

Rapport annuel d'activité

2013

**Centre national de référence
de la coqueluche et autres
bordetelloses**



**Année d'exercice
2012**

SOMMAIRE

RESUME ANALYTIQUE	4
1. INTRODUCTION	5
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	9
2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR.....	9
2.1.1 <i>Identification et caractérisation des bactéries du genre Bordetella</i>	9
2.1.2 <i>Constitution d'une collection</i>	10
2.1.3 <i>Liste des diagnostics biologiques utilisés et recommandés par le CNR pour la surveillance des bordetelloses</i>	10
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2012.....	11
2.2.1 <i>Nature des échantillons biologiques étudiés</i>	11
2.2.2 <i>Nombre d'isolats cliniques de Bordetella reçus en 2012</i>	11
2.2.3 <i>Nombre de PCR réalisées</i>	13
2.2.4 <i>Nombre de sérologies réalisées</i>	13
2.2.5 <i>Nombre d'appels et de messages</i>	14
2.2.6 <i>Distribution des standards et divers produits biologiques</i>	14
2.2.7 <i>Techniques transférées vers d'autres laboratoires (RENACOU ou autres)</i>	14
2.2.8 <i>Contrôles qualité</i>	14
2.2.9 <i>Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA</i>	14
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	15
3.1 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION DE LA COQUELUCHE :.....	16
3.2 BORDETELLOSES AUTRES QUE COQUELUCHE.....	16
3.2.1 <i>Infections humaines à B. bronchiseptica</i>	16
3.2.2 <i>Autres bordetelloses humaines</i>	16
3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	17
3.3.1 <i>Antibiotiques</i>	17
3.3.2 <i>Vaccins</i>	17
3.4 DETECTION ET INVESTIGATION DE CAS GROUPES ET DE PHENOMENES ANORMAUX.....	17
3.5 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS.....	17
3.5.1 <i>Europe</i>	17
3.5.2 <i>International</i>	17
4. ALERTE	17
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	18
6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	18
6.1 INTRODUCTION ET RESUME DES TRAVAUX REALISES DE 1989 A 2010.....	18
6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2012.....	20
6.2.1 <i>Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles</i>	20
6.2.2 <i>Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel (PCR-TR)</i>	25
6.2.2.1 <i>Evaluation des trousse commerciales Diagenode et Bio-evolution</i>	25
6.2.2.2 <i>Détermination de la sensibilité des différentes PCR en temps réel développées au laboratoire</i>	26
6.3 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE, EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2012.....	27
6.3.1 <i>Comment évoluent les populations de Bordetella pertussis et de Bordetella parapertussis au cours du temps en France ?</i>	28
6.3.2 <i>Comment évolue la population de Bordetella pertussis au cours du temps dans d'autres pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?</i>	30
6.3.3 <i>Les isolats de B. holmesii collectés en France et dans d'autres pays sont-ils semblables ?</i>	30
6.3.4 <i>Analyse du nombre de séquences d'insertion dans le génome des différentes espèces de Bordetelles</i>	31
6.3.5 <i>Analyse de l'expression de la protéine BteA par les différentes espèces de Bordetelles</i>	32
6.3.6 <i>Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Tunis ?</i>	32

7.	LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	33
7.1	PUBLICATIONS NATIONALES	33
7.2	PUBLICATIONS INTERNATIONALES.....	33
7.3	COMMUNICATIONS NATIONALES (TOUTES SUR INVITATION)	34
7.4	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (TOUTES SUR INVITATION)	35
7.5	ENSEIGNEMENT	35
7.6	EXPERTISE.....	36
ANNEXE 1	36

RESUME ANALYTIQUE

En 2012,

- Un cycle de coqueluche a été observé, 7 ans après celui de 2005 ;
- 14 % des isolats de *Bordetella pertussis* n'expriment plus la pertactine, un des antigènes vaccinaux du vaccin coqueluche tout comme 95 % des isolats de *Bordetella parapertussis* depuis 2007 ;
- Une PCR en temps réel pour la détection de matériel génétique de *Bordetella holmesii*, plus sensible que celle utilisée les années précédentes a été développée ;
- Un contrôle qualité pour nos collègues hospitaliers du réseau RENACOQ a été organisé par le CNR;
- Trois contrôles qualité organisés par l'Europe ont été réalisés par le CNR.

1. INTRODUCTION

Le Centre National de Référence (CNR) de la coqueluche et autres bordetelloses, a poursuivi en 2012 ses différentes missions concernant les infections humaines dues aux bactéries du genre *Bordetella* dans l'unité de recherche « Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines » (PTMMH) de l'Institut Pasteur.

Missions du CNR :

Le rôle du CNR reste indispensable actuellement pour :

- **poursuivre la surveillance des bordetelloses.** Cette surveillance s'avère toujours nécessaire et indispensable car :
 - seuls les vaccins sous-unitaires ou acellulaires sont maintenant utilisés. Le type d'immunité vaccinale et surtout la durée de celle-ci doivent être surveillés aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte ;
 - les seuls diagnostics biologiques remboursés, la culture et la "PCR en temps réel" (PCR-TR), sont, soit très spécifiques mais peu sensibles chez l'adulte pour la culture, soit très sensibles mais moins spécifiques et surtout très délicats pour la PCR-TR. Il est indispensable de continuer à pratiquer des contrôles qualité pour des laboratoires effectuant ces diagnostics et d'évaluer les kits qui sont sur le marché ;
- **poursuivre la constitution d'une collection d'isolats cliniques.** La constitution de cette collection s'avère de plus en plus nécessaire et indispensable au fil des années en raison :
 - de l'utilisation importante de la technique de PCR en temps réel et de l'abandon progressif de la culture comme technique de diagnostic ;
 - de la population des espèces bactériennes du genre *Bordetella* qui est dynamique et continue à évoluer temporellement en fonction de l'immunité de la population, comme nous l'avons montré pendant les deux dernières décennies. Il est donc important d'analyser les caractéristiques bactériologiques des isolats circulant ainsi que leur sensibilité aux anti-infectieux utilisés pour traiter les bordetelloses ou pour les prévenir ;
 - de la détection de nouvelles infections qui seraient dues à des bactéries du genre *Bordetella*, autres que *B. pertussis* et *B. parapertussis*.
- **poursuivre sa mission de formation de stagiaires des laboratoires hospitaliers et d'enseignement universitaire ou post-universitaire.** Nous avons, comme depuis la création du CNR, il y a vingt ans, continué à envoyer des modes opératoires concernant les nouvelles techniques développées par le CNR à nos collègues hospitaliers ou des LBM.

Activités de l'année 2012 :

L'année 2012 a été marquée par :

- **une augmentation de 29 % du nombre d'isolats de *B. pertussis* envoyés au CNR par le réseau RENACOQ (146 isolats)** par rapport à l'année 2011 (104 isolats) avec une stabilité des âges des patients (63 % ont moins de 6 mois) ;
- **pas d'augmentation du nombre d'isolats de *B. parapertussis* ;**
- des isolats envoyés par le collège de bactériologie, virologie et hygiène de France, ce qui est primordial pour la poursuite de l'analyse de l'évolution des populations de bordetelles, en particulier des isolats de *B. bronchiseptica* et *B. holmesii* ;
- **une utilisation de plus en plus intensive de la PCR -TR comme test diagnostic direct de la coqueluche à l'aide de trousse commerciales.** Le CNR, à la demande des collègues hospitaliers, évalue régulièrement ces trousse ;
- **l'organisation d'un contrôle qualité pour les microbiologistes du RENACOQ.**

Equipe

La composition de l'équipe du CNR et la qualification de chacun de ses membres sont représentées sur l'organigramme de la Figure 1. Ce CNR fait partie de l'unité de recherche PTMMH qui comprend aussi le CNR des corynebactéries du complexe *diphtheriae*, et une équipe de recherche avec un chef de laboratoire Institut Pasteur, un directeur de recherche au CNRS, un ingénieur, un technicien supérieur, un stagiaire post-doctoral, trois étudiants en thèse et des stagiaires du réseau international des Instituts Pasteur.

Figure 1 : Organigramme

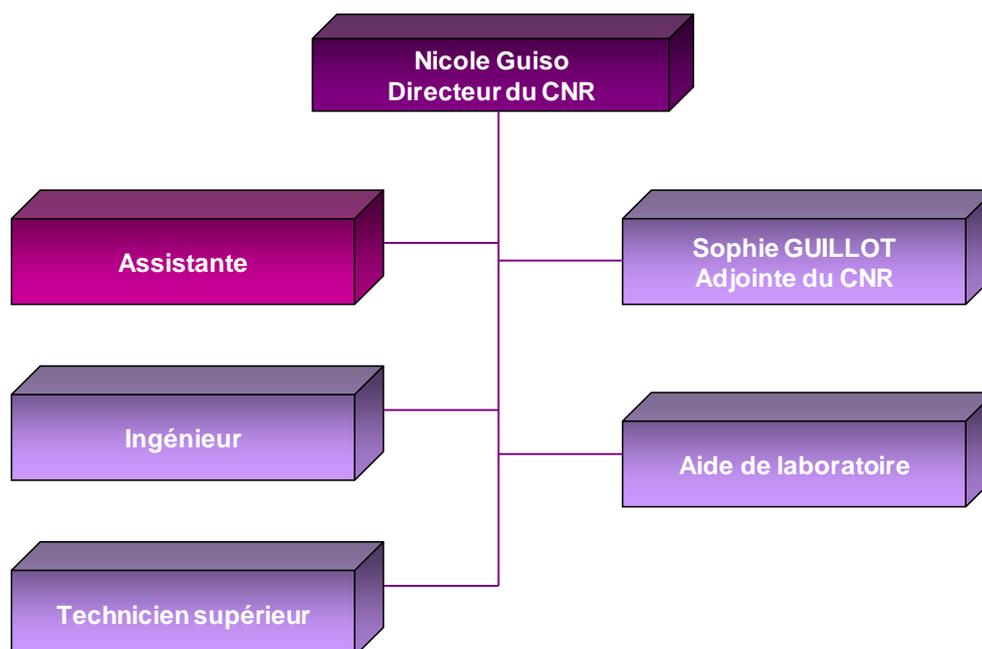


Figure 2 : Politique qualité de l'Unité de Recherche «Prévention et Thérapie Moléculaire des Maladies Humaines» et du CNR de la coqueluche et autres bordetelloses

La politique qualité de l'Unité PTMMH est de répondre toujours mieux :

- ▶ à ses missions de Centre national de Référence et d'Unité de recherche
- ▶ aux attentes de ses correspondants : Autorités nationales de santé, Organismes internationaux, Cliniciens et Médecins, Industriels, Partenaires scientifiques.

Pour cela, l'unité a développé, depuis plusieurs années, un système de gestion de la qualité visant à accroître l'efficacité de ses fonctionnements et à garantir des résultats justes, reproductibles et transmis dans les délais.

Dans cette dynamique, voici les objectifs de l'unité pour 2012 :

- Les changements réguliers au sein de l'équipe ainsi que l'évolution des techniques nous incitent, plus que jamais, à assurer le maintien des compétences et la transmission des savoirs au sein de l'unité. Sur ce point, l'unité sera donc particulièrement vigilante :
 - à ce que chaque technique de l'unité soit partagée par au moins deux personnes. Ce transfert de savoir et de savoir-faire se fera notamment par le biais des habilitations et de la formation ;
 - au renforcement des contrôles visant à assurer le maintien des compétences et à éviter les dérives dans la réalisation des techniques.
- Nous porterons également nos efforts sur l'optimisation des performances (en termes de sensibilité et de spécificité) de nos techniques de PCR en temps réel et sur la mise au point de nouvelles techniques de PCR temps réel, d'analyses et comparaison de séquences génomiques, de transcriptomique et de protéomique.
- Dans le cadre de ses missions de Centre National de Référence, l'unité cherchera à optimiser ses délais de caractérisation des isolats et de saisie des caractéristiques dans le système informatique LAGON. Ceci, dans le but de faciliter et de rendre plus efficace l'exploitation informatique ultérieure de ces informations, lors de la surveillance ou des expertises. Pour cela, chacun cherchera à optimiser l'organisation de son temps de travail via une planification plus efficace des manipulations et des saisies et à une meilleure prise en compte du risque de surcharge imprévue tel que les épidémies ou les cas en collectivité, en prévoyant notamment d'avantage de marges.
- Enfin, les chercheurs et techniciens de l'unité porteront une attention particulière à la planification des expériences et au pilotage des projets via l'élaboration de protocoles d'expériences décrivant les objectifs du projet, les moyens et les techniques à mettre en oeuvre pour les atteindre, les résultats attendus et les risques de ne pas aboutir comme prévu (identification et prise en compte des freins probables).
- Dans le cadre de la politique qualité du CNR l'unité s'engage dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189, de la technique de diagnostic moléculaire par PCR-TR de la coqueluche.

