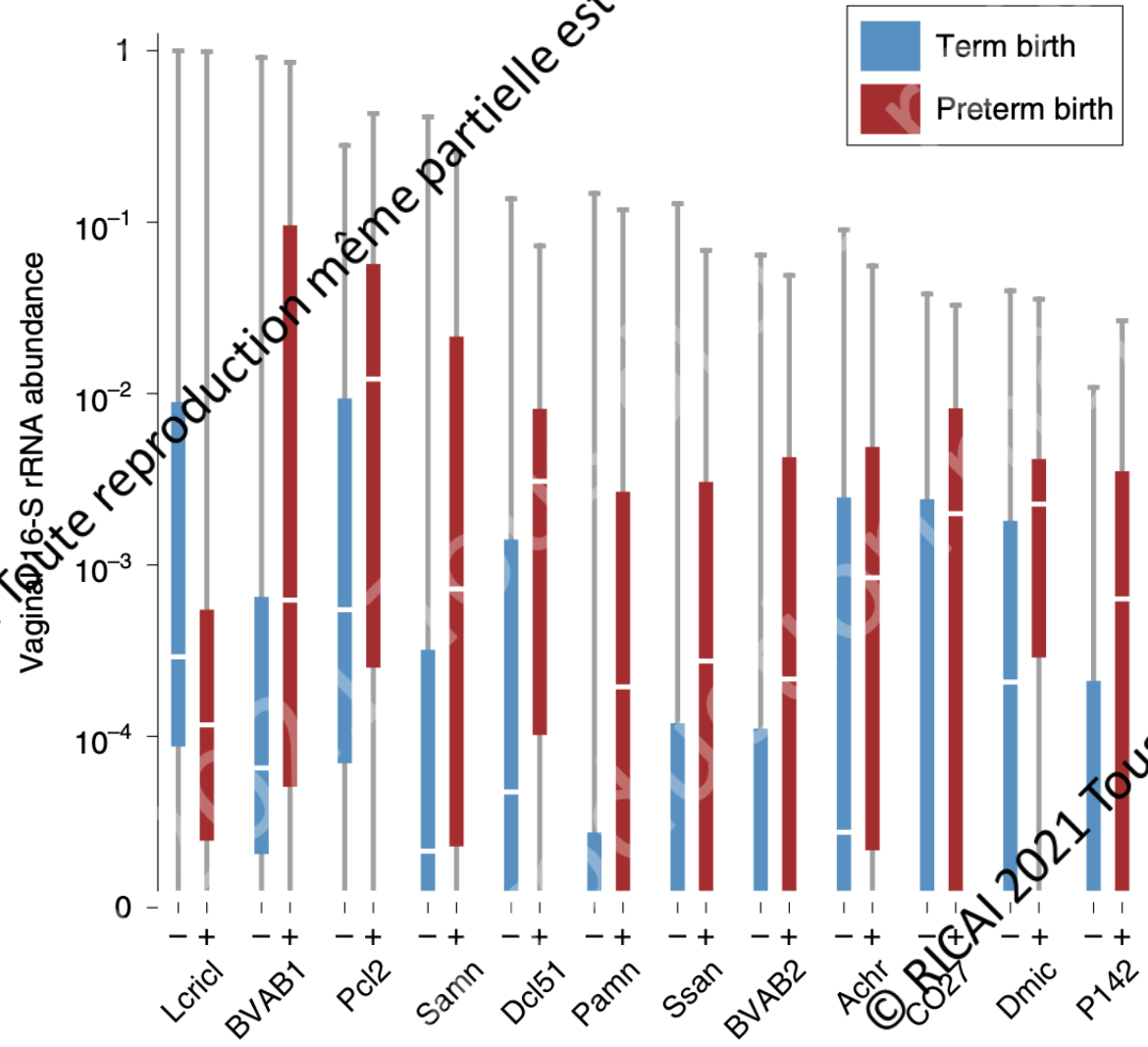
- Bactéries associées à prématurité ?
- Total de 597 patientes
12 039 échantillons
- Comparaison de:
90 patientes à terme
45 accouchement prématurés
- 78% d'origine africaine
- Métagénomique ciblée sur ARN
16S (échantillons = 24 SA)

