

38<sup>ème</sup> Colloque National des Biologistes des Hôpitaux  
28 septembre au 2 octobre 2009 - Montpellier

# DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA COQUELUCHE

Gérard-Antoine DENOYEL  
Unité d'Infectiologie  
Laboratoire Biomnis - Lyon

# LA COQUELUCHE

- ❑ Infection respiratoire hautement contagieuse
- ❑ 50 millions de cas par an estimés dans le monde, avec 300 000 morts
- ❑ En France, première cause de mortalité bactérienne chez le nourrisson (moins de 2 mois)
- ❑ Contrôle relatif par la vaccination dans les pays industrialisés
- ❑ Glissement de l'incidence de la maladie vers les adolescents et les adultes
  
- ✓ Bactérie responsable : *Bordetella pertussis*

# Le genre *Bordetella*

- ❑ *Bordetella pertussis* (coqueluche – strictement humaine)
- ❑ *Bordetella parapertussis* hu /ov (infection respiratoire - homme, ovins)
- ❑ *Bordetella bronchiseptica* (infection respiratoire - mammifères-homme)
- ❑ *Bordetella avium* (infection respiratoire-oiseaux)
- ❑ *Bordetella hinzii* (infection respiratoire-oiseaux)
- ❑ *Bordetella holmesii* (septicémie-infection respiratoire-homme)
- ❑ *Bordetella trematum* (infections de l'oreille et des blessures-homme)
- ❑ *Bordetella petrii* (environnement)

# Prélèvement

## ❑ Ecouvillonnage endonasal type Bradford



Ecouvillon à manche fin et souple

## ❑ Aspiration endonasale ( milieu hospitalier )

- ✓ Culture : écouvillon alginate préférable- dacron acceptable  
Milieu de transport semi-solide au charbon de Regan-Lowe  
Transport à température ambiante – 24 à 36 heures
- ✓ PCR : écouvillon dacron  
Eviter la dessiccation en versant quelques gouttes d'eau distillée au fond du tube.  
Transport à 2-8°C - jusqu'à 4 jours

# Culture de *Bordetella Pertussis*

- ❑ **Coccobacille gram-négatif, capsulé au sortir de l'organisme**  
**Aérobie strict, oxydase +, catalase +, non-glucidolytique**
  
- ❑ **Bactérie fragile et exigeante, sa culture n'est possible que sur milieux spéciaux contenant du sang**
  - ✓ Bordet-Gengou (gélose à l'amidon de pomme de terre – sang de mouton )
  - ✓ Milieu de Regan-Lowe (gélose au charbon - sang de cheval)
  
- ❑ **Ces milieux peuvent être rendus sélectifs à l'isolement en ajoutant de la cephalexine**

# Culture de *Bordetella Pertussis*

## Les colonies apparaissent après plusieurs jours :

- ✓ petites, luisantes et bombées, "en gouttelettes de mercure"
- ✓ aspect se modifiant au cours des subcultures
- ✓ devient de plus en plus rugueux, passant de la "phase I" à la "phase IV", ce qui correspond à la perte de la capsule.



Photo Institut Pasteur de Lyon



# Diagnostic rapide par immunofluorescence

- ❑ Frottis sur lame - Fixation à l'acétone
- ❑ Contact avec antisérum fluorescent anti-*B.pertussis* (Difco)
- ❑ Lecture au microscope à fluorescence ( x 100 immersion )

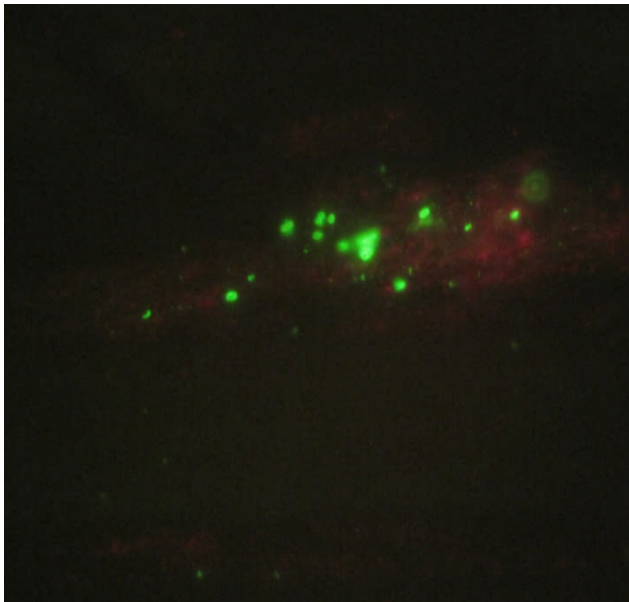


Photo Biomnis – Août 2009

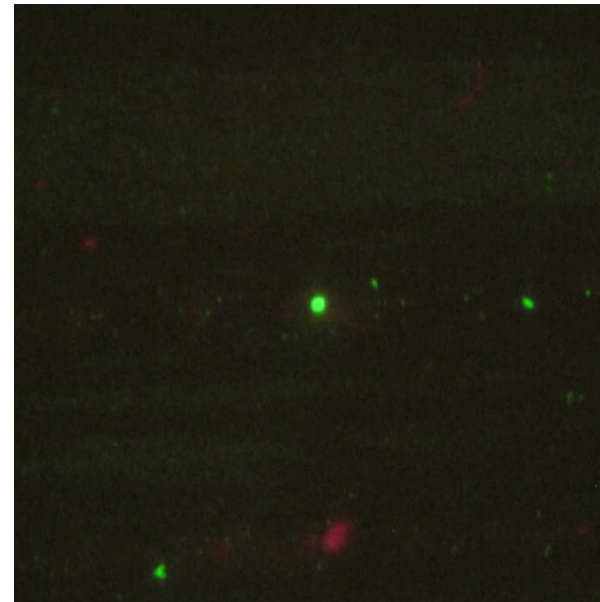


Photo Biomnis – Septembre 2009

# Diagnostic rapide par immunofluorescence

## ❑ Limitations du test

- ✓ sensibilité médiocre
- ✓ à réaliser dans les 3 jours suivant le début des quintes
- ✓ difficile à lire
- ✓ réactivité non spécifique