En tant que Responsable de l'unité, je m'engage :

- à garantir de bonnes pratiques professionnelles,
- à assurer la qualité de nos prestations au service de nos correspondants,
- à poursuivre la mise en place d'un système de gestion de la qualité qui réponde aux prescriptions de la norme ISO/CEI 15189.

Et j'invite l'ensemble du personnel à veiller au respect des politiques et des procédures dans la réalisation de ses travaux.

Nicole Guiso, Responsable de l'Unité
Actualisation le 2 février 2013

Démarche qualité des Laboratoires de Référence et d'Expertise (LRE) : synthèse 2012

Historique :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale.

Projet ISO 15189 des LRE de l'Institut Pasteur :

➤ **Bilan des actions réalisées en 2012 :**

Paris :

- Mise en place du Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode
- Formations : ISO 15189 (2 collaborateurs par LRE), WebCampus et Kalilab
- Direction déléguée aux Ressources Techniques et à l'Environnement et Direction Médicale : Lettre d'engagement de moyens pour le projet ISO 15189
- Audits internes ISO 15189 pour 3 CNR, la CIBU et 5 services supports
- Recrutement ingénieur qualité
- Politique et manuel qualité LRE-Multi-Site (LRE-MS) avec inclusion de la CIBU dans le périmètre d'accréditation
- Dépôt du dossier COFRAC (Novembre 2012)
- Installation de Kalilab (module Fiche Qualité) sur 15 sites (CNR et CIBU)

Lyon / RIIP :

- Démarrage de l'accompagnement QE-DD/PREISO sur les CNR de Lyon et de la Guyane

➤ **Perspectives 2013-2014 :**

- Audit interne qualité et technique ISO 15189 : Avril 2013
- Revue de direction LRE-MS : 26 Avril 2013
- Audit initial COFRAC : Juin 2013 (*indicatif*)
- GT technique LRE 1ère et 2ème vague : Juin et octobre 2013
- Finalisation dossiers de validation de méthode (1ère et 2ème vagues) : Décembre 2013

- Revues qualité LRE : Janvier 2014
- Audit interne : Février 2014

Revue de direction LRE-MS : Mars 2014

Politique qualité du CNR Coqueluche et autres bordetelloses

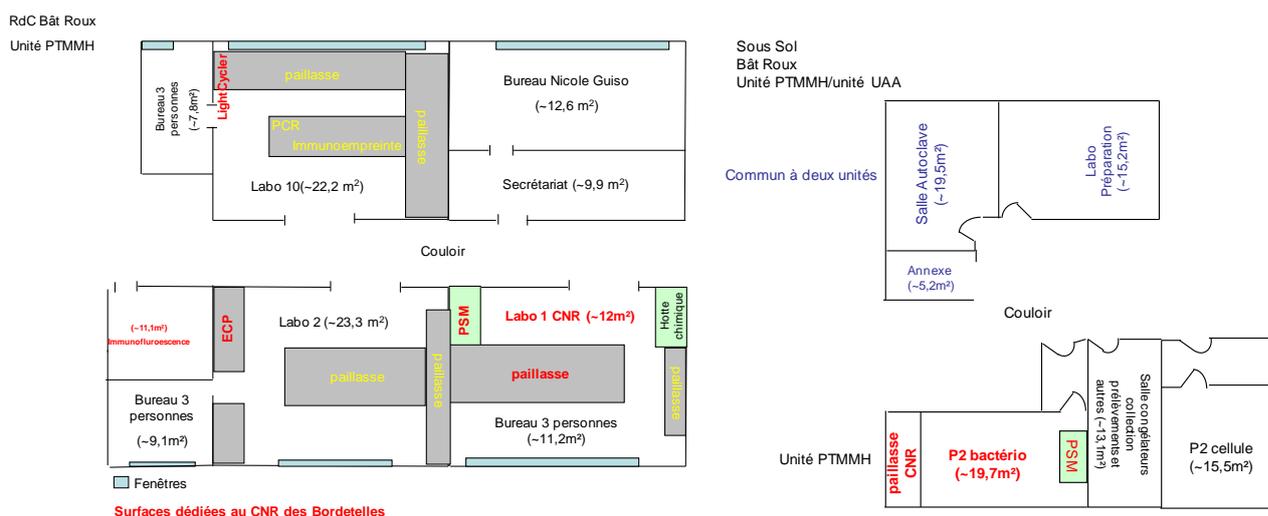
La politique qualité de l'unité et du CNR est résumée **Figure 2**. Des contrôles qualité intra et inter laboratoires sont régulièrement réalisés en ce qui concerne les techniques de diagnostics biologiques des bordetelloses. Chacune des techniques utilisées a un mode opératoire qui est enregistré et géré par **le logiciel Webcampus** accessible à tous les membres du CNR et de l'unité de recherche. Ces modes opératoires sont ré-actualisés régulièrement en fonction de l'évolution des techniques. Ils sont distribués aux laboratoires de bactériologie hospitaliers qui en font la demande. L'ensemble des produits utilisés ainsi que sérums et antigènes de référence est colligé dans le logiciel **LabCollector**. Depuis septembre 2012, le logiciel **Kalilab** a été mis en place pour la gestion des non conformités. Enfin, la surveillance des paramètres physiques (températures, CO₂) de nos équipements est gérée par le logiciel **Océasoft**.

L'assurance qualité est gérée par l'unité de recherche, depuis la création du CNR en 1993.

Locaux

L'ensemble des missions du CNR est réalisé à l'Institut Pasteur dans les locaux qui sont représentés en **Figure 3**.

Figure 3 : Plan de l'unité de recherche Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1 LISTE DES TECHNIQUES DU CNR

2.1.1 Identification et caractérisation des bactéries du genre *Bordetella*

- L'ensemble des données concernant les isolats cliniques reçus au laboratoire est géré informatiquement par le logiciel Lagon (EpiConcept) ;
- Les techniques d'identification et de caractérisation des bactéries, réalisées au CNR, sont les techniques de bactériologie classique ;
- La sensibilité aux antibiotiques de tous les isolats cliniques envoyés ou isolés au CNR (ampicilline, la céfalexine, la streptomycine, l'érythromycine, l'azithromycine, la clarithromycine, le triméthoprim et le sulfaméthoxazole) est testée ;
- La production des déterminants de virulence est vérifiée
 - avec des anticorps monoclonaux spécifiques, par agglutination et/ou immunofluorescence pour les protéines fimbriales ;
 - par visualisation de l'hémolyse et le dosage de l'activité adényl cyclase pour la toxine adényl cyclase-hémolysine ;
 - avec des anticorps polyclonaux spécifiques, par immuno-empreinte, pour la toxine de pertussis, l'hémagglutinine filamenteuse et la pertactine ;
- Le typage et la classification des isolats se fait avec la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP). Les profils de restriction des isolats obtenus sont ensuite comparés à ceux des souches de référence et des souches vaccinales à l'aide du logiciel Bionumerics (AppliedMaths) ;
- Enfin, tous les isolats reçus ou isolés et identifiés sont ensuite introduits en triple dans la collection après analyse et sauvegarde de leurs caractères moléculaires dans le logiciel Bionumerics ;
- ***Dans le cas où un isolat appartenant au genre *Bordetella* présente des caractères différents de ceux généralement décrits, l'unité de recherche teste ses propriétés dans le modèle murin d'infection intranasale, analyse ses interactions avec les macrophages ou les cellules épithéliales, et effectue la séquence partielle ou entière des gènes de structure de certaines toxines et adhésines voire la séquence totale du génome des isolats ;***
- Dans le cas où l'identification de l'isolat est difficile, comme c'est le cas pour certaines espèces de bactéries du genre *Bordetella*, en raison du manque de caractères biochimiques ou de caractères inhabituels, nous réalisons la séquence de l'ADNr 16S. ***Le séquençage de l'ADN génomique qui est nécessaire pour permettre l'identification des isolats est réalisé par la plate-forme de Génotypage des pathogènes et Santé Publique (PF8) située à l'Institut Pasteur.***

2.1.2 Constitution d'une collection

Notre collection de bactéries du genre *Bordetella* regroupe actuellement plus de 1800 isolats. Nous avons poursuivi la saisie des nouveaux isolats dans l'application informatique Lagon. Tous ces isolats sont classés et conservés en triple dans deux congélateurs à -80°C différents, sous alarme, ainsi que dans une cuve sous azote. Les isolats de référence ont aussi été déposés au Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRB-IP) et à la collection suédoise de Göteborg.

La durée de conservation des isolats est testée régulièrement. Elle est au moins de 10 ans en milieu BSA-SPG à -80°C.

2.1.3 Liste des diagnostics biologiques utilisés et recommandés par le CNR pour la surveillance des bordetelloses

- **Culture** : la culture est recommandée dans tous les cas pour les patients soit nouveau-nés non vaccinés ou incomplètement vaccinés soit enfants, adolescents ou adultes non vaccinés ou dont le délai depuis la dernière vaccination est supérieur à 5 ans. Elle est recommandée pendant la période catarrhale, c'est-à-dire la phase atypique d'une personne ayant été en contact avec un cas confirmé biologiquement dans les 21 jours qui suivent le début de la toux de ce cas et pour tous les patients symptomatiques dans les deux premières semaines de la phase d'état. **Ce diagnostic est très important** car d'une part, il est le seul à être 100 % spécifique et d'autre part, il permet d'analyser l'évolution de la population des Bordetelles et sa susceptibilité vis-à-vis des macrolides et du triméthoprime/sulfaméthoxazole.
- **PCR en temps réel** : Les cinq diagnostics par PCR-TR réalisés sont ceux ayant comme cible :
 - **L'IS481** qui permet la détection des espèces *pertussis* et *holmesii* mais aussi assez souvent *bronchiseptica* ;
 - Le promoteur de la toxine de pertussis (**ptxA-Pr**) qui est spécifique de l'espèce *pertussis* mais dont la détection est moins sensible que celle de l'IS481 ;
 - Le gène BP335 qui permet la détection de l'espèce *pertussis* et quelquefois l'espèce *B. bronchiseptica*
 - **L'IS1001** qui permet la détection de l'espèce *parapertussis* mais aussi quelquefois l'espèce *bronchiseptica* ;
 - **L'H-IS1001** qui permet la détection spécifique de l'espèce *holmesii*

Le CNR échange des contrôles qualité (CQ) avec des laboratoires de microbiologie hospitaliers ainsi que des laboratoires de biologie médicale (LBM). La liste des laboratoires réalisant des contrôles

qualité avec le CNR est indiquée sur le site web du CNR.

- **Sérologie** : Seul le dosage des anticorps anti-toxine de pertussis (anti-PT) est spécifique d'une infection ou d'une vaccination à *B. pertussis*. **Aucun test commercial n'a été validé.** La technique de référence est la technique ELISA, réalisée uniquement par les laboratoires de référence dans le monde et donc réalisée par le CNR. Ce test est utilisé par le CNR lors de cas groupés de coqueluche dans des collectivités. Les conditions d'utilisation de ce diagnostic sont précisées dans les recommandations

(http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf).

Nous avons réalisé le CQ de l'ECDC avec cette technique mais nous testons actuellement trois kits commerciaux.

