

2m11.2617.4

Université de Montréal

**Diagnostic rapide de la coqueluche  
par cytométrie en flux**

par

**Malika Mekki**

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès-sciences (M.Sc.)  
en microbiologie et immunologie

Mai, 1997  
©Malika Mekki, 1997



W  
4  
U58  
1998  
V.052

Université de Montréal

Diagnostic rapide de la copuluche  
par cytométrie en flux

par

Majid Mekki

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître en sciences (M.Sc.)  
en microbiologie et immunologie



M. Mekki, 1997  
Mekki Majid, 1997

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Diagnostic rapide de la coqueluche  
par cytométrie en flux présenté**

par

**Malika Mekki**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-Roch Lapointe	Président –rapporteur
Richard Marchand	Directeur de recherche
Serge Montplaisir	Codirecteur
Carolina Alfieri	Membre du jury

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

La coqueluche est une infection très contagieuse des voies respiratoires causée par une bactérie appelée "Bordetella pertussis". Elle touche les personnes de tout âge, mais elle reste particulièrement plus grave chez les nourrissons. La coqueluche se trouve ainsi au rang des maladies pédiatriques les plus contagieuses responsables de séquelles neurologiques et pulmonaires.

Au Québec par exemple, la coqueluche connaît depuis le début des années quatre-vingt un retour de cycle de forte activité malgré la mise en place d'un programme systématique de vaccination. La raison invoquée serait une diminution progressive de l'immunité vaccinale.

Deux voies s'offrent aux chercheurs pour limiter la transmission de cette maladie: (1) développer un vaccin plus efficace; (2) améliorer les méthodes de diagnostic. Dans ce contexte, nous avons pour objectif: de développer un nouvel outil de diagnostic rapide par des méthodes immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux fluorescents marqués à la fluorescéine réagissant avec des lipopolysaccharides caractéristiques aux bactéries responsables de la coqueluche (*Bordetella pertussis* et *parapertussis*). Cette utilisation permettra de détecter rapidement les antigènes microbiens à l'aide de la cytométrie en flux tel

qu'utilisée pour d'autres infections (Pneumocystis...).

Nous avons comparé les résultats obtenus par culture (en collaboration avec le laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Sainte-Justine), par PCR (en collaboration avec le département de Microbiologie médicale et maladies infectieuses de l'Université d'Alberta) et par immunofluorescence directe sur lame (en collaboration avec le Laboratoire National d'Immunologie d'Ottawa), avec une nouvelle technique d'immunofluorescence directe lue par cytométrie en flux que nous avons réalisée à partir des mêmes spécimens au laboratoire de Séro-Immunologie à l'hôpital Sainte-Justine.

L'analyse des résultats des mille cent spécimens, obtenus à l'issue de notre étude, nous a permis de montrer que la technique par cytométrie en flux serait un outil de diagnostic rapide de la coqueluche en raison de sa spécificité, de sa rapidité (résultats obtenus en moins d'une heure) et une sensibilité augmentée par rapport à la culture.

**Mots-clés: coqueluche, diagnostic, anticorps monoclonaux, cytométrie en flux.**

## TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>i</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xii</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>3</b>
<b>II. 1 RAPPEL HISTORIQUE .....</b>	<b>3</b>
<b>II. 2 BACTÉRIOLOGIE .....</b>	<b>5</b>
<b>II. 3 ÉPIDÉMIOLOGIE.....</b>	<b>9</b>
<b>II. 4 PATHOGÉNIE.....</b>	<b>12</b>

II. 5 MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	18
II. 6 TRANSMISSION DE LA MALADIE.....	19
II. 7 DIAGNOSTIC CLINIQUE.....	20
II. 8 LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE.....	21
II. 8. 1 Les méthodes standards.....	21
II. 8. 1. 1 La culture.....	21
II. 8. 1. 2 Sérologie.....	27
II. 8. 1. 3 Détection d'anticorps sécrétoires.....	30
II. 8. 1. 4 Contre-immunoélectrophorèse.....	31
II. 8. 2 Les nouvelles méthodes.....	32
II. 8. 2. 1 L'immunofluorescence directe sur lame.....	32
II. 8. 2. 2 ADN recombinant.....	34
II. 8. 2. 3 PCR (Polymerase chain réaction).....	36
II. 8. 2. 4 CHO (Chinese Hamster Ovary).....	38
II. 8. 2. 5 Recherche de l'adénylate cyclase (Ac).....	39
II. 8. 2. 6 Méthodes de typage moléculaire des bactéries.....	40
II. 9 TRAITEMENT ET PRÉVENTION.....	42
II. 9. 1 Le traitement symptomatique.....	42
II. 9. 2 Antibiothérapie.....	42
II. 9. 3 Prophylaxie.....	43
II. 9. 4 Prévention de l'infection.....	43
II. 9. 5 Le vaccin.....	44