## ➤ Ce test n'est plus conseillé actuellement





## ❑ Techniques d'amplification génique

- ✓ **Houard et coll.** - 1989 - Res.Microbiol. 140 : 477-487  
Amplification de l'opéron TOX- Amplification d'une séquence d'insertion répétitive  
Produits amplifiés : 191 bp (TOX)- 121bp (IS481)  
Sonde marquée au P32  
Sensibilité : 6 bactéries
- ✓ **Glare el coll.** - 1990 - J.Clin.Microbiol. 28 : 1982-1987  
Amplification de la séquence d'insertion répétitive IS 481  
Gel d'agarose  
Produit amplifié : 153 bp  
Sensibilité : 3 bactéries

# BORDETELLA PERTUSSIS – Séquence d'insertion IS481 (\*)

Accession M28220

1 gcgaggccgg ctatctgtga agattcaata ggttgtatgc atggttcac cgaaccggat  
61 ttgagaaact ggaaatcgcc gacccccag ttcactcaag gagcccggcc ggatgaacac  
121 ccataagcat gcccgattga ccttctacg tcgactcgaa atggtccagc aattgatcgc  
181 ccatcaagtt tgtgtgctg aagcggcccg cgcctatggg gtcaccgcgc cgactgtgcg  
241 caaatggctg ggccgcttc tggctcaggg ccaggcgggc ttggccgatg cgtcctcgcg  
301 cccgacggtc tcgccccgag cgattgcgcc ggccaaggcg ctggctatcg tggagctgcg  
361 ccgcaagcgg ctgaccaag cgcgcatcgc ccaggcgcctg ggcgtgtcag ccagcaccgt  
421 cagccgcgtc ctggcccgcg ccggtctgtc gcacctggcc gacctggagc cggccgagcc  
481 ggtggggcgc tacgagcatc aggcccccgg cgatctgctg cacatcgaca tcaagaagct  
601 ggccggctgg gacttcgtct tcgtggccat cgatgaccac gcccgcgtgg ccttcaccga  
661 catcccccc gacgagcgct tccccagcgc cgtccagttc ctcaaggacg cagtggccta  
721 ctaccagcgc ctgggctgta ccatccagcg cttgctcacc gacaatggct cggccttctg  
781 cagccgcgcc ttcgccgcgc tgtgccatga gctgggcatc aagcaccgct ttaccgacc

 153bp Système E.M. GLARE – J.Clin.Microbiol.1990-28:1982-1987

 121bp Système S. HOUARD – Res.Microbiol. 1989-140:477-487

gggtcgc 288bp Système A.van der Zee – J.Clin.Microbiol.1993-31:2134-2140

(\*) Réf. M.McLafferty et coll. J. of General Microbiology – 1988-134:2297-2306

W.McPheat et coll. FEMS Microbiol.Lett.-1987-41:357-360

I.Park et coll. FEMS Microbiol.Lett.1988-52:19-24



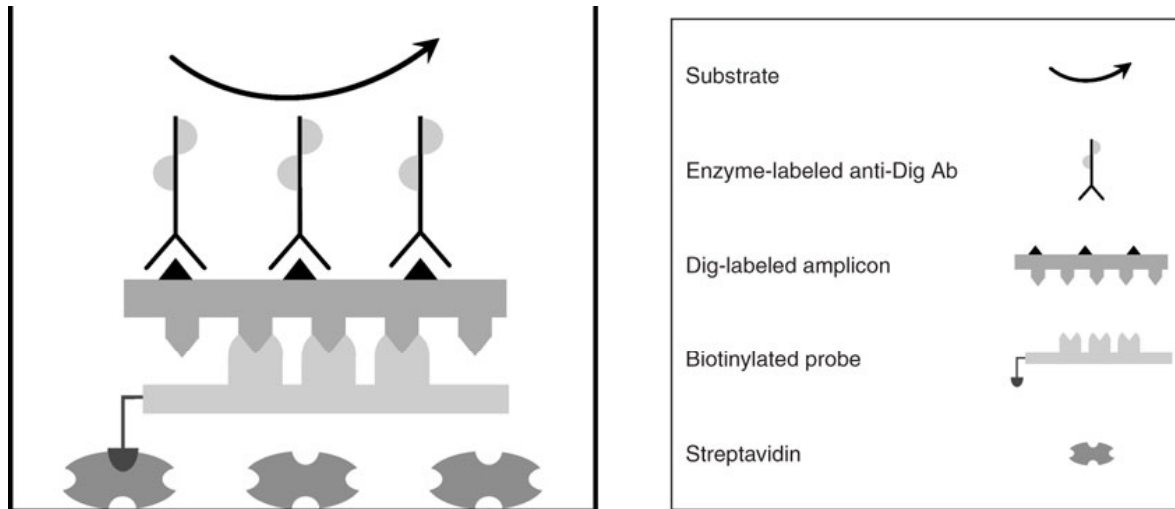
3 / Amélioration : transfert du gel sur membrane de nitrocellulose et hybridation avec une sonde marquée à la digoxigénine par terminal-transférase.