2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2012

2.2.1 Nature des échantillons biologiques étudiés

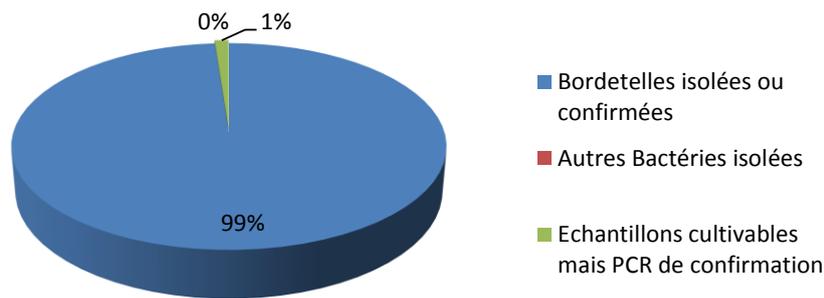
L'ensemble des prélèvements biologiques reçus au laboratoire est géré informatiquement à l'aide du logiciel Lagon. Les prélèvements biologiques (aspirations naso-pharyngées, expectorations, sérums) que nous avons reçus en 2012 provenaient essentiellement de :

- patients infectés par *B. pertussis* soit hospitalisés soit lors d'infection communautaire et dont les prélèvements sont envoyés par les cliniciens participant au réseau RENACOO ;
- patients inclus lors de cas groupés à l'hôpital, dans des collectivités (crèches, établissements scolaires, usines...);
- patients infectés par *B. bronchiseptica* ou d'animaux infectés par cette bactérie ou par d'autres espèces de Bordetelles et envoyés par A. Le Coustumier (Hôpital de Cahors) et les bactériologistes du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France ;
- l'unité de recherche a reçu des prélèvements dans le cadre de la surveillance ACTIV.

2.2.2 Nombre d'isolats cliniques de *Bordetella* reçus en 2012

Nous avons reçu en 2012 : 166 isolats cliniques du genre *Bordetella*, 1 isolat non viable mais qui a été identifié comme une *Bordetella* par PCR (Figure 4).

Figure 4 : Répartition des isolats reçus au CNR en 2012



Nous avons, au cours de l'année 2012, isolé ou confirmé l'identification :

Dans le cadre du RENACOQ :

146 isolats de *B. pertussis*

4 isolats de *B. parapertussis*

Provenant du collège de Bactériologie Virologie et Hygiène des Hôpitaux Généraux de France :

8 isolats de *B. pertussis*, Annecy (x2), Le Chesnay (x1), le Pharo (x1) et Saint Etienne (x4) ;

6 isolats de *B. bronchiseptica* d'origine humaine de Abbeville (x1), Amiens (x1), Aix en Provence (x1), Cahors (x1), Epinal (x1) et Saint- Brieuc (x1);

1 isolat de *B. holmesii* de Paris ;

1 isolat de *B. petrii* de Cahors.

Le nombre d'isolats cliniques de *B. pertussis* reçus en 2012 au CNR, est en augmentation comparé à 2011 (figure 5 et Tableau 1)

Figure 5 : Répartition par espèces de Bordetelles reçues ou isolées au CNR en 2012

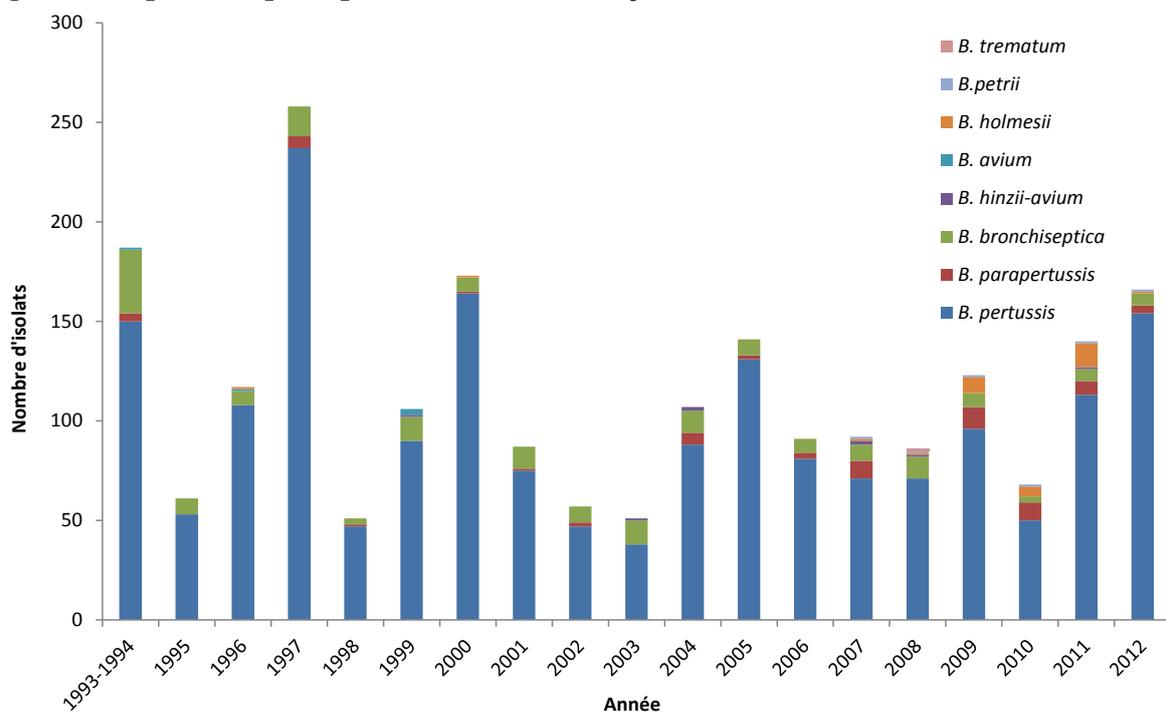


Tableau 1 : Répartition par année des principales espèces responsables de bordetelloses humaines

ANNEES ESPECES	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	<i>B. pertussis</i>	108	237	47	90	164	75	47	38	88	129	81	71	71	96	50	113
<i>B. parapertussis</i>	0	6	1	0	1	1	2	0	6	2	4	9	0	11	9	7	4
<i>B. bronchiseptica</i>	7	15	3	12	7	11	8	7	11	8	3	8	11	7	3	6	6
<i>B. holmesii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	8	5	12	1

2.2.3 Nombre de PCR réalisées

Nous avons réalisé en 2012 654 PCR-TR (Figure 6) :

131 dans le cadre de la détermination de la limite de détection des cibles utilisées pour le diagnostic moléculaire des différentes espèces de Bordetelles

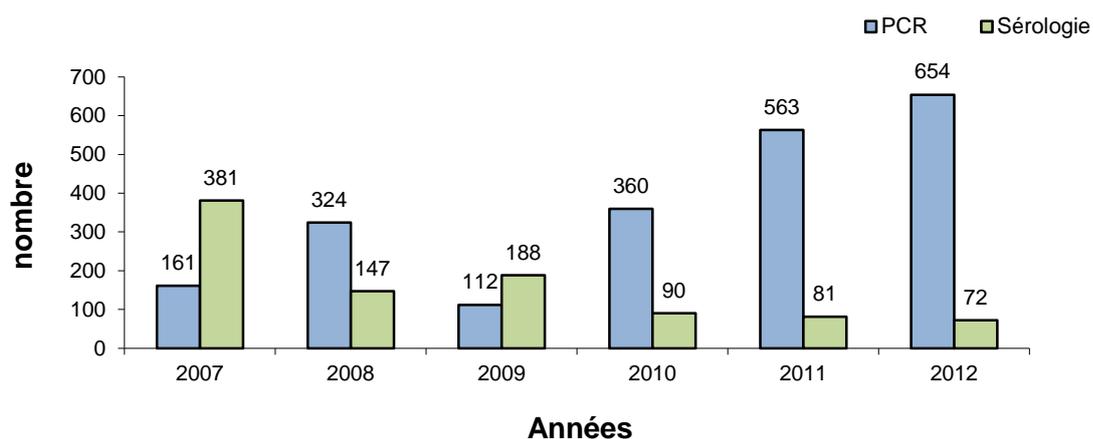
132 dans le cadre du contrôle de qualité européen (QCMD)

60 dans le cadre du test d'une trousse multiplex

84 dans le cadre de demandes par les laboratoires hospitaliers

267 dans le cadre de la surveillance RENACOQ

Figure 6 : Diagnostics biologiques et enquêtes collaboratives réalisés par le CNR pour les années 2007 à 2012



2.2.4 Nombre de sérologies réalisées

Nous avons réalisé, en 2012, 72 sérologies dans le cadre de la surveillance des bordetelloses, d'une épidémie dans une collectivité, de contrôles demandés par les ARS et pour l'EQA européen.

La **figure 6** montre la comparaison PCR et sérologies réalisées de 2007 à 2012. Le nombre de sérologies demandées au CNR est stationnaire en 2012 mais le nombre de PCR continue à augmenter, ce qui engendre un coût beaucoup plus important.

2.2.5 Nombre d'appels et de messages

En 2012, nous avons continué à apporter une aide au diagnostic lors de cas individuels ou groupés par téléphone et par courriel. La comparaison avec les années précédentes est indiquée **Figure 7**.

2.2.6 Distribution des standards et divers produits biologiques

Nous continuons d'envoyer régulièrement à des laboratoires hospitaliers français, européens, américains, ou à des laboratoires d'analyses médicales des souches de référence des différentes espèces de Bordetelles, ainsi que des ADN de référence purifiés.

2.2.7 Techniques transférées vers d'autres laboratoires (RENACOQ ou autres)

Nous envoyons régulièrement les modes opératoires concernant les diagnostics de référence (culture ou PCR) aux laboratoires hospitaliers ou LAM qui en font la demande.

2.2.8 Contrôles qualité

Comme en 2010, nous avons préparé des CQ pour les laboratoires du réseau RENACOQ et de certains laboratoires hospitaliers ou LAM intéressés. Ce travail a mobilisé l'adjoint du CNR 30 jours à temps plein. Les tubes du CQ ont été envoyés en mai 2012 accompagné d'un questionnaire. Une compilation de l'ensemble des résultats a été envoyée en novembre 2012. Une affiche avec l'ensemble des résultats a été présentée à la RICAI fin novembre 2012 (**Annexe 1**).

2.2.9 Informations complémentaires en provenance du laboratoire CERBA

Le nombre de PCR réalisées par le laboratoire Cerba a augmenté **d'un facteur de 1,7**. A l'inverse, les demandes de sérologies à ce laboratoire ont continué à diminuer. Ces demandes concernent essentiellement l'adolescent et l'adulte (**Tableau 2**). Ces données indiquent que les recommandations du CSHPF de 2008 (http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcspa20080905_coqueluche.pdf) concernant le diagnostic biologique **commencent** à être suivies et corrélent avec le fait que le diagnostic par PCR-TR est maintenant remboursé. **Malheureusement il y a toujours 25306 sérologies pratiquées alors que ce diagnostic biologique n'est plus remboursé !**

Tableau 2 : Nombre de PCR et sérologies réalisées par le CBMS de l'Institut Pasteur puis par le laboratoire Cerba

ANNEES \ DIAGNOSTICS	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
PCR	400	1100	1230	1073	2595	1616	1609	1176	1603	2500	2184	2271	2306	2588	2133	7611	13115
Sérologie	4000	10000	11330	8665	13628	14165	13181	14293	17492	46606	49500	68803	77537	65318	42779	32742	25306

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

En France, la surveillance sur le terrain est réalisée grâce à plusieurs réseaux:

Le réseau RENACOQ, réseau de surveillance hospitalière, coordonné par l'InVS et comprenant 44 centres hospitaliers avec 44 pédiatres et 44 microbiologistes et le CNR (Figure 8) ;