<b>III. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>	<b>47</b>
III. 1 LA CYTOMÉTRIE EN FLUX (CMF).....	48
III. 1. 1 Historique .....	48
III. 1. 2 Le principe de la cytométrie en flux .....	49
III. 1. 3 Le cytomètre utilisé.....	53
III. 2 L'ÉCHANTILLON .....	54
III. 3 LES RÉACTIFS .....	55
III. 4 PRÉPARATION DES SPÉCIMENS .....	56
III. 5 CALIBRAGE ET AJUSTEMENT DE L'APPAREIL .....	60
III. 6 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS .....	63
<b>IV. RÉSULTATS .....</b>	<b>66</b>
IV. 1 RÉSULTATS DES CENT PREMIERS PRÉLÈVEMENTS .....	66
IV. 2 RÉSULTATS DES MILLE CENT PRÉLÈVEMENTS.....	67
IV. 3 CONCORDANCE VS DISCORDANCE DES RÉSULTATS .....	69
IV. 3. 1 CMF et culture (mille cent prélèvements) .....	69
IV. 3. 1. 1 Tout prélèvement confondu.....	69
IV. 3. 1. 2 Selon le type de prélèvement .....	71
IV. 3. 2 CMF et culture (cent prélèvements) .....	73
IV. 3. 2. 1 Culture / PCR / IFD (cent prélèvements) .....	74
IV. 4 SOMMAIRE DES RÉSULTATS .....	76



<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>78</b>
V. 1 SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DE LA CYTOMÉTRIE .....	78
V. 2 UNE VARIATION SELON LE TYPE DE PRÉLÈVEMENT .....	80
V. 3 RÉCAPITULATION .....	81
<b>VI. CONCLUSION.....</b>	<b>86</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>90</b>

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<b>Tableau (1)</b> Identification.....	25
<b>Tableau (2)</b> Résultats des quatre tests.....	66
<b>Tableau (3)</b> Cytométrie/Culture (1100 prélèvements) .....	67
<b>Tableau (4) (a)</b> Prélèvements nasopharyngés.....	68
<b>Tableau (4) (b)</b> Aspirations nasopharyngées.....	68
<b>Tableau (5)</b> Concordance CMF/Culture(1100 prélèvements)..	70
<b>Tableau (6)</b> CMF/Culture (écouvillons nasopharyngés).....	71
<b>Tableau (7)</b> CMF/Culture (aspirations nasopharyngées).....	72

<b>Tableau (8)</b> CMF/Culture (100 prélèvements).....	73
<b>Tableau (9)</b> Culture/PCR.....	74
<b>Tableau (10)</b> Culture/IFD.....	75

## LISTE DES FIGURES

	Pages
<b>Figure (1)</b> Incidence (par 100 000) des cas de coqueluche...	10
<b>Figure (2)</b> Cas de coqueluche signalés.....	11
<b>Figure (3)</b> Les principales caractéristiques du cytomètre.....	52
<b>Figure (4)</b> Les phases d'analyse.....	59
<b>Figure (5)</b> Exemple de résultats négatif/positif.....	64
<b>Figure (6)</b> Concordance vs discordance CMF/Culture, IFD, PCR.....	77

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACMs : anticorps monoclonaux

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ARN : acide ribonucléique

CCE : Comité Consultatif de l'Épidémiologie

CCNI : Comité Consultatif National de l'Immunisation

CHO: Chinese Hamster Ovary

CIE: contre-immunoélectrophorèse

CMF: cytométrie en flux

C° : degré Celsius

DGSP : Direction Générale de la Santé Publique

ECP : électrophorèse en champs pulsés

ELISA : "enzyme-linked immunosorbent assay"