- **Conclusion : La détection est plus sensible avec le système IS 481**



## Deuxième étape

- Utilisation des systèmes amorces-sondes précédents mais en format ELISA selon le protocole DIG Nucleic Acid Detection Boehringer (Roche)

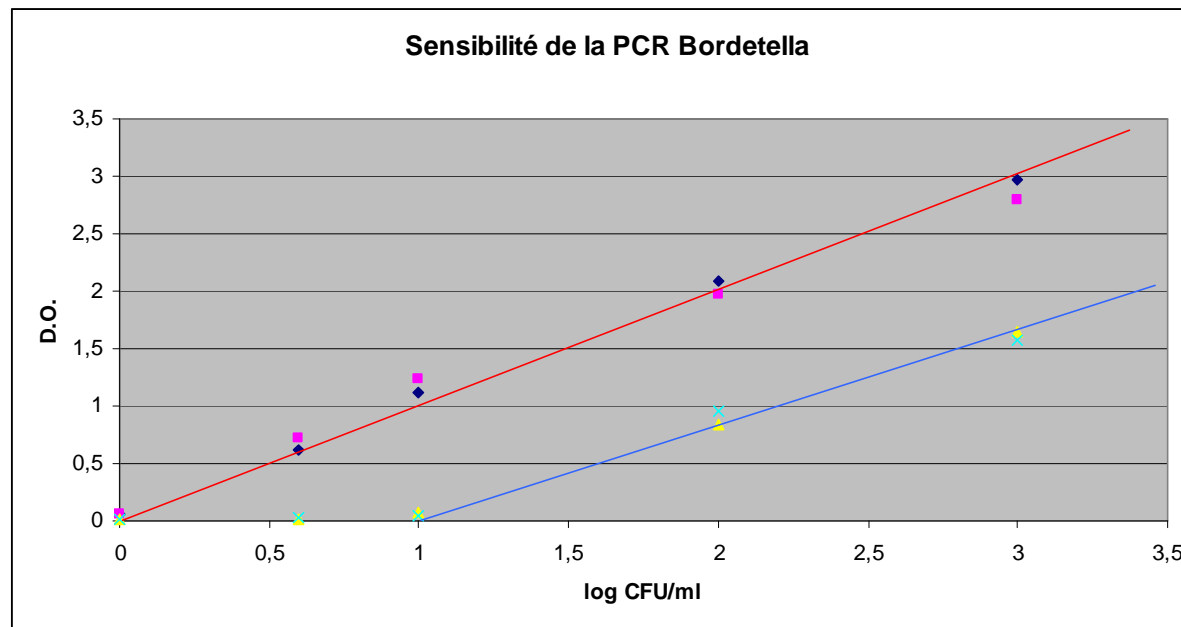


- ✓ Capture de la sonde biotinylée par de la streptavidine fixée au fond des puits d'une plaque de microtitration.
- ✓ Marquage des amplicons au cours de la PCR par incorporation de DIG-dUTP
- ✓ Hybridation amplicons marqués-sonde
- ✓ Ajout d'un anticorps anti-DIG marqué à la peroxydase
- ✓ Révélation par substrat (ABTS) et réaction colorée mesurable



# Résultats

log CFU/ml	IS481		TOX	
	DO 1	DO 2	DO1	DO2
5	OVER	OVER	OVER	OVER
4	OVER	OVER	2,753	2,918
3	2,97	2,799	1,652	1,567
2	2,09	1,965	0,831	0,962
1	1,115	1,236	0,08	0,05
0,6	0,623	0,716	0,02	0,03
0	0,056	0,062	0,02	0,02



➤ **Conclusion : Confirmation de la meilleure sensibilité du système IS 481**

Sensibilité système TOX : 100 CFU/ml

Sensibilité système IS 481 : 5 CFU/ml



## Comparaison de résultats entre la révélation par hybridation sur membrane et la technique ELISA

- ❑ **188 prélèvements nasopharyngés provenant de 188 patients âgés de 3 mois à 52 ans**

- ✓ Résultats concordants

IS positif / TOX positif	43
IS positif / TOX négatif	14
IS négatif / TOX positif	0
IS négatif / TOX négatif	118

Total des résultats concordants : 175 soit 93%

- ✓ Résultats discordants ( total = 13)

Ils portent uniquement sur l'amplification de la séquence IS 481 qui est révélée positive en ELISA et négative après hybridation sur membrane.

Les valeurs de la D.O ELISA est comprise entre 0.6 et 0.3, ce qui correspondrait à une concentration de moins de 5 CFU/ml.



## Résumé des performances de la PCR « classique » en point final

<u>Technique</u>	<u>Délai de réponse</u>	<u>Sensibilité</u>
PCR + gel	24 heures	moyenne
PCR + gel + transfert + Hybridation	72 heures	excellente
PCR ELISA	24 heures	excellente



## Troisième étape - Utilisation de la PCR en temps réel

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (16), 7276–7280.

### ❑ U. Reischl et coll.- 2001- J.Clin.Microbiol. 39 : 1963-1966

Test : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET)

Appareillage : LightCycler® Roche

Cible : *Bordetella pertussis* séquence d'insertion IS 481

➤ Conclusion : technique sensible mais hybridation croisée avec *Bordetella holmesii*

### ❑ K.Kösters et coll. – 2001-J.Med.Microbiol. 50 : 436-440

Test : Sonde d'hydrolyse TaqMan

Appareillage : ABI 7700 SDS (PE Applied Biosystems)

Cibles : *Bordetella pertussis* séquence d'insertion IS 481

*Bordetella parapertussis* séquence d'insertion IS1001

➤ Conclusion : technique sensible ( 0.1-10 CFU ). Possibilité de test duplex .