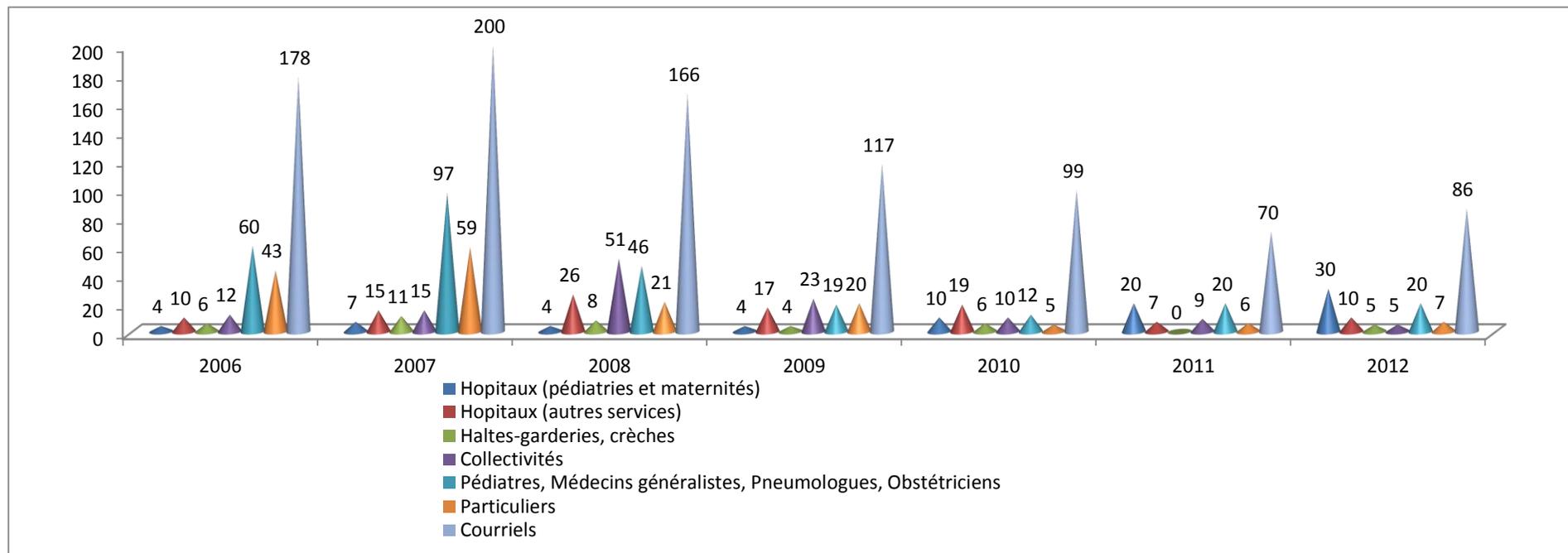
Le réseau du Collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux et le CNR ;

Le réseau ACTIV, réseau de 64 pédiatres en ambulatoire et l'unité de recherche.

Figure 8 : Réseau RENACOQ



Figure 7 : Sollicitations téléphoniques ou par courriels du CNR Coqueluche our les années 2006 à 2012



3.1 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION DE LA COQUELUCHE :

Réseau RENACOQ

En 2012, nous avons poursuivi la surveillance des infections à *B. pertussis* et à *B. parapertussis*. L'analyse des données obtenues pour 2012 n'est pas encore terminée. Mais on observe une augmentation du nombre d'isolats reçus au CNR par le réseau, (figure 5 et Tableau 1) confirmant le cycle de coqueluche initié en 2011. Depuis 1991, des cycles de coqueluche ont été observés, comme indiqué figure 5, en 1994, 1997, 2000, c'est-à-dire tous les trois ans, et en 2005. Cette fois 7 ans après. **L'augmentation de l'intervalle est-il dû à l'augmentation de la couverture vaccinale ? Il est donc extrêmement important que l'action du réseau RENACOQ se poursuive, afin d'évaluer précisément cet impact dans les dix prochaines années, ceci avec des diagnostics spécifiques (Réf. 5 et 9) !**

En 2012, l'âge des patients sur lesquels ont été collectés les isolats est comparable à celui des années 2010 et 2011 avec 63 % des isolats collectés sur des nouveau-nés de moins de 6 mois et 12 % chez des plus de 16 ans.

L'analyse des isolats collectés en 2012 montre une augmentation du nombre d'isolats de *B. pertussis* n'exprimant pas tous les facteurs de virulence. Il n'y a pas de spécificité géographique.

Depuis 2007, plus de 95 % des isolats cliniques de *B. parapertussis* reçus au CNR n'expriment pas la pertactine.

3.2 BORDETELLOSES AUTRES QUE COQUELUCHE

La surveillance de ces infections est réalisée avec la collaboration du collège de Bactériologie, Virologie et Hygiène des Hôpitaux.

3.2.1 Infections humaines à *B. bronchiseptica*

La surveillance de ces infections s'est poursuivie. Il s'agit, comme les années précédentes, pour les cas d'infections à *B. bronchiseptica* et *B. petrii*, uniquement de cas d'adultes immunodéprimés de plus de 41 ans (41, 54, 55, 62, 68 et 85 ans) qui sont atteints de symptômes respiratoires.

3.2.2 Autres bordetelloses humaines

Nous avons reçu en 2012 :

- 1 isolat de *B. holmesii*, collecté à partir d'une hémoculture chez un adolescent de 13 ans drépanocytaire
- 1 isolat de *B. petrii* collecté sur un senior immunodéprimé de 91 ans.

3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX

3.3.1 Antibiotiques

Aucune *Bordetella pertussis* résistant aux macrolides n'a été isolée, cette année (**Réf. 5**).

3.3.2 Vaccins

La surveillance des isolats qui pourraient être résistants à l'immunité vaccinale se fait d'une part, par génotypage et typage (ECP) et d'autre part, par l'analyse de la production de toxines et adhésines majeures. Dès qu'un isolat présente des propriétés différentes, sa pathogénicité dans le modèle murin d'infection intranasale est testée ainsi que sa pathogénicité vis-à-vis de cellules phagocytaires.

3.4 DETECTION ET INVESTIGATION DE CAS GROUPES ET DE PHENOMENES ANORMAUX

En 2012, nous avons apporté une aide au diagnostic lors de cas groupés d'infections respiratoires par téléphone et par courriel (**Figure 7**).

3.5 CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS

3.5.1 Europe

Nous continuons à faire partie du réseau européen **EUpertstrain** et nous échangeons, outre des isolats cliniques, des modes opératoires ou nous réalisons des enquêtes inter-laboratoires. Nous nous réunissons une fois par an. Notre collaboration a donné lieu à une publication (**Réf. 8 et 10**)

3.5.2 International

L'unité de recherche dans laquelle se trouve le CNR, a continué sa mission de formation au sein des Instituts Pasteur du Réseau International afin de maintenir un réseau de maladies à prévention vaccinale (réseau SURVAC).

En 2012 l'unité de recherche a poursuivi sa collaboration avec Tunis (**Réf. 3**), Alger et Saint-Petersbourg. Une collaboration a été établie avec Casablanca, Marrakech et Bucarest.

4. ALERTE

Lors de cas groupés de coqueluche, le CNR demande de prévenir l'InVS et les ARS. Le CNR envoie par courriel le calendrier vaccinal, l'avis du HCSP et les Flash Info et conseille sur les diagnostics biologiques à utiliser.

5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

Nous avons poursuivi nos missions d'enseignements, de formation et d'accueil de stagiaires.

Les informations concernant le CNR sont sur notre site web

(<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/bordet-index.html>), régulièrement mises à jour.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Les recherches effectuées par le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses concernent la mise au point de nouveaux tests diagnostiques des Bordetelloses, ainsi que l'analyse et la comparaison des isolats circulant avec les souches vaccinales françaises. Ces recherches sont réalisées en étroite collaboration avec celles menées par l'unité de Prévention et Thérapie Moléculaires des Maladies Humaines. Elles concernent l'étude des interactions des bordetelles avec l'hôte et l'évolution temporelle de ces espèces en fonction de leur environnement.

6.1 INTRODUCTION ET RESUME DES TRAVAUX REALISES DE 1989 A 2010

Nos recherches ont porté essentiellement sur la pathogénicité de la bordetelle "humaine" *B. pertussis* et de la bordetelle "animale" *B. bronchiseptica* et sur leurs interactions avec leur hôte, à l'aide d'un modèle murin d'infection respiratoire, de modèles cellulaires et d'enquêtes épidémiologiques. Ces recherches ont été entreprises afin de mieux comprendre la physiopathologie des infections à *Bordetella*, d'analyser l'évolution des populations bactériennes dans différents environnements, d'améliorer les moyens de diagnostic et de prévention contre ces bactéries et de mettre au point des outils thérapeutiques contre ces bactéries.

Les protéines bactériennes exprimées par les trois espèces du genre *Bordetella* les plus étudiées ont dès leur mise en évidence été classées en adhésines, c'est-à-dire les protéines permettant l'adhésion de la bactérie sur les cellules de l'hôte, et toxines c'est-à-dire les protéines induisant des effets cytopathogènes. Les principales adhésines sont l'hémagglutinine filamenteuse ou FHA, les protéines fimbriales ou Fim (Fim 2 et 3), la pertactine ou PRN. Les principales toxines sont la toxine de pertussis ou PT, toxine ADP-ribosylante, l'adényl cyclase-hémolysine ou AC-Hly, toxine RTX, la toxine BteA, la toxine dermonécrotique ou TDN, et la toxine cytotrachéale ou TCT. D'autres protéines sont en cours de caractérisation, surtout depuis que la séquence du génome des trois espèces bactériennes est connue. Seule la PT, comme toxine et la FHA, la PRN et les Fim comme adhésines entrent dans la composition des vaccins sous-unitaires.

Les recherches de notre unité ont consisté :

- à standardiser le modèle murin d'infection respiratoire par voie intranasale,
- à déterminer le rôle des différentes toxines et adhésines au cours de l'infection à l'aide de ce modèle ;
- à caractériser le rôle de l'AC-Hly en tant que toxine ;
- à montrer qu'elle agit en synergie avec la PT dans le cas d'une infection par *B. pertussis* ;
- à caractériser les réponses après infection et après vaccination chez la souris mais aussi chez l'homme. Nous avons pu, en particulier, montrer que la vaccination par des vaccins sous-unitaires composés de protéines issues de l'espèce *pertussis* induisait une immunité protectrice vis-à-vis de *pertussis* mais pas vis-à-vis de *parapertussis*, ce qui pourrait provoquer un changement d'épidémiologie au moment où les vaccins Ca remplaceraient les vaccins Ce.

A l'aide de modèles cellulaires, plusieurs observations ont été faites. *B. pertussis*, *parapertussis* et *bronchiseptica* ont un pouvoir invasif très faible dans les cellules épithéliales trachéales humaines spécifiques. Les espèces *pertussis* et *parapertussis* ne sont pas cytotoxiques pour ces cellules mais l'espèce *bronchiseptica* l'est par nécrose. Les trois espèces sont capables d'être invasives mais ne persistent pas et ne se multiplient pas. Elles sont ensuite dégradées, même l'espèce *bronchiseptica* qui est cytotoxique. En ce qui concerne les cellules phagocytaires, *B. pertussis* est cytotoxique et provoque leur mort par apoptose. Cette action spécifique est due à l'expression de l'AC-Hly. En ce qui concerne l'espèce *bronchiseptica* la cytotoxicité serait de nouveau l'induction d'une mort cellulaire par nécrose et non par apoptose.

La population de *B. pertussis* est peu polymorphe, évolue avec le temps, dans les régions où la couverture vaccinale des enfants est très élevée, avec une diminution de la diversité génétique. Les isolats semblables aux souches vaccinales ne circulent plus indiquant l'efficacité du vaccin Ce à induire une immunité apte à contrôler l'infection due à des isolats semblables aux souches vaccinales. Il continue, cependant, à circuler des isolats différents des souches vaccinales et toujours aussi virulents. Ces isolats ont perdu du matériel génétique par rapport aux souches vaccinales. Cette perte, médiée par des séquences d'insertion, ne concerne pas les gènes de virulence et c'est pourquoi les isolats circulant sont toujours aussi virulents.