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FSC : Forward Scatter

IFD : immunofluorescence directe

IP : iodure de propidium

Kda : kilodalton

LCDC : Laboratory Centre for Disease Control

LOS : lipooligosaccharide

LPS : lipopolysaccharide

MSSS : Ministère de la Santé et des Services Sociaux

PCR : réaction de polymérase en chaîne

PM : poids moléculaire

PT : toxine pertussique

RMTC : Relevé des Maladies Transmissibles au Canada

SCP : Société Canadienne de Pédiatrie

SSC : Side Scatter

$\mu\text{m}$  : micromètre

## REMERCIEMENTS

Je remercie vivement le docteur Richard Marchand, directeur de recherche qui n'a ménagé aucun effort pour me permettre de mener à terme mon projet de recherche.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au docteur Serge Montplaisir, co-directeur, pour l'intérêt porté à ma recherche et l'occasion qu'il m'a donnée pour accomplir ce travail en m'acceptant dans son laboratoire de Séro-Immunologie à l'hôpital Sainte-Justine.

Que les docteurs Brodeur (Laboratoire National d'Immunologie à Ottawa), Irvin et Pepler (Département de Microbiologie médicale et maladies infectieuses de l'Université d'Alberta à Edmonton) trouvent à travers ces lignes toute l'expression de mes sincères remerciements pour les anticorps qu'ils nous ont fournis et les analyses qu'ils ont réalisées pour nous dans leur laboratoire.

Je remercie également le docteur Jean-Roch Lapointe et l'ensemble du personnel administratif et technique des Laboratoires de Microbiologie et de Séro-Immunologie de l'hôpital Sainte-Justine pour leur amabilité et l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je voudrais souligner combien je suis redevable envers mon époux et nos enfants. Tant pour leur patience que pour l'affection et l'amour dont ils m'ont entourée particulièrement durant cette période.

*À Lahouari,*

*Inès, Soumia et Sarah*



## I. INTRODUCTION

La coqueluche est une maladie infectieuse des voies respiratoires supérieures, décrite pour la première fois en 1578 lors d'une épidémie à Paris. Elle est causée par une bactérie appelée "Bordetella pertussis" isolée par Bordet et Gengou en 1900 dans l'expectoration d'un nourrisson atteint de la maladie. Cette bactérie fût nommée au début Haemophilus pertussis pour ses besoins nutritifs en sang. En 1906, un milieu riche en sang permettant la culture de la bactérie a été mis au point par Bordet et Gengou, et depuis porte leurs noms.

Cette maladie à déclaration obligatoire est hautement contagieuse et se manifeste par des quintes de toux très caractéristiques appelées "champ de coq". Jusqu'à 1940 elle causait plus de décès que les autres maladies infectieuses, et ce n'est que vers les années 50 que le taux d'incidence a diminué après la mise sur le marché du vaccin anti-coquelucheux. Cependant, en Angleterre durant les années 1970, les inquiétudes suscitées par ce nouveau vaccin auprès des populations en raison de ses effets secondaires a entraîné une baisse de la vaccination chez les enfants. On a alors noté une recrudescence importante de la coqueluche avec des décès et des complications associées (Lebel M, 1995).

Les principales méthodes de diagnostic de la coqueluche sont :

- la culture,
- la séroconversion,
- l'immunofluorescence directe (IFD), et
- la réaction de polymérase en chaîne (PCR).

Actuellement, la culture demeure le test de référence pour confirmer le diagnostic de coqueluche. Mais ce test est peu sensible et les délais sont longs, la sérologie reste un argument rétrospectif, l'IFD est utilisée juste pour un diagnostic présomptif, et la PCR est parfois trop sensible (faux positifs).

La mise au point d'un test rapide, efficace, sensible et peu coûteux est devenue une des priorités des organismes de santé au Canada comme le Comité consultatif national de l'immunisation (CCNI), le Comité consultatif de l'épidémiologie (CCE), et la Société canadienne de pédiatrie (SCP). (Relevé des Maladies Transmissibles au Canada, Vol.19, pp. 124- 135, 1993).

## II. REVUE DE LITTÉRATURE

### II. 1 Rappel historique

La description de la coqueluche date depuis 1500 et c'est en 1679 que le syndrome coqueluchoïde a été décrit par Sydenham sous le nom de pertussis qui veut dire toux sévère.