# BORDETELLA PERTUSSIS – Séquence d'insertion IS481

Accession M28220

1 ctaggtgtga agattcaata gggtgtatgc atggttcac cgaaccggat tgagaaact  
61 ggaaatcgcc aacccccag ttactcaag gagcccggcc **ggatgaacac ccataagcat**  
121 **gcccgattga ccttcctacg tcgactc**gaa atggtccagc aattgatcgc ccatcaagtt  
181 tgtgtgcctg aagcggcccg cgcctatggg gtcaccgcbc cgactgtgcg caaatggctg  
241 ggccgcttcc tggctcaggg ccaggcgggc ttggccgatg cgtcctcgcg cccgacggtc  
301 tcgccccgag cgattgcgcc ggccaaggcg ctggctatcg tggagctgcg ccgcaagcgg  
361 ctgacccaag cgcgcatcgc ccaggcgctg ggctgtcag ccagcaccgt cagccgcgtc  
421 ctggcccgcg ccggtctgtc gcacctggcc gacctggagc cggccgagcc ggtggtgcbc  
481 tacgagcatc aggcccccg cgatctgctg cacatcgaca tcaagaagct gggacgtatc  
541 cagcgcctg gccaccgggt cacgggcaac cgacgcgata ccgttgaggg ggccggctgg  
601 gacttcgtct tcgtggccat cgatgaccac gcccgctgg ccttcaccga catccacccc  
661 gacgagcgt tccccagcgc cgtccagttc ctcaaggacg cagtggccta ctaccagcgc  
721 ctgggcgtga ccatccagcg cttgctcacc gacaatggct cggccttcg cagccgcgcc  
781 ttcgccgcgc tgtgcatga gctgggcatc **aagcaccgct ttacc**gacc ttaccgcca  
841 cagacc**aatg gcaaggccga acgcttca**tc cagtcggcct tgcgtgagtg ggcttacgct  
901 **cacacctacc agaactccca a**caccgagcc gatgcatga aatcctggct acaccactac  
961 aactggcatc gacccacca aggcacggg cgcgctgtac ccatctccag actcaacctg  
1021 gacgaataca acctattgaa tcttcacagc tag

*Système Kösters – J.Med.Microbiol. 2001-50 :436-440*

*Système Chan – Arch.Pathol.Lab.Med.2002-126 : 173-176*

# BORDETELLA PERTUSSIS – Séquence d'insertion IS481

Accession M28220

```
1   ctagggtgtga agattcaata ggttgatgc atggttcac cgaaccggat tgagaaact
1   ctagggtgtga agattcaata ggttgatgc atggttcac tc cgaaccggat tgagaaact
61   ggaaatcgcc aacccccag ttcaactcaag gagcccggcc ggatgaacac ccataagcat
61   ggaaatcgcc aacccccag ttcaactcaag gagcccggcc ggatgaacac ccataagcat
121  gcccgattga ccttctacg tcgactcgaa atggtccagc aattgatcgc ccatcaagtt
181  tgtgtgcctg aagcggcccg cgcctatggg gtcaccgcg cgactgtgcg caaatggctg
```

— *Système LMM - Sonde 5'FAM-3'TAMRA*

— *Système LMM- Sonde 5'FAM-MGB*

**MGB** (Minor Groove Binder) : molécule augmentant l'affinité de la sonde à l'ADN + un NFQ (non fluorescent quencher) développé par ABI.



# Résultats comparatifs

## ❑ Culture de *Bordetella pertussis* souche Tomaha I

Préparation d'une suspension bactérienne dans 1 ml d'eau distillée

Dilutions de la suspension de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-9</sup>

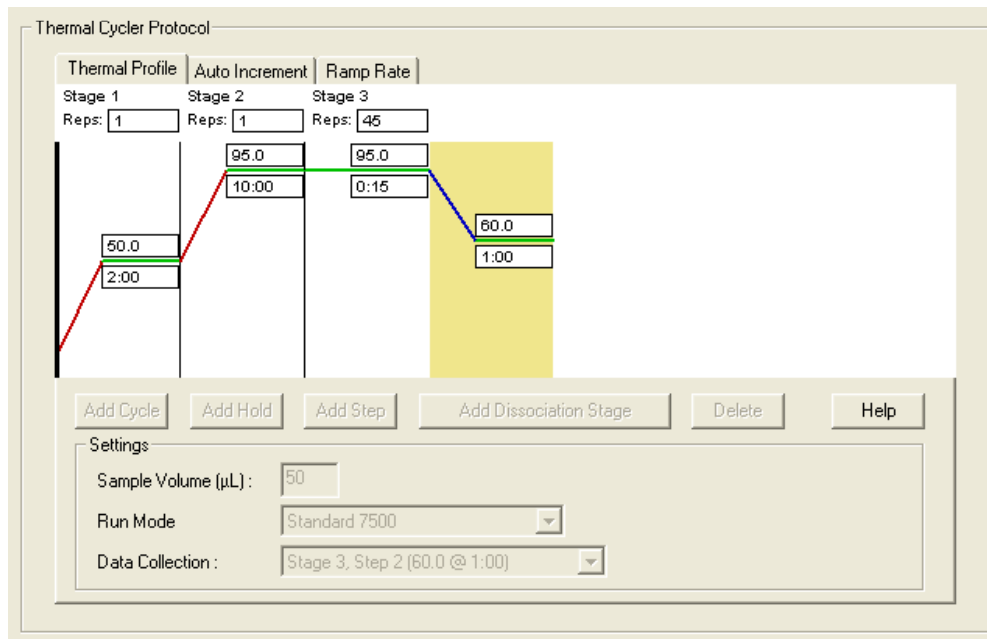
Extraction : MagNaPure® Roche- volume extrait 200µL

Volume d'ADN amplifié : 10 µL

Volume total du mix : 50 µL

(contient de l'AmpErase®)

Programme d'amplification (ABI 7000-ABI 7500) :

