

# Etude collaborative entre le CNR de la coqueluche et des laboratoires hospitaliers (RENACOQ) et privés (LAM) 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 Renacoq (44 laboratoires) et du Collège de Bactériologie et Virologie et Hygiène de France. La PCR en temps réel comme outil de diagnostic direct de la coqueluche est utilisée par la plus part de ces laboratoires. Un des moyens pour s'assurer de la qualité des données est d'organiser régulièrement des contrôles qualités (CQ). Notre CNR a proposé un tel CQ en 2010.

**Objet de l'étude :** Comparer et évaluer la sensibilité de la technique de PCR temps réel (PCRtr) utilisée par les laboratoires hospitaliers (réseau Renacoq et/ou CBVH) et privés (LAM) pour la détection du matériel génétique de bordetella. Pour cela des contrôles qualités ont été préparés par le CNR pour les 33 laboratoires intéressés de participer à cette collaboration. Les participants ont rempli un questionnaire afin que nous puissions répertorier les méthodes d'extraction, le ou les gènes ciblés, les méthodes d'amplification et de détection ainsi que les équipements. L'organisation de ce CQ avait aussi pour but de faire un point sur l'utilisation des kits commerciaux et le suivi des recommandations du groupe « Pertussis PCR consensus group » (Riffelmann et al JCM 2005 Vol 43, N°10, p4925-4929).

**Méthode :** Le CNR a préparé une série de 6 tubes contenant ou non de l'ADN de différentes espèces de *Bordetella* (CQ1 à CQ6). Après validation interne, les échantillons ont été distribués pour être ensuite envoyés aux 33 laboratoires participants. Chaque laboratoire a fait la PCR temps réel dans les conditions habituelles et envoyé les résultats au CNR.

Les kits commerciaux sont moins utilisés que les kits d'amplification génériques (type Roche ou AB). Le plus utilisé est celui d'Argene.

TABLEAU 1 : Récapitulatif des méthodes et réactifs les plus utilisés par les participants du CQ

Total participants (n=33)	Méthode d'extraction_%	Nb de cible_%	Thermocycleur en temps réel_%	Nb de cycles_%	Type de sonde	Kit Amplification	Vol. réactionnel	Utilisation d'UNG	Témoin extraction	Témoin positif	Fournisseur des amorces et sondes	Référence des amorces et sondes utilisées
Réponses	29	33	31	30	30	30	30	30	29	30	30	30
	QiAmp DNA mini Kit (Qiagen)_28%	2_48%	LC 1/2/480 (Roche)_32%	40 cycles_57%	TaqMan_73%	LC DNA master (Roche)_23%	25µl_60%	Non_73%	Oui_76%	Oui_100%	Eurogentec_20%	Riffelmann et al, 2005_60%
	EasyMag <small>automate</small> (Biomérieux)_14%	1_42%	Smart Cycler II_26%	45 cycles_40%	Hybridation_17%	Univ. PCR Master mix (AB)_17%	20µl_27%	Oui_26%	Non_24%		Sigma_17%	
	EZ1 <small>automate</small> DNA-Tissue (Qiagen)_10%	3_9%	ABI prism 7000/7500/7900_16%	35 cycles_3%	Sybergreen_7%	Bordetella R-gene, (Argene)_13%					Argene_13%	
	MagNAPure LC <small>automate</small> (Roche)_10%		Rotor Gene 6000_10%		Beacon_3%	Premix ex Taq de chez Takara_10%					MWG Biotech_10%	Plus de la moitié des laboratoires utilisent les amorces et sondes recommandées par le groupe consensus pertussis PCR

TABLEAU 2 : Résultats attendus du CQ

ADN	Résultat/Conclusion attendus
CQ1	- Négatif / Absence d'ADN de <i>Bordetella</i>
CQ2	Bp IS481 positif / Détection d'ADN de <i>Bordetella</i> ( et si utilisation de ptxS1 : détection d'ADN de <i>B. pertussis</i>
CQ3	Bpp IS1001 positif / Détection d'ADN de <i>Bordetella parapertussis</i> si utilisation de l'IS1001 sinon négatif
CQ4	- Négatif / Absence d'ADN de <i>Bordetella</i>
CQ5	Bp IS481 positif / Détection d'ADN de <i>Bordetella</i> ( et si utilisation de ptxS1 : détection d'ADN de <i>B. pertussis</i> )
CQ6	Bhol IS481 positif / Détection d'ADN de <i>Bordetella</i> (et si utilisation de ptxS1 -- négatif et recA - positif: détection de <i>B. holmesii</i> )

TABLEAU 3-0 : Moyenne des Ct obtenus

	CQ2 (IS481)	CQ3 (IS1001)	CQ5 (IS481)	CQ6 (IS481)
Concentration d'ADN	100 pg/µl	1 pg/µl	100 fg/µl	100 pg/µl
Ct labo IP	22	25	28	23
Nbre de réponses (n)	n=30	n=17	n=30	n=30
Ct moyen	21	25	27	22
% de laboratoires avec le Ct moyen +/- 2	63%	65%	70%	53%
Ecart Ct	14 à 32	19 à 36	21 à 38	15 à 32

Les valeurs de Ct sont assez homogènes sauf pour les laboratoires n° 18 et 23 qui ont des valeurs de Ct plus élevées que l'ensemble des participants. A l'opposé, les laboratoires n° 9 et 11 ont des valeurs de Ct plus faibles que l'ensemble des participants. Ce qui explique les écarts des valeurs de Ct observés.