Parallèlement à cette recherche, nous avons participé à partir de 1990 à un certain nombre d'enquêtes avec des pédiatres hospitaliers et des médecins généralistes. Elles ont permis de montrer le changement d'épidémiologie en France depuis l'introduction de la vaccination généralisée en 1966 avec des vaccins combinés (D-T-Polio-Coq-Hib). Ces différentes enquêtes ont montré que les adolescents et les adultes, dont l'immunité a diminué au cours du temps constituent un réservoir pour les jeunes nourrissons trop jeunes pour être vaccinés. Ces observations ont amené le Comité Technique des Vaccinations Français à introduire un rappel vaccinal pour les adolescents à 11-13 ans en 1998, pour les jeunes adultes et le personnel hospitalier

en contact avec les nourrissons en 2004, pour tous les personnels de profession médicale, y compris ceux travaillant dans les collectivités de personnes âgées et pour tous les adultes n'ayant pas eu de rappel vaccinal depuis dix ans à l'occasion d'un rappel décennal ou lors d'un projet parental pour les futurs parents mais aussi pour tous les adultes qui seront dans l'entourage du bébé et en 2008 pour tous les adultes à l'occasion du rappel à 27-28 ans et pour tout le personnel hospitalier. De plus des recommandations ont été rédigées pour la conduite à tenir lors de cas de coqueluche groupés.

6.2 RECHERCHES EFFECTUEES PAR LE CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2012

6.2.1 Polymorphisme et évolution spatio-temporelle des espèces de Bordetelles

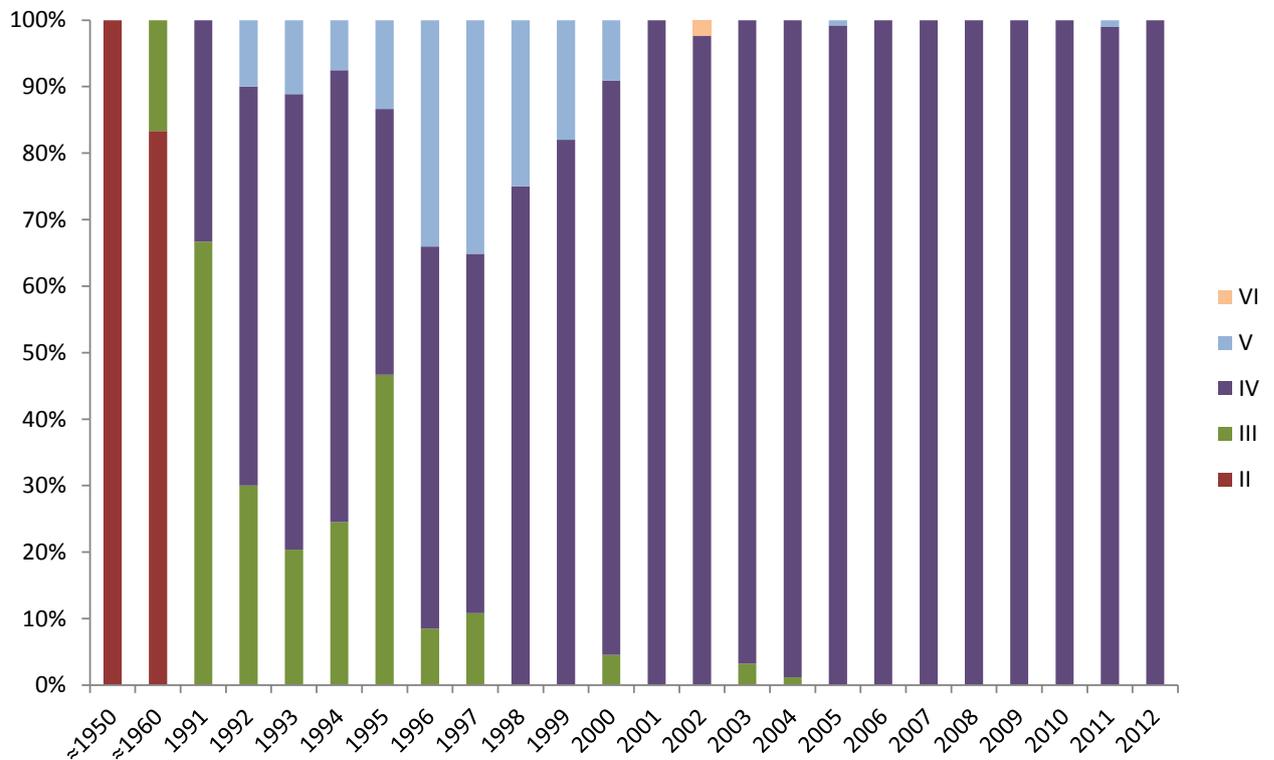
Espèces *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*

Comme mentionné les années précédentes, l'un des aspects de la maladie à prévention vaccinale qu'est la coqueluche est l'analyse fine du polymorphisme de son agent et le contrôle de sa circulation par l'immunité de la population humaine.

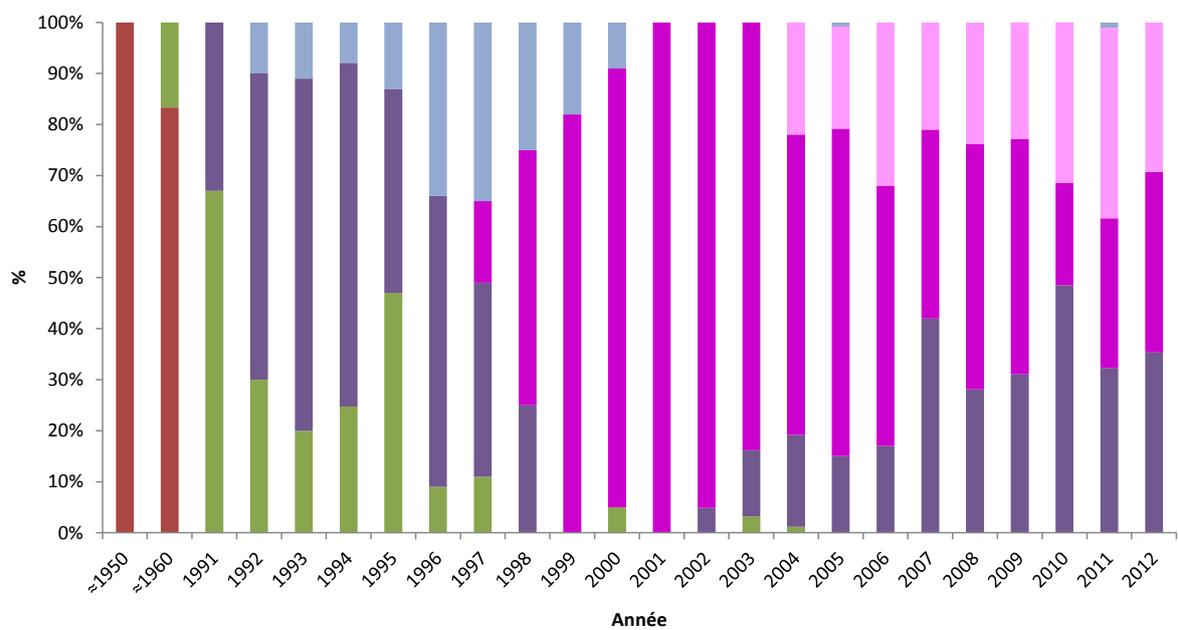
La majorité des isolats, collectés en 2012, ont les caractéristiques bactériologiques habituelles. Ils expriment en majorité la protéine fimbriale 3 (92 % ; 2 % la protéine fimbriale 2, 1 % les deux protéines fimbriales et 5 % aucune des protéines fimbriales). Tous les isolats expriment l'AC-Hly. Leur typage par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) montre qu'ils appartiennent tous au groupe ECP IV (Figure 9A). La répartition en sous-groupe (ECP) ne montre pas de changement depuis 2008. La circulation du sous-groupe IV γ , apparu en 2003 ne semble pas augmenter (Figure 9B).

Figure 9 : Répartition des isolats de *B. pertussis* par groupe d'ECP

A



B



La majorité des isolats collectés et testés expriment les toxines et adhésines. L'allèle du promoteur du locus codant la PT est de type 3, de la sous-unité A de la PT est de type *ptxA1* et celui de la PRN est de type *prn2*, comme la plupart des isolats circulant depuis 1990. Cependant, il est important de noter que depuis 2005 des isolats n'exprimant pas un des antigènes vaccinaux, la PRN, circulent. La proportion de ces isolats augmente d'année en année et a atteint 14 % en 2012.

Il est important de noter que depuis 2007 95 % des isolats de *B. parapertussis* n'expriment plus la PRN. De plus un nouveau groupe ECP a été mis en évidence. Ce groupe ECP, appelé BPPII, comprend 77 % des isolats récemment collectés.

En conclusion, on peut donc souligner que 10 ans après l'introduction des vaccins sous-unitaires,

- **il y a une stabilité des isolats de *B. pertussis* analysés par ECP mais une augmentation des isolats n'exprimant pas un antigène vaccinal, principalement la PRN ;**
- **il y a une évolution des isolats de *B. parapertussis* analysés par ECP et une perte d'expression de la PRN par la majorité des isolats collectés depuis 2007.**

Ces isolats émergents font-ils partie d'un clone ? D'après les données de l'unité de recherche ce n'est pas le cas (Réf. 6)

Espèce *Bordetella holmesii*

B. holmesii est une espèce du genre *Bordetella* qui est généralement décrite comme causant des bactériémies chez des patients aspléniques ou drépanocytaires, mais elle est aussi isolée sur des prélèvements respiratoires.

Les isolats de *B. holmesii* sont très proches les uns des autres par ECP. Leur comparaison génomique a été réalisée par l'unité de recherche (**V. Bouchez et N. Guiso, Adv Infect Dis sous presse**).

Par ailleurs, la description d'un patient hospitalisé à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière plusieurs fois pour un lymphome contrôlé après auto-greffe et plusieurs chimio-thérapies a été soumis pour publication. Ce cas est important pour comprendre l'éventuelle pathogénicité de *B. holmesii*. Pour la première fois nous avons pu montrer que chez ce patient, atteint d'érésipèle, et chez lequel *B. holmesii* a été isolée plusieurs fois dans des hémocultures était aussi porteur asymptomatique de cette bactérie au niveau pharyngé. La bactérie n'a plus été isolée après l'arrêt du traitement par rituximab. **L'hypothèse est que les bactériémies à *B. holmesii* s'observeraient chez des patients porteurs asymptomatiques de cette bactérie au niveau naso-pharyngé.** Or la recherche de la bactérie au niveau naso-pharyngé ne se fait que lors de cas groupés d'infections à *B. pertussis* mais pas dans d'autres occasions. **Par ailleurs, comme nos collègues anglais, nous avons isolé des bactéries ayant des résistances différentes à certains antibiotiques (L. Nguyen et al. soumis).**

6.2.2 Techniques de diagnostic des bordetelloses par PCR en temps réel (PCR-TR)

6.2.2.1 Evaluation des trousses commerciales Diagenode et Bio-evolution

En 2011-12, le test de trousses commerciales pour le diagnostic moléculaire des bordetelloses s'est poursuivi. La plupart des trousses mises sur le marché récemment proposent une PCR-TR multiplex qui a l'avantage de cibler les séquences d'insertion 481 et 1001 dans une seule réaction.

Trousse Diagenode

La trousse Diagenode-050 permet la détection de l'ADN de *Bordetella* par PCR-TR multiplex. Un contrôle interne d'extraction/inhibition de PCR-TR est inclus dans le test. La PCR-TR multiplexée a pour cible la séquence de l'IS481, de l'IS1001 et le contrôle d'extraction/inhibition (ajouté avant l'étape d'extraction de l'ADN). La mise en place s'est faite sans difficulté mais a nécessité l'installation d'un fichier de compensation sur le LC480. Plusieurs séries de tests ont été effectuées en comparaison avec la PCR-TR utilisée en routine dans notre CNR.

A) Comparaison de la trousse Diagenode-050 vs trousses Argene avec utilisation d'une gamme d'ADN extraite avec le kit « DNeasy Blood & Tissue » (Qiagen) : Les résultats obtenus avec la cible IS481 et la cible IS1001 sont satisfaisants et comparables en sensibilité à ceux obtenus avec les trousses Argene (Réf. 69-011 et 71-012) utilisées en routine.