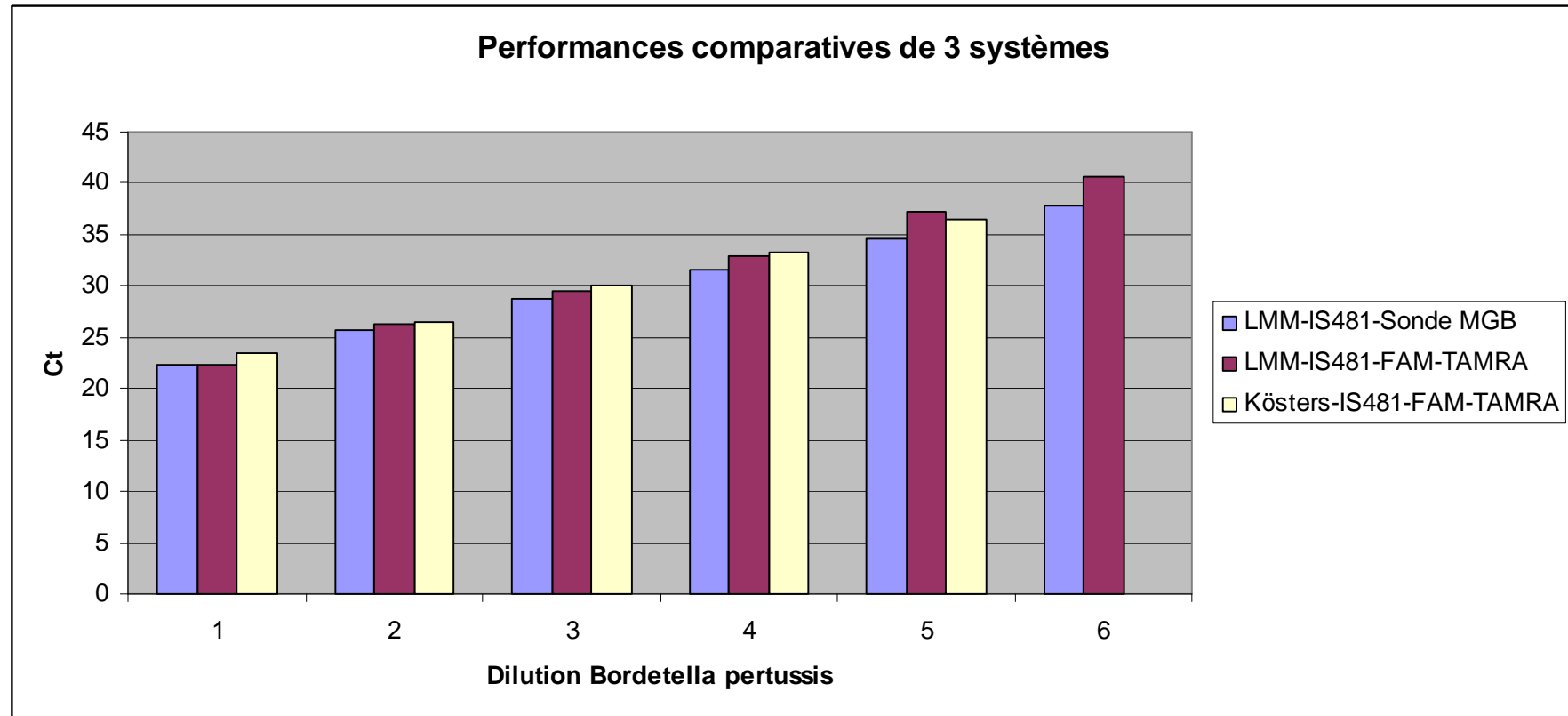




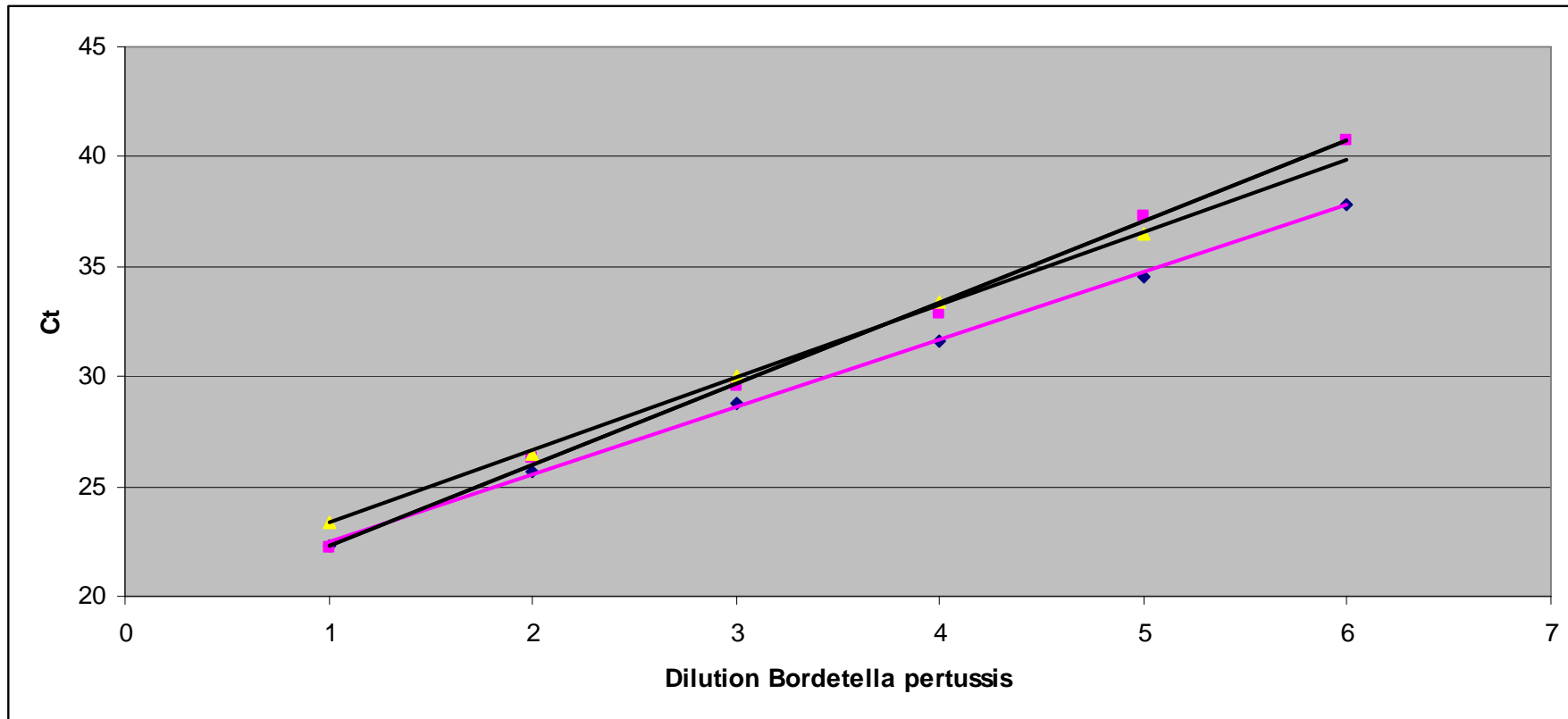
# Résultats comparatifs

Technique LMM -IS481 - Sonde MGB						
Dilution	08/02/2007	09/02/2007	12/02/2007	14/02/2007	19/02/2007	Moyenne
-4	22.21	22.46	22,18	22,48	22,25	22,3
-5	25,65	25,78	25,52	25,81	25,69	25,69
-6	28,79	28,49	28,86	29,04	28,89	28,81
-7	31,45	31,09	32,05	32,13	31,57	31,65
-8	34,4	33,79	34,25	35,53	34,61	34,55
-9	ND	38,39	37,24	ND	ND	37,81
Technique LMM- IS481 - Sonde FAM-TAMRA						
Dilution	08/02/2007	09/02/2007	12/02/2007	14/02/2007	19/02/2007	Moyenne
-4	22.56	22.94	22,33	22,38	22,04	22,25
-5	26,55	27,23	25,48	26,1	26,21	26,31
-6	30,35	30,08	29,37	29,37	28,77	29,58
-7	33,53	33,22	32,54	32,12	32,98	32,88
-8	37,18	38,11	38,06	35,69	37,63	37,33
-9	40,27	ND	ND	ND	41,2	40,73
IS481 - Sonde FAM-TAMRA-Système Kösters						
Dilution	08/02/2007	09/02/2007	12/02/2007	14/02/2007	19/02/2007	Moyenne
-4	23.08	23.25	23,13	23,86	23,24	23,41
-5	25,65	25,65	27,02	27,02	27,19	26,5
-6	28,79	29,08	31,11	30,65	30,42	30,01
-7	31,45	32,28	34,61	33,9	34,54	33,35
-8	34,4	35,94	38,29	37,42	ND	36,51
-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND

# Résultats comparatifs



# Résultats comparatifs

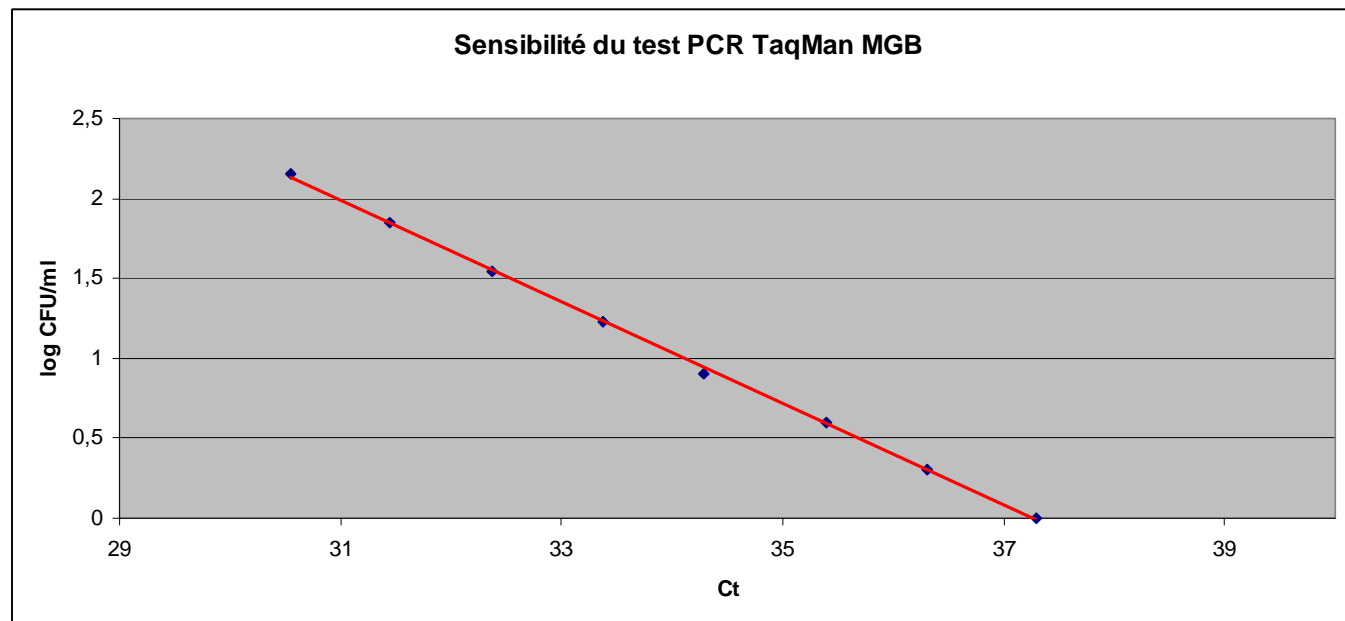


➤ Les performances du système avec sonde MGB sont supérieures



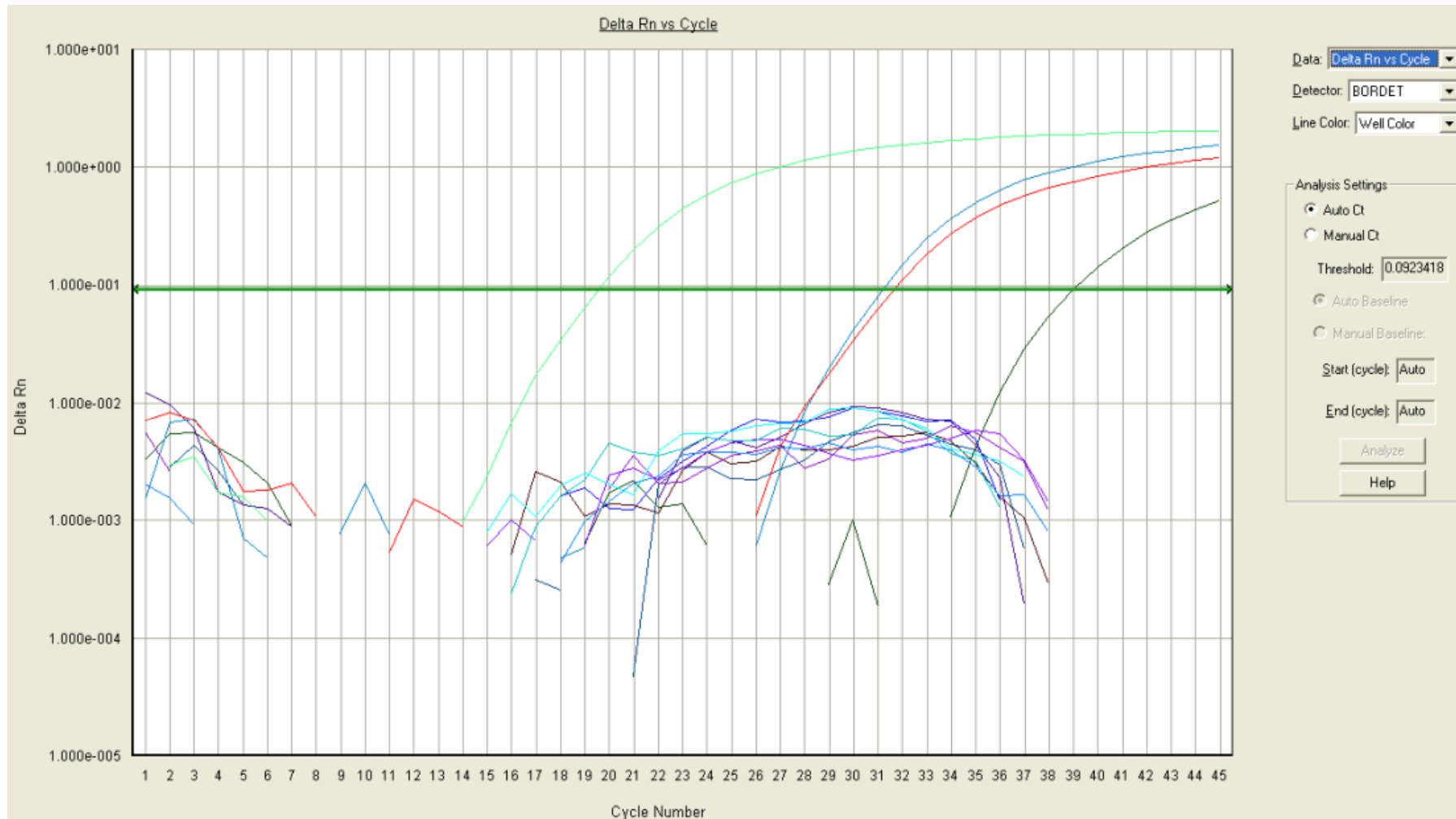
# Etude de la sensibilité du test PCR IS481-Sonde MGB

CFU/ml	log CFU/ml	Ct moyen
140	2,15	30,55
70	1,85	31,44
35	1,54	32,37
17	1,23	33,37
8	0,9	34,28
4	0,6	35,4
3	0,3	36,31
1	0	37,29