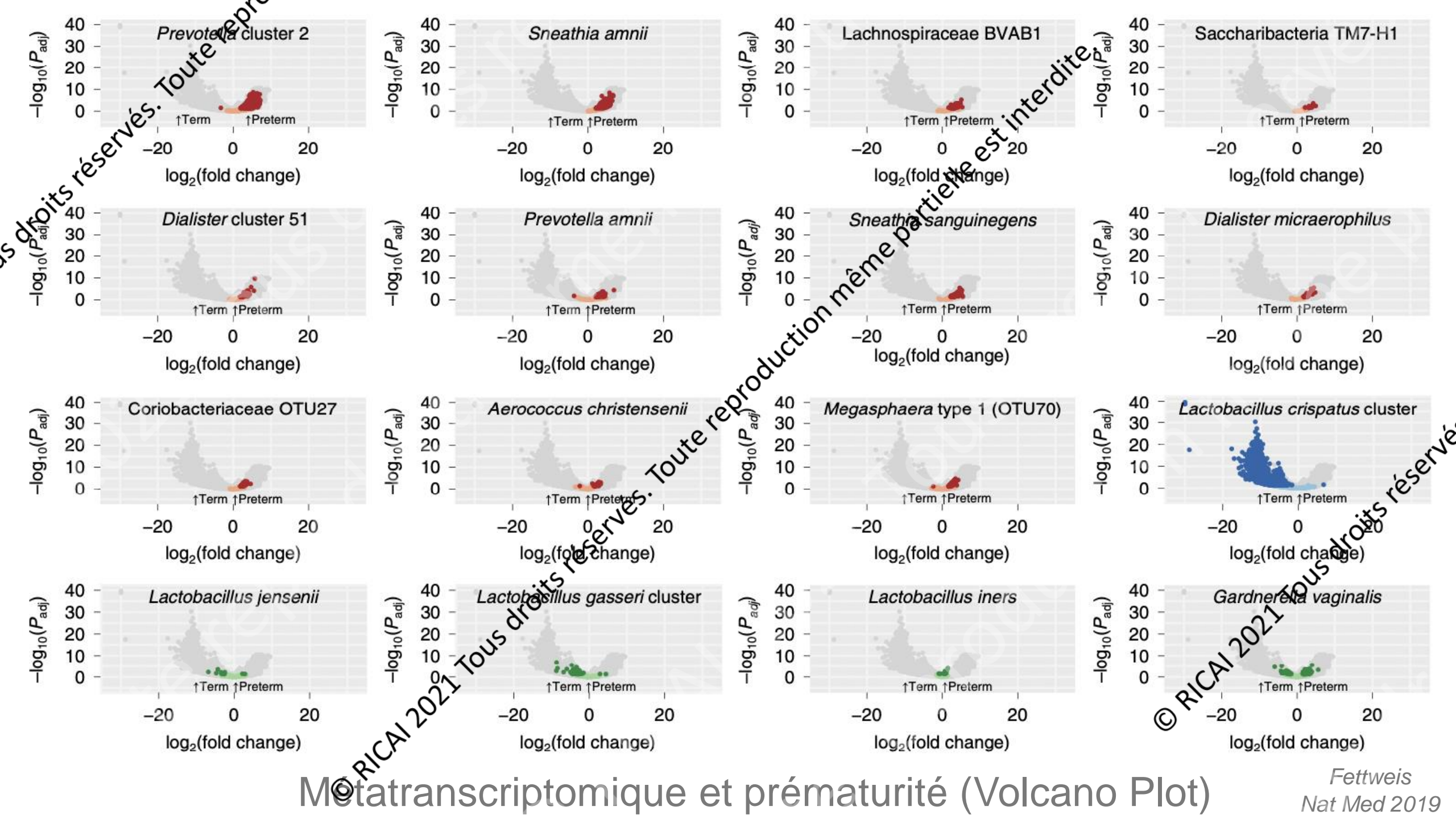


Fettweis
Nat Med 2019

Metagénomique et prématurité

- Prématurité:
Moins de *L. crispatus*
Plus de:
 - BVAB1
 - *Prevotella*
 - *Sneathia amnii*
 - *Dialister*
 - *P. amnii*
 - BVAB2





Conclusion

- Tests diagnostiques de la vaginose = **évaluer une dysbiose**
altération fonctionnelle : Amsel
altération de la composition visible au Gram : Nugent
- Biologie moléculaire = évolution logique
altération de la composition : qPCR, métagénomique ciblée
altération fonctionnelle : métagénomique, métatranscriptomique
- Meilleure compréhension de cette maladie
nouvelles thérapeutiques (probiotiques) + suivi
association à certaines pathologies