B) Comparaison de la trousse Diagenode-050 vs trousse Argene avec utilisation d'une gamme d'ADN extraite avec le kit «High Pure PCR Template» (Roche) à partir de suspension bactérienne (même condition qu'un prélèvement respiratoire humain) : B1) Cibles IS481 et IS1001 : Les résultats obtenus avec la cible IS481 sont comparables en sensibilité à ceux obtenus avec le kit Argene (réf 69-011: 0,5 CFU/PCR dans nos conditions). Par contre, pour la cible IS1001 il y a une différence d'un facteur 5 (en tenant compte du volume d'échantillon déposé dans le puits) en faveur de la trousse Argene (Réf 71-012 : 1 CFU/PCR dans nos conditions). B2) Cible du contrôle d'extraction/inhibition UIC-cy5: Les valeurs de Ct obtenues après ajout du contrôle interne dans les différents échantillons ont montré une variation importante, non attendue. **Cette observation a été signalée au fabricant de la trousse.**

Coffret Bio-EVOLUTION

Le coffret Bio-Evolution permet la détection de l'ADN de *Bordetella* par PCR-TR multiplex. La PCR-TR multiplexée cible la séquence de l'IS481, de l'IS1001 et un gène humain qui sert de contrôle d'extraction cellulaire. Lors des premiers tests, nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec la cible IS481 ainsi

qu'avec le contrôle cellulaire. En revanche, nous avons obtenu un résultat positif avec la cible IS1001 (valeur de Ct élevée) pour des échantillons IS1001 négatifs, ce qui pouvait conduire à donner un résultat faussement positif. Suite à ce problème de faible "réaction croisée" observé, et après discussion avec le fabricant de la trousse, nous avons testé un nouveau lot. Nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec la cible IS481 ainsi qu'avec la cible IS1001. Les valeurs de Ct des deux cibles selon la positivité des échantillons étaient similaires (-/+ 2 Ct) à celles obtenues précédemment au laboratoire. Contrairement au premier lot, nous n'avons pas observé de faux positif avec la cible IS1001. Nous avons aussi testé les 6 tubes du contrôle qualité que nous avons organisé en 2012. Les valeurs de Ct obtenues avec le nouveau lot sont similaires à celle obtenues par notre laboratoire ou à la valeur de Ct moyenne de l'ensemble des participants. **Lors de l'envoi du rapport final au fabricant, nous leur avons signalé qu'il manquait des informations dans la notice technique livrée avec le coffret.**

6.2.2.2 Détermination de la sensibilité des différentes PCR en temps réel développées au laboratoire

En 2012, la sensibilité du nombre de CFU détecté par les cinq PCR-TR que nous avons développées au CNR a été déterminée (**Réf. 4 et 9**). Ces sensibilités sont les suivantes :

IS481 : 0,5 CFU par réaction

IS1001 : 1 CFU par réaction

PtxA-Pr : 50 CFU par réaction

BP3385 : 30 CFU par réaction

Bho RecA : 30 CFU par réaction

En 2012 nous avons développé une PCR spécifique de *B. holmesii* plus sensible que celle basée sur le gène RecA car elle est basée sur des séquences d'insertion : H-IS1001. Sa sensibilité est la suivante : H-IS1001 : 0,2 CFU par réaction

6.2.3 Développement d'une PCR spécifique de *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*

Depuis plusieurs années nous essayons de mettre au point un tel diagnostic. Nos difficultés étaient dues au fait que les cibles choisies jusqu'à présent n'étaient pas présentes dans le génome de tous les isolats cliniques de *B. bronchiseptica* dont des études phylogénétiques ont montré qu'ils se répartissent en 2 groupes, complexes I et IV. Nous avons poursuivi notre investigation en analysant la région promotrice du gène *flaA* codant le flagelle qui est un des facteurs de virulence exprimé par la plupart des isolats de *B. bronchiseptica*. Nous avons transformé la PCR en point final qui avait été précédemment développée et publiée par le laboratoire, en PCR-TR, technologie plus sensible. Nous avons optimisé la séquence des amorces et sélectionné une sonde en fonction des séquences des souches de référence des espèces de

bordetella qui peuvent être détectées dans un prélèvement respiratoire. La séquence de la région promotrice du gène *flaA* de l'espèce *bronchiseptica* est très proche de celle de l'espèce *parapertussis*, ce qui a nécessité de faire plusieurs essais avant d'obtenir des résultats satisfaisants avec un premier panel d'isolats cliniques. Nous avons ensuite analysé la portion promotrice qui flanque le gène *flaA* d'un grand nombre d'isolats cliniques de *Bordetella bronchiseptica*. Nous avons mis en évidence deux groupes : a) un groupe d'isolats qui appartiendrait au complexe I d'après nos résultats préliminaires et qui possède une séquence proche de celle de la souche de référence qui avait servi pour le choix des séquences des amorces et sondes ; b) un deuxième groupe d'isolat qui appartiendrait au complexe IV et qui possède une séquence différente de celle de la souche de référence, avec dans certains cas une délétion de plusieurs dizaines de nucléotides ... Cette hétérogénéité nous a conduit à sélectionner d'autres sondes et à les tester avec les différentes espèces de *Bordetella*. Notre objectif à ce niveau de développement était de vérifier l'absence de réaction croisée avec les autres espèces et en particulier *B. parapertussis*. Les tests sont en cours de finalisation et devraient nous permettre de proposer un test original en 2 temps. Une première PCR qui permet l'amplification de l'ensemble des isolats de *bronchiseptica* (complexe I et IV) mais aussi de l'espèce *parapertussis* et une deuxième PCR qui permet d'amplifier spécifiquement l'espèce *parapertussis*.

6.3 RECHERCHES EFFECTUEES PAR L'UNITE DE RECHERCHE, EN RELATION AVEC L'ACTIVITE DU CENTRE NATIONAL DE REFERENCE EN 2012

En 2012, les principales questions auxquelles nous avons essayé de répondre sont les suivantes :

- ❖ Comment évoluent la population de *Bordetella pertussis* et celle de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France depuis l'utilisation des vaccins acellulaires ?
- ❖ Comment évolue la population de *Bordetella pertussis* au cours du temps dans des pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?
- ❖ Les isolats de *B. holmesii* collectés en France et dans d'autres pays sont-ils semblables ?
- ❖ Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Tunis ?

6.3.1 Comment évoluent les populations de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* au cours du temps en France ?

6.3.1.1 Caractéristiques de la population de *Bordetella pertussis*

Au niveau du génome :

La réponse à la question posée peut être obtenue en comparant les isolats de l'ère pré-vaccinale à ceux de l'ère post-vaccinale pendant laquelle était utilisé un vaccin coquelucheux à germes entiers (vaccins Ce) et ceux de l'ère post-vaccinale actuelle depuis que nous utilisons des vaccins coquelucheux acellulaires (vaccins Ca). Nous avons pu montrer lors des années précédentes une évolution de la population de *B. pertussis* en France à l'aide de la technique ECP mais aussi à l'aide de plusieurs techniques de génomique telles que l'hybridation soustractive, les puces à ADN et le séquençage des génomes. Il a pu être mis en évidence une influence certaine de l'immunité de la population sur la population bactérienne. En effet, la vaccination avec le vaccin Ce a permis le contrôle des isolats semblables aux souches vaccinales. Malheureusement, des isolats circulaient toujours et ils étaient aussi virulents que ceux de l'ère pré-vaccinale. De plus, nous avons pu montrer que le génome des isolats actuels a diminué et contient plus de séquences répétées, en particulier des séquences d'insertion, que le génome des isolats de l'ère pré-vaccinale.

Ces différentes études nous avaient permis de formuler une hypothèse sur l'évolution des isolats circulant dans des régions utilisant des vaccins Ca et où la couverture vaccinale est de plus en plus élevée. Ces vaccins ciblent la virulence des isolats. Comme tous les isolats qui continuent à circuler sont virulents et que la couverture vaccinale augmente avec les rappels adolescents et adultes, si cette hypothèse est correcte, une diminution de la circulation des isolats virulents devrait être observée. La présence d'un grand nombre de copies de séquences d'insertion sur le chromosome des isolats actuels pourrait faciliter la délétion des gènes de virulence. Il s'avère que nous n'avons pas pu mettre en évidence de nouvelles différences au niveau du génome mais certaines ont été observées au niveau de l'expression des protéines bactériennes et en particulier, les antigènes vaccinaux.

Au niveau de l'expression des déterminants de virulence et de la pathogénicité dans des modèles cellulaire ou animal :

Il s'avère que quelques isolats cliniques, collectés depuis 2005 en France, n'expriment plus soit la PT, soit la PRN et la FHA, soit la PRN ce qui va dans le sens de l'hypothèse formulée précédemment. Ces isolats sont toujours virulents pour les nouveau-nés, dont la plupart ont été hospitalisés mais moins longtemps pour certains.

L'isolat n'exprimant pas de PT n'a pas provoqué d'hyperlymphocytose chez le petit patient. Par ailleurs, il n'est pas apte à induire une infection létale dans le modèle murin. La non expression de la PT est due à une délétion de tous les gènes codant les sous-unités de la toxine.

Les isolats n'exprimant pas PRN, ont une pathogénicité semblable aux isolats exprimant la PRN dans le modèle murin. La cause génétique de la non expression de la PRN est due, soit à la délétion du gène, soit à la délétion de plusieurs nucléotides, soit à des mutations soit, et principalement, à l'intégration d'une IS dans le gène. **Ceci est un résultat important car cela signifie qu'il ne s'agit pas d'un clone émergent mais qu'il s'agit bien de la fluidité du chromosome de *B. pertussis***

Il n'y a qu'un seul isolat FHA- et PRN- (Réf. 6).

Au niveau de la virulence chez les nouveau-nés de moins de 6 mois :

Avec le Dr H. Bodilis, nous avons envoyé un questionnaire aux médecins de 60 nouveau-nés de moins de six mois ayant une coqueluche confirmée mais infectés pour 20 d'entre eux par un isolat PRN- et pour 40 d'entre eux par un isolat PRN+. Il s'avère qu'il n'y a pas de différence entre les enfants au niveau du sexe et de l'âge. Les symptômes cliniques (toux nocturne, toux paroxystique, chant du coq, fièvre, perte de poids, apnée, cyanose, vomissements, bradychardie, toux paroxystique, hyperlymphocytose, coqueluche maligne) des nouveau-nés ne présentent pas de différence significative entre les deux groupes de nouveau-nés. La seule différence significative est l'intervalle de temps entre le début de la toux et l'hospitalisation suggérant une plus faible virulence des isolats PRN. Il est à noter que la vaccination était associée avec des symptômes moins sévères dans les deux groupes.

Il s'agit de la première comparaison clinique entre ces deux types d'isolats (Réf. 12).

6.3.1.2 Caractéristiques de la population de *B. parapertussis*

Au niveau de la bactérie

L'analyse des isolats de *B. parapertussis* a été réalisée de façon similaire. Le polymorphisme est très restreint jusqu'en 2007 où une augmentation du nombre d'isolats a été observée. Ces derniers isolats peuvent être différenciés des isolats circulant auparavant par ECP.

Au niveau de l'expression des facteurs de virulence

95 % de ces isolats circulant depuis 2007 n'expriment pas la PRN ! Cela est dû, soit à une délétion d'une paire de base dans le gène codant la PRN, soit un A dans la région répétée I de la PRN, soit un G dans la région répétée II du gène soit à une délétion de plusieurs nucléotides. Là encore il ne s'agit donc pas d'un seul clone.

Il est à noter que des isolats semblables ont été collectés en Espagne mais pas à St

Petersburg, ville où le vaccin Ce est toujours utilisé, ce qui suggère fortement une influence de l'immunité vaccinale.

L'ensemble de nos données suggèrent que si l'immunité induite par le vaccin Ce n'a pas d'influence sur l'incidence des infections à *B. parapertussis*, l'immunité induite par les vaccins Ca en a peut-être une. La surveillance de ces infections doit continuer (Réf. 6).

6.3.2 Comment évolue la population de *Bordetella pertussis* au cours du temps dans d'autres pays ayant des stratégies vaccinales différentes ?