TABLEAU 3-3 : Utilisation de 3 cibles (IS481, IS1001 et ptxS1)

labo code	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4	CQ5	CQ6						
1	A	-	A	19	A	24	A	-	A	26	A	19
8	A	-	A	21	A	25	A	-	A	26	A	22
28	A	-	A	20	A	28	A	-	A	25	A	19

Les trois laboratoires ont donné les résultats et les conclusions correctes et par élimination *B. holmesii* dans le CQ6 mais sans identification réelle. En effet seule l'utilisation de la PCR H-recA, spécifique de l'espèce *B. holmesii*, permet de conclure à l'identification de cette espèce

**Un grand merci à :**

F. Doucet-Populaire, N. Bourgeois, M. Debruyne, A. Ferroni, C. Burucoa, Ch. Payan, G. Hery-Arnaud, J. Cottin, Ph. Lanotte, S.A. Gibaud, M. Vergnaud, B. Soullie, Ph. Lelours, J.L. Koeck, R. Bonnet, J.P. Romaszko, J. Delmas, M.F. Prere, A. Lecoustumier, N. Wilhelm, H. Chardon, J. Etienne, S. Boisset, F. Grattard, D. Raffent, M. Levast, J.M. Scheffel, D. De briel, M. Buser, J.M. Duez, C. Alauzet, G. Couetdic, D. Marx, L. Brasse, C. Dechamps, V. Vernet-Garnier, M. Nouvellon, L. Lemeze, R. Courcol, M. Roussel, A.S. Deleplanque, B. Prevost, F. Eb, B. Maurice, S. Bonacorsi, Ch. Bigaillon, A. Merens, F. Garnier, A. Guignon, Ph. Leroy

TABLEAU 3-1 : Utilisation d'1 cible (IS481)

labo code	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4	CQ5	Ct	Résultat	Ct	Résultat	Ct		
2	A	-	B	20	A	-	A	-	B	25	B	19
3	B	-	B	?	B	-	B	-	B	?	B	?
7	A	-	B	21	C	37	C	40	B	27	B	21
11	C	34	B	14	B	-	B	-	B	22	B	15
12	A	-	B	20	A	-	A	-	B	25	B	20
14	A	-	B	24	A	-	A	-	B	29	B	24
15	A	-	B	21	A	-	A	-	B	28	B	21
18	A	-	B	32	A	-	A	-	B	38	B	32
19	A	-	B	20	A	-	A	-	B	30	B	21
23	A	-	B	31	A	-	A	-	B	35	B	32
29	A	-	B	18	A	-	A	-	B	25	B	19
30	B	-	B	23	B	-	B	-	B	27	B	22
31	A	-	B	21	A	-	A	-	B	27	B	21
33	B	-	B	17	B	-	B	-	B	23	B	17

**Résultats du CQ**

Code A = résultat et conclusion correctes, Code B = résultat correct mais conclusion incorrecte ou incomplète, Code C = résultat incorrect

TABLEAU 3-2 : Utilisation de 2 cibles (IS481 et IS1001)

labo code	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4	CQ5	CQ6						
4	A	-	A	20	A	25	A	-	A	27	A	22
5	B	-	B	17/35	A	19	B2	-	A	23	A	17
6	A	-	B	21	A	24	A	-	B	27	B	21
9	B	-	B	16	A	19	B	-	B	21	B	16
10	A	-	B	22	A	28	A	-	B	25	B	23
13	A	-	B	?	A	?	A	-	B	?	B	?
16	B	-	A	22	A	36	B2	-	A	28	A	23
17	A	-	A	19	A	25	A	-	A	25	A	20
20	B	-	B	21	A	25	B	-	B	26	B	22
21	A	-	A	21	A	25	A	-	A	29	A	22
22	B	-	B	?	A	?	B	-	B	?	B	?
24	A	-	B	25	A	26	A	-	B	30	B	26
25	A	-	C	17/40	A	24	A	-	B	25	B	18
26	A	-	B	22	A	25	A	-	B	30	B	26
27	A	-	B	20	A	25	A	-	B	26	B	22
32	A	-	B	25	A	30	A	-	B	29	B	25

La majorité des laboratoires utilisant 1 ou 2 cibles a donné les résultats corrects mais la conclusion utilisée pour l'IS481 (en général : détection de *Bordetella pertussis*) n'est pas correcte. En effet l'IS481 n'est pas spécifique de *B. pertussis* et peut être détectée dans d'autres espèces comme *Bordetella holmesii*.

**Résultats/Conclusion :** Les 33 laboratoires participants ont rendu leurs résultats et la plupart ont obtenu un résultat très satisfaisant ou satisfaisant. Néanmoins ce CQ a permis de souligner la nécessité d'une homogénéisation dans le rendu des résultats. En effet, la majorité des laboratoires qui utilisent l'IS481 comme cible, conclut à la détection d'ADN de *Bordetella pertussis* lorsque la PCRtr est positive. Or il a été montré que l'IS481 peut aussi être détectée dans d'autres espèces comme *Bordetella holmesii*. L'organisation de ce CQ aura permis de sensibiliser les laboratoires sur l'importance du rendu de conclusion aux cliniciens.