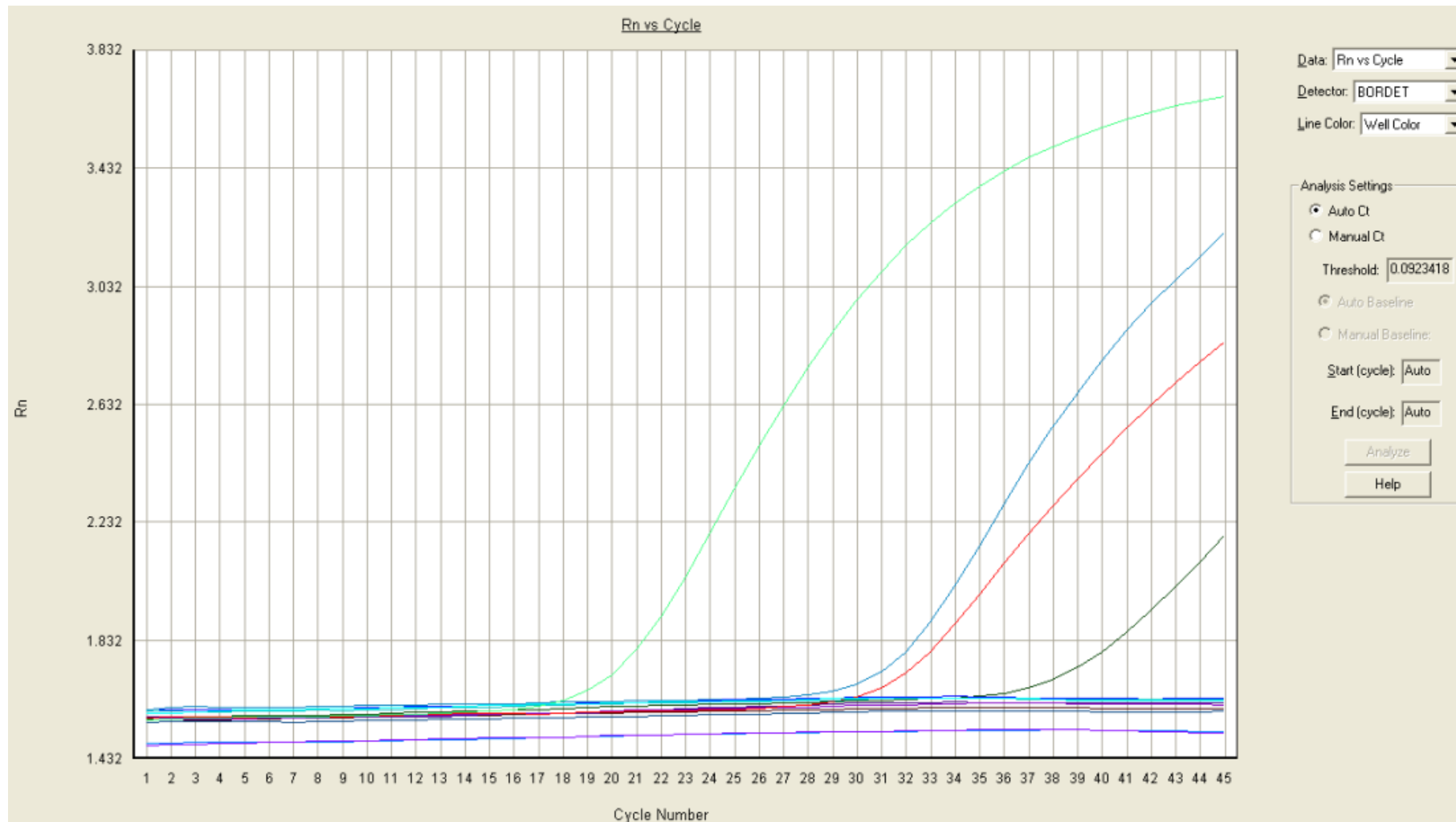


➤ Conclusion : détection jusqu'à 1 CFU/ml

# Etude de la sensibilité du test PCR IS481-Sonde MGB



# Etude de la sensibilité du test PCR IS481-Sonde MGB





# Variables pouvant affecter les performances de la PCR

- ❑ **Extraction des acides nucléiques à partir du prélèvement**
  - ✓ Traitement par protéinase K, puis ébullition
  - ✓ Traitement par solvants organiques (phénol-chloroforme)
  - ✓ Techniques d'extraction utilisant la silice ou des billes magnétiques et les sels chaotropiques qui modifient les conditions de stringence du mélange réactionnel et provoque l'adhésion des acides nucléiques (ADN et ARN) à la poudre ou aux billes de silice
- Automates d'extraction

Petit format (8 à 12 échantillons)

QIACube

MagNa Compact ...

Moyen format (16 à 32 échantillons)

MagNaPure

EasyMag...

Grand format (48 à 96 échantillons)

AmpliPrep

BioRobot MDx...



# Variables pouvant affecter les performances de la PCR

- ✓ Vérification de la qualité de l'extraction par :
    - Amplification d'un gène cellulaire (« house-keeping »)
    - Amplification d'un contrôle interne co-extrait dans le prélèvement
- La diminution ou l'annulation du signal d'amplification attendu pour le contrôle indique la présence d'inhibiteurs avec un risque de faux résultat négatif.
- ❑ **Autres facteurs**
    - ✓ Master Mix
    - ✓ Taq polymérase ...
    - ✓ Performances du thermocycleur

Lorsque l'on utilise un test mis au point au laboratoire, ces différents paramètres sont à étudier lors de la validation de la technique.

Il existe maintenant des trousse commerciales, plus standardisées, et certaines marquées CE, permettant d'éviter le long processus de mise au point et de validation des techniques *made-in-house*.



# Variables pouvant affecter les performances de la PCR

L'utilisation du système ciblant la séquence d'insertion IS481 est la plus répandue. Cette dernière est représentée à 80-200 exemplaires chez *Bordetella pertussis*.

La sensibilité est excellente mais il existe une hybridation croisée avec *Bordetella holmesii* (8 à 10 exemplaires par génome) et avec certaines souches de *Bordetella bronchiseptica*.

L'impact réel de cette non-spécificité est vraisemblablement faible, du fait que ces deux espèces sont assez rarement impliquées dans les infections respiratoires humaines.

- ✓ Possibilité de vérifier la spécificité de la détection par système IS481 en utilisant le système TOX.
- ✓ Ce dernier permet une détection moins sensible. D'où une incertitude concernant les résultats

**TOX négatif**  
**IS481 positif mais Ct > 35**



# Evaluation de la durée de détection de *Bordetella* par rapport au début de la toux

Patient 1		Patient 2		Patient 3	
Jour(*)	Ct	Jour(*)	Ct	Jour(*)	Ct
5	19	10	22	3	17
13	31	14	28	8	19
25	37	21	35	18	30
38	ND	28	39	28	38
		40	ND	45	ND
(*) estimé après le début des quintes					

- ✓ Le cycle de sortie augmente progressivement après le début de la toux.
- ✓ Après 21-25 jours, le Ct dépasse 35.
- ✓ Il est difficile de vérifier la spécificité du signal, la PCR TOX étant à ce moment régulièrement négative.

**Réponse : résultat équivoque, à discuter en fonction de la date de début de la toux.**

## Autres séquences génomiques-cible

Gène de l'adényl-cyclase (*cyaA*)

Gène de la Porine

Gène *recA*

Gène de la Pertactine

Gène promoteur de la toxine (*ptxA-Pr*)- spécifique de *B. pertussis*.

Gène BP3385-spécifique de *B. pertussis*

Gènes BP 283-BP485 – spécifiques de *B.pertussis*

...

### Nécessité d'une évaluation externe de la Qualité

- ✓ Quality Control in Molecular Diagnostics (QCMD)
- ✓ Essais préliminaires pour organiser un EEQ en France



# Autres séquences génomiques-cible

En cas de prélèvement tardif, le seul recours pour effectuer un diagnostic présomptif de coqueluche est la sérologie.

- ❑ Recherche des anticorps IgM non indicative
- ❑ Recherche des anticorps IgG

## Immuno-empreinte

Qualitatif

Pureté de la toxine

Reproductibilité aléatoire

Test inscrit à la NABM (B150) ( le seul actuellement )

## ELISA : anticorps anti toxine pertussique

Technique « de référence » ( évaluation de la réponse vaccinale)

Etalonnée par rapport au standard international NIBSC

Quantitative

Permet de fixer un seuil à partir duquel une coqueluche récente est envisageable

Non remboursée actuellement