Dans le cadre de notre réseau européen EUpertstrain nous avons initié une collaboration avec nos collègues finlandais. Ils ont comparé leurs isolats avec les isolats français depuis 2005, année où le vaccin acellulaire a été introduit en Finlande. Il s'avère que des isolats n'exprimant pas la PRN ont été détectés en 2012 mais pas avant, c'est-à-dire 6 ans après l'introduction du vaccin. En France ces isolats ont commencé à circuler en 2005, 5 ans après la généralisation du vaccin acellulaire (**Réf. 7**). Par ailleurs, nous avons poursuivi nos travaux dans le cadre du réseau EUpertstrain avec nos collègues européens. **Ces travaux montrent qu'au niveau génomique les isolats circulant en Europe sont très semblables mais qu'ils sont différents de ceux circulant il y a 10 ans (réf. 8 et 10).**

Nous avons aussi initié une collaboration avec nos collègues australiens. Il s'avère que des isolats qui n'expriment pas la PRN circulent aussi dans ce pays.

6.3.3 Les isolats de *B. holmesii* collectés en France et dans d'autres pays sont-ils semblables ?

Nous avons commencé une analyse comparative des isolats de *B. holmesii* collectés depuis quelques années au laboratoire. Comme pour les précédentes espèces ces analyses se portent aussi bien au niveau génomique qu'au niveau protéique. Cette étude a été initiée en raison du fait que cette espèce était considérée comme cause unique de bactériémies chez des sujets le plus souvent aspléniques. Or il s'avère que depuis une dizaine d'années de plus en plus de descriptions de cas de patients ayant des symptômes coqueluchoïdes sont diagnostiqués comme porteurs de *B. holmesii* et non de *B. pertussis* ou *B. parapertussis*. Dans ce contexte nous avons fait séquencer le génome de deux isolats l'un à l'origine de bactériémie et l'autre collecté lors de syndrome coqueluchoïde. Il s'avère :

- **Au niveau génomique** : les isolats de cette espèce sont très proches entre eux en utilisant la technique ECP. Ils ne possèdent aucun des gènes codant les toxines et adhésines majeures de *B.*

pertussis. Le séquençage du génome de cette espèce bactérienne n'a toujours pas été fait. Pour cette raison nous avons fait séquençer le génome de deux isolats, un collecté au niveau naso-pharyngé et un lors d'une bactériémie. Notre analyse n'a pas montré de différence entre les deux génomes. Elle a permis de confirmer qu'aucun gène codant un des facteurs de virulence de *B. pertussis* n'était présent à l'exception un gène semblable à une partie du gène *pha B* (V. Bouchez and N. Guiso. *Adv Infect. Dis. In press, 2013*).

- **Au niveau protéique** : aucune des toxines et adhésines produites par *B. pertussis* n'a été détectée
- **Au niveau virulence** : *B. holmesii* n'est cytotoxique ni pour les cellules phagocytaires ni pour les cellules épithéliales et n'induit pas de létalité dans le modèle murin d'infection respiratoire. Ces résultats confirment ce que nous avons trouvé au niveau génomique et protéique.

En conclusion de ce travail et du cas clinique observé à l'hôpital de la Pitié, nous faisons l'hypothèse que *B. holmesii* est une bactérie opportuniste localisée au niveau naso-pharyngé et qui est détectée soit au cours de syndromes coqueluchoïdes puisque la PCR diagnostic ne distingue pas entre *B. pertussis* et *B. holmesii* ou dans le sang de patients immuno-déprimés. **Il serait donc important à chaque isolement de *B. holmesii* lors de bactériémies de faire aussi un prélèvement naso-pharyngé. Lors de syndromes coqueluchoïdes et en absence de *B. pertussis* ou *B. parapertussis* de rechercher une autre cause virale ou bactérienne à l'origine des symptômes cliniques.**

6.3.4 Analyse du nombre de séquences d'Insertion dans le génome des différentes espèces de Bordetelles

Le diagnostic moléculaire des infections dues à *B. pertussis* et à *B. parapertussis* est basé sur la détection de séquences d'insertion (IS) 481 et 1001, respectivement. Cependant, ces IS sont également trouvées dans le génome de différentes espèces de *Bordetella* et ne sont donc pas spécifiques de *B. pertussis* ou de *B. parapertussis*. Par conséquent, nous avons criblé le génome d'isolats récents de différentes espèces de *Bordetella* afin de comparer la prévalence de l'IS481, de l'IS1001 et aussi de l'IS1002 avec les données déjà publiées. Nous avons également cherché à savoir si le nombre de copies d'IS481 et IS1001 pouvait varier parmi les isolats récents de différentes espèces de *Bordetella*. Nous avons utilisé la PCR pour le criblage du génome des isolats circulants et pour le séquençage des IS. Nous avons mis en place la technique de Southern-blot ainsi que la qPCR pour la quantification du nombre d'IS. Nous n'avons pas trouvé de différence significative dans le contenu des séquences des IS examinées, à l'exception d'une délétion de 71 nucléotides de l'IS1002 chez *B. bronchiseptica*. De plus, le nombre de copies dans le génome d'isolats circulants récemment

était similaire à celui des souches de référence. Nos résultats confirment que le diagnostic biologique ciblant les IS481 et IS1001 ne sont pas spécifiques et peuvent détecter les espèces de *B. pertussis*, *B. holmesii* et *B. bronchiseptica* (IS481), et *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* (IS1001) (Réf. 11).

6.3.5 Analyse de l'expression de la protéine BteA par les différentes espèces de Bordetelles

L'espèce *B. bronchiseptica* n'exprime pas la toxine de pertussis mais exprime une protéine appelée BteA qui est responsable de la cytotoxicité de cette espèce vis-à-vis des cellules de l'hôte, phagocytaires et épithéliales. Nous avons initié des recherches pour cloner le gène de structure de cette toxine, le faire exprimer dans *E. coli* K-12, purifier une protéine recombinante et obtenir des anticorps spécifiques chez la souris afin d'analyser son expression et la régulation de son expression par les trois espèces classiques de Bordetelles isolées chez l'homme.

Il s'avère que BteA est produit et sécrété par les isolats de *B. bronchiseptica*. Il induit une réponse immune *in vivo* suite à une infection par *B. bronchiseptica* dans le modèle murin d'infection respiratoire et est responsable de la cytotoxicité des bactéries vis-à-vis des cellules de l'hôte.

Bte A n'est pas produit par *B. parapertussis* qui n'induit pas de cytotoxicité des cellules de l'hôte. *B. pertussis* produit mais ne sécrète pas BteA, n'est pas cytotoxique pour les cellules de l'hôte et n'induit pas de réponse. Ce dernier résultat indique que BteA n'est pas actif chez *B. pertussis* (Réf. 13).

L'ensemble des résultats obtenus sur la pathogénicité des espèces de Bordetelles pathogènes pour l'homme indiquent que ces trois espèces très proches l'une de l'autre n'ont pas le même comportement chez leur hôte

6.3.6 Quelle est l'épidémiologie de la coqueluche à Tunis ?

Depuis quatre ans nous supervisons la thèse d'une étudiante tunisienne. Nous l'avons formée aux différentes techniques de diagnostics culturaux et moléculaires. Après plusieurs contrôles qualité, elle a pu entreprendre une étude épidémiologique sur quatre ans, ce qui ne pouvait être fait auparavant puisqu'il n'y avait aucun diagnostic biologique de la coqueluche en Tunisie. Entre 2007 et 2011, 626 prélèvements naso-pharyngés ont été analysés. Un seul isolat a pu être collecté mais la PCR-TR basée sur la détection de l'IS481 était positive pour 21 % des prélèvements. En utilisant les autres PCR-TR que nous avons développées nous avons pu montrer que l'espèce présente dans les prélèvements était *B. pertussis* dans 82 % des cas. De plus il a pu être mis en évidence des co-

infections *B. pertussis*-*B. parapertussis* dans 8 % des cas. Aucune détection de matériel génétique de *B. holmesii* n'a été observée, ce qui n'est pas très surprenant car l'étude comportant essentiellement des prélèvements de nourrissons de moins de 6 mois contaminés, le plus souvent, par leur mère. **Cette étude montre que la coqueluche représente toujours un problème de santé publique en Tunisie et que des diagnostics biologiques sensibles et spécifiques sont nécessaires (Réf. 3).**

Asma Zouari a soutenu sa thèse en février 2012.

7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

7.1 PUBLICATIONS NATIONALES

2012

1. **GUIISO N.** Coqueluche : limites du diagnostic par PCR. **Flash Info Maladies Infectieuses (InVS)** (2012) 10:2
2. **GUIISO N.** La coqueluche (2013) **EMC- Maladies Infectieuses Vol. 10: (1) 8-017-B-10**

7.2 PUBLICATIONS INTERNATIONALES

2012

3. ZOUARI A, SMAOUI H, **BRUN D, NJAMKEPO E**, SGHAIER S, ZOUARI E, FELIX R, MENIF K, BEN JABALLAH N, **GUIISO N**, KECHRID A. Prevalence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in Tunisian hospitalized infants: result of a 4-year prospective study (2012) **Diag Microbiol Infect Dis** 72:303-317
4. **NJAMKEPO E**, BONACORSI S, DEBRUYNE M, GIBAUD SA, **GUILLOT S, GUIISO N**. Reply to "*Bordetella holmesii* in nasopharyngeal samples from chilean patients with suspected *Bordetella pertussis* infection". (2012) **J. Clin Microbiol.** 50(4):1506
5. **GUILLOT S**, DESCOURS G, GILLET Y, ETIENNE J, FLORET D, **GUIISO N**. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in Newborn girl, France. (2012) **Emerg Infect Dis.** 18(6) 966-968
6. HEGERLE N., PARIS A-S, **BRUN D, DORE G, NJAMKEPO E, GUILLOT S, GUIISO N**. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. (2012) **Clin. Microbiol. Infect** 18(9):E340-E346

7. BARKOFF AM, MERTSOLA J., **GUILLOT S**, **GUIISO N.**, BERBERS G, HE Q. Appearance of *Bordetella pertussis* strains not expressing vaccine antigen pertactin in Finland (2012) **Clin Vaccine Immunol** 19(10):1703-1704
8. HE Q, BARKOFF AM, MERTSOLA J, GLISMANN S, BACCI S, on behalf of the **European *Bordetella* expert group** (EUpertstrain), the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EUVAC.NET). High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance (2012) **Eurosurveillance** 17(32):20239
9. **GUIISO N.** Specific biological diagnoses are needed to determine the durability of Pertussis vaccine induced immunity (2012) **Clin Infect Dis** 55:1433-1434

2013

10. ADVANI R, HALLANDER H, DALBY T, KROGFELT K, **GUIISO N**, NJAMKEPO E, WIRSING VON KÖENIG C H, RIFFELMANN M, MOOI F, SANDVEN P, LUTYŃSKA A, FRY N, MERTSOLA J, HE Q. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis* isolates circulating in Europe in 1998 to 2009 (2013) **J. Clin. Microbiol.** 51(2):422-428
11. TIZOLOVA A, **GUIISO N**, **GUILLOT S**. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for biological diagnosis of pertussis syndrome (2013) **Eur J Clin Microbiol infect Dis** 32(1)89-96
12. BODILIS H, **GUIISO N**. Clinical symptoms in infants less than 6 months old infected by *Bordetella pertussis* isolates expressing or not expressing pertactin. **Emerg Infect Dis** 19(3) 471-474
13. HEGERLE N, RAYAT L, **DORE G**, ZIDANE N, BEDOUELLE H, **GUIISO N**. *In-vitro* and *in-vivo* analysis of the expression of the *Bordetella* type three secretion system effector A in *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* (2013) **Microb Infect** in press

7.3 COMMUNICATIONS NATIONALES (toutes sur invitation)

2012

1. Guiso N. : "La coqueluche en 2012 : impact sur les adultes". 10^{èmes} journées du Collège National des Sages-Femmes, Issy Les Moulineaux, 7 février 2012.
2. Guiso N. : "Les rappels de la vaccination : exemple des vaccinations diphtériques et coquelucheuses". Atelier Presse les entreprises du médicament (Leem) Paris 7 mars 2012.

7.4 COMMUNICATIONS INTERNATIONALES (toutes sur invitation)

2012

1. Guiso N. Organisation du congrès ECDC, EUpert-Labnetwork kick off meeting, présentation "EU 2008 Case definition", ECDC EUpert-Labnetwork kick off meeting Paris, France 24-25 janvier 2012
2. Guiso N : "Coqueluche une préoccupation mondiale" Agence de Médecine Préventive (AMP), Barcelone, Espagne 17 avril 2012
3. Hegerle N, Guillot S et Guiso N. "Evolution of *Bordetella pertussis* population what can be learnt after a decade of acellular pertussis vaccination in France" EupertGenomics/Eurpertstrain congress, Oslo, Norvège, 31 mai au 01 juin 2012
4. Guiso N. 3 présentations "hospital-based surveillance in France: The Renacoq net 1996-2012", "Tools for the surveillance of pertussis" "Why is pertussis still a problem?" GPI Mediterranean Regional Roundtable meeting, Rome, Italie, 9-10 juin 2012
5. Guiso N.: "Why is pertussis still circulating? ", Hot topic in Infection and Immunity of children, Keble college, Oxford, Royaume-Uni 25-27 juin 2012
6. Guiso N : 3 présentations "Importance du diagnostic biologique de coqueluche pour réaliser une surveillance efficace", "Actualité sur la vaccination coquelucheuse", "Evolution de la stratégie vaccinale suivant les données de surveillance : l'exemple de la France" 4^{ème} journée de Vaccinologie de l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc, 11-14 octobre 2012
7. Guiso N : "Coqueluche une préoccupation mondiale" Expert consultation meeting on pertussis, Barcelone, Espagne 20 novembre 2012

7.5 ENSEIGNEMENT

Nicole Guiso

Dans le cadre du cours AgroParisTech 2012 : présentation "Vaccination coquelucheuse et épidémiologie de la maladie"

Paris - le 24 février 2012 (1h30)

Dans le cadre de l'Ecole Pasteurienne d'Infectiologie : "Circulation des Agents Infectieux et maîtrise du Risque" présentation : "Vaccination et épidémiologie des maladies infectieuses"

Institut Pasteur - le 8 février 2012 (3 heures)

Dans le cadre du cours Pasteur-CNAM School of Public Health, Cours de Vaccinologie: "Impact of

vaccination on epidemiology of infectious disease: the example of Pertussis and Diphtheria"

Institut Pasteur - le 27 mars 2012 (1h30)

Dans le cadre du cours International Francophone de Vaccinologie : présentation "La vaccination coquelucheuse : conséquences de cinquante années vaccination "

Ecole du Val de Grâce - le 28 mars 2012 (1h15)

Dans le cadre du cours de Microbiologie générale 2012 : présentation " Le genre Bordetella : composition et évolution depuis l'introduction de la vaccination coquelucheuse"

Institut Pasteur - le 11 septembre 2012 (1h30)

Sophie Guillot

Cours dans le cadre du Master (M2) de Microbiologie de Paris-sud –

Présentation "*B. pertussis* et les vaccins coquelucheux"

Chatenay Malabry - le 16 octobre 2012 (3 heures)

7.6 EXPERTISE

Nicole Guiso a participé aux groupes de travail sur la stratégie vaccinale coquelucheuse.

ANNEXE 1

Suite de l'étude collaborative entre des laboratoires de microbiologie hospitaliers (RENACOO) et privés et le CNR de la coqueluche et autres bordetelloses, afin d'évaluer la PCR en temps réel pour la détection du matériel génétique de *Bordetella*



Sophie Guillot et Nicole Guiso
Centre National de Référence de la Coqueluche et autres Bordetelloses

Introduction: Une des missions primordiales du CNR est la surveillance des bordetelloses. Cette surveillance se fait à l'aide des bactériologistes hospitaliers du réseau RENACOO et de quelques laboratoires d'analyses médicales qui utilisent la PCR en temps réel comme outil de diagnostic moléculaire direct de la coqueluche. En 2010, le CNR avait organisé un contrôle qualité car c'est un des moyens de s'assurer de la qualité des données. Le CNR a renouvelé cette expérience en 2012 afin d'évaluer l'impact du précédent contrôle qualité auprès des laboratoires participants.

Objet de l'étude: D'une part, évaluer la sensibilité de la technique de PCR utilisée par les 35 laboratoires intéressés de participer en 2012 à ce suivi d'étude pour la détection du matériel génétique de *Bordetella* et d'autre part, comparer ces données avec celles de 2010. Pour cela de nouveaux contrôles qualités ont été préparés par le CNR. Un questionnaire a aussi été élaboré afin de pouvoir faire un point sur un éventuel changement de méthode d'extraction ou/et d'amplification, de cible, de réactif ou/et d'équipement.

Méthode : Six tubes contenant de l'ADN ou non de *Bordetella* ont été préparés et validés par le CNR puis distribués aux 35 laboratoires participants avec le questionnaire à renseigner.

TABLEAU 1 : PCR en temps réel -> comparaison des méthodes et équipements/réactifs les plus utilisés par les participants du CQ entre 2010 et 2012

Total participants (N)	Méthode d'extraction	Nb de cible	Thermocycleur	Nb cycles	Type de sonde	Kit Amplification	Vol. réactionnel	Utilisation d'UNG	Témoin extraction	Témoin positif	Référence des amorces et sondes utilisées
Réponses	29	33	31	30	30	30	30	30	29	30	
2010 N=32	QIAamp DNA mini Kit (Qiagen)_20% NucliSens® EasyMag (Biomérieux)_14%	2_48% 1_42%	LC 1/2/480 (Roche)_32% Smart Cycler (Cepheid)_26%	40 cycles_57% 45 cycles_40%	Hydrolyse_73% Hybridation_17%	• LC DNA master (Roche)_23% • Univ. PCR Master mix (ABI)_17% • Bordetella R-gène (Argene)_13%	25µl_60% 20µl_27%	Non_73% Oui_26%	Oui_76% Non_24%	Oui_100%	Riffelmann et al, 2005_60%
Réponses	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	
2012 N=34	NucliSens® easyMag (Biomérieux)_23% QIAamp DNA mini kit (Qiagen) : 7/34=20%	2_76% 1_21%	LC 1/2/480 (Roche)_41% Smart Cycler (Cepheid)_32%	45 cycles_76% 40 cycles_40%	Hydrolyse_79% Hybridation_13%	• Bordetella R-gène avec ou sans B.parapertussis r-gène (Argene)_20% • Smart Bordetella BP/BPP (Cepheid)_18% • Simplexix kit FOCUS (Eurobio)_15% • LC DNA master (Roche)_15%	25µl_74% 20µl_20%	Non_78% Oui_22%	Oui_84% Non_16%	Oui_97%	Riffelmann et al, 2005_85%

En 2012, les trousses commerciales sont plus utilisées que les kits d'amplification génériques

En 2012, la majorité des laboratoires font 45 cycles au lieu de 40 cycles

En 2012, les trousses commerciales sont plus utilisées que les kits d'amplification génériques (type Roche ou ABI). Comme en 2010, la trousses la plus utilisée est celle d'ARGENE.

En 2011, la plus part des laboratoires utilisent les amorces et sondes recommandées par le groupe consensus PERTUSSIS PCR*

TABLEAU 2 : Evolution du nombre de cibles utilisé par les laboratoires participants

Nom de la cible	2010	2012
IS482	14/32 labos	7/34 labos
IS481 et IS500	15/32 labos	25/34 labos

L'utilisation de la cible IS2001 a augmenté en 2012

TABLEAU 3 : Comparaison du Ct moyen obtenu par les participants au CQ 2010 et 2012

2010	Le génome de Bho → 30 copies IS481		Génome de Bbs (IS481) → 1 copie IS481		Le génome de Bp → 200 copies IS481	
	CO1 (IS481)	CO2 (IS500)	CO3 (IS481)	CO4 (IS481)	CO6 (IS481)	
Concentration d'ADN (espèce*)	10 pg/µl (Bho)	100 fg/µl (Bpp)	100 pg/µl (Bbs)	10 fg/µl (Bp)	1 pg/µl (Bp)	
Ct CNR	23	29	26	31	23	
Nombre de réponses (n)	N=33	N=33	N=30	N=30	N=34	
Ct moyen	22	31	26	31	24	
Entre 53 et 70%	% de labo avec un Ct moyen +/- 2	88%	83%	64%	76%	79%
Entre 17 et 18	D Ct	8	13	13	9	7

* Bp: *Bordetella pertussis*; Bpp: *Bordetella parapertussis*; Bho: *Bordetella holmesii*; Bbs: *Bordetella bronchiseptica*

En 2012 - On observe a) Une augmentation du nombre de laboratoires qui ont obtenu la valeur du Ct moyen +/- 2 pour les tubes CO1, 2, 4 et 6 b) Une nette diminution des écarts de Ct obtenus par l'ensemble des participants.

TABLEAU 4 : Evaluation de l'impact du CQ 2010 sur le rendu de résultats en 2012

	2010	2012
A	8	9
B	22	11
C	2	6

Code A = résultat et conclusion corrects, Code B = résultat correct mais conclusion incorrecte Code C = au moins un résultat incorrect

En 2012, 9 laboratoires ont parfaitement réussi leur CQ en indiquant les conclusions correctes pour la cible IS481 ou IS500.

En 2012, 8 laboratoires ont indiqué une conclusion correcte pour la cible IS481 mais incomplète pour la cible IS500. En effet, des travaux récents ont confirmé qu'elle pouvait aussi être détectée dans le génome de quelques *B. bronchiseptica*. La conclusion doit indiquer cette possibilité.

En 2012, par comparaison avec 2010, le nombre de laboratoire ayant un ou plusieurs résultats incorrects est passé de 2 à 6. Les causes des résultats incorrects sont une inversion de tubes ou une non détection....

En 2012 on observe une diminution du nombre de laboratoires classés B. Ces laboratoires ont donné les résultats corrects mais ils continuent de conclure à la détection de l'ADN de *B. pertussis* avec la cible IS481. Or cette conclusion n'est pas correcte car IS481 n'est pas spécifique de *B. pertussis* car elle peut être détectée dans le génome d'autres espèces comme *B. holmesii* et *B. bronchiseptica*.

Résultats/Conclusion : Comme en 2010, la plupart des 35 laboratoires participants ont obtenu un résultat très satisfaisant ou satisfaisant. L'étude faite en 2010 avait mis en avant la nécessité d'une homogénéisation dans le rendu des résultats. En effet, la plupart des laboratoires, qui utilisent l'IS481 comme cible, concluait à la détection d'ADN de *B. pertussis* lorsque la PCR était positive. Or il a été montré que l'IS481 peut aussi être détectée dans le génome d'autres espèces comme *B. holmesii*. Le suivi de cette étude collaborative nous a permis d'évaluer l'impact positif de la sensibilisation des laboratoires participants sur l'importance du rendu de conclusion aux cliniciens.

Un grand merci à : F. Doucet-Populaire, N. Bourgeois, M. Debryne, A. Ferroni, C. Buruoga, G. Hery-Arnaud, Ph. Lanotte, S.A. Gibaud, M. Vergnaud, Ph. Lehours, J.L. Koeck, R. Bonnet, J. Delmas, M.F. Prere, A. Lecoustumier, N. Wilhelm, H. Chardon, J. Etienne, F. Grattard, D. Raffenot, M. Levast, J.M. Scheffel, D. De Briel, M. Buser, J.M. Duez, C. Alauzet, G. Couetdic, D. Marx, L. Brasme, M. Nouvellon, L. Lemeé, R. Courcol, M. Roussel, F. Eb, S. Bonacorsi, Ch. Bigaillon, F. Garnier, A. Guigon, Ph. Leroy, L. Souply, C. Ménard, M. Blendo, H. Marchand, A. Le Monnier, M. Ricard, G. Barnaud, T. Gaillard, C. Pouzeau-Jayle

* : RIFFELMAN ET AL JCM 2005, VOL 43, N°10, Page 4923-4929