En 1906 Bordet et Gengou découvraient dans l'expectoration d'un nourrisson atteint de coqueluche le bacille *Haemophilus pertussis* et arrivaient à le cultiver à l'aide d'un milieu à la pomme de terre et au sang. Bradford et Slavin en 1937 et Eldering et Kendrick en 1938, différencient deux espèces de *Bordetella* qui sont *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*. *Bordetella parapertussis* pousse plus rapidement en primoculture que *Bordetella pertussis*. *Bordetella parapertussis* qui a été incriminé comme agent causal mineur de la coqueluche, ne représente que 3 à 4% des cas de coqueluche (Michel-Briand, 1989).

Une troisième espèce, *Bordetella bronchiseptica* a été isolée par Brown en 1926, ce n'est qu'en 1952 que Lopez proposa la classification définitive de cette bactérie dans le genre *Bordetella* dans la septième édi-

tion of "Bergey's Manual of systematic Bacteriology" (Woolfrey et Moody, 1991). Il est responsable essentiellement d'infection chez les animaux (chien, chat, lapin...), il est l'agent causal de la rhinite atrophique du porc, il adhère de préférence aux cellules ciliées du tractus respiratoire de l'animal. Il donne rarement une maladie semblable à la coqueluche chez l'humain, peut causer des infections opportunistes chez l'hôte immunocompromis mais elles restent rares. Il ne peut être isolé chez l'homme qu'après un contact étroit avec les animaux. Depuis 1911 et jusqu'en 1990 seulement 25 cas d'infection à *Bordetella bronchiseptica* chez l'humain, ont été signalés. Ces cas étaient liés à un contact avec l'animal. La sensibilité de *Bordetella bronchiseptica* aux agents antimicrobiens est semblable à la sensibilité du *Pseudomonas aeruginosa* (Woolfrey et Moody, 1991).

Finalement, une quatrième espèce *Bordetella avium*, semblable à *Bordetella bronchiseptica*, pathogène seulement pour l'animal a été décrite. En raison de son contenu en DNA (C + G) très différent des autres espèces, il est proposé de la transférer au genre *Alcaligenes*.

## II. 2 Bactériologie

Il existe quatre espèces du genre *Bordetella*: *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica* et *Bordetella avium* :

(1) morphologie: c'est une petite bactérie sous forme de bâtonnets ou de coccobacilles ( $0,2$  à  $0,3 \mu\text{m}$  x  $0,5$  à  $1,0 \mu\text{m}$ ) à gram négatif, à coloration bipolaire, immobile (*Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*), les deux autres espèces sont mobiles par des cils péritriches, asporulée, présentant une capsule difficile à mettre en évidence et qui ne gonfle pas en présence d'anti-sérum (Michel-Briand, 1989);

(2) culture: aérobic strict, ayant donc un métabolisme respiratoire; difficile à cultiver, bien qu'elle n'ait besoin ni du facteur X (hémine) ni du facteur V (nicotinamide) contrairement aux *Haemophilus*, nécessite des quantités importantes de sang défibriné (30% du milieu, sang de cheval, de lapin ou de mouton) et de source d'acides aminés soufrés (cystéine, méthionine). Le sang a pour effet d'inhiber les acides gras non saturés qui sont toxiques pour la bactérie. La culture de

Bordetella nécessite des milieux de culture spécifiques:

- BG ( milieu de Bordet Gengou à base de pomme de terre cuite dans un mélange glycérol - eau additionnée de chlorure de sodium et de gélose auquel on ajoute du sang défibriné fraîchement obtenu),
  - BG+ (BG avec antibiotiques tels que méthicilline ou céphalexine pour inhiber la croissance des bactéries de la flore normale),
  - GS (gélose au sang pour la culture de la flore normale).
  - Regan-lowe est un autre milieu de culture sélectif proposé pour la culture de Bordetella. Il est aussi utilisé comme milieu de transport à base de charbon enrichi au sang.
- (3) Caractères cultureux : la durée de croissance ainsi que la taille des colonies diffèrent selon l'espèce :
- pour Bordetella pertussis la culture nécessite de trois à six jours d'incubation, sur BG elles donnent des petites

colonies (0,5 mm de diamètre) sphériques, luisantes, grisâtres comme des gouttelettes de mercure entourées d'un halo d'hémolyse rouge sombre à limite floue;

- *Bordetella parapertussis*, la culture est légèrement plus rapide, donne des colonies plus larges entourées par une hémolyse plus prononcée avec un pigment brunâtre dû à la présence d'une tyrosinase et une alcalinisation du milieu de culture.

(4) Les différentes phases de culture : Leslie et coll. ont défini quatre phases de croissance dans la culture de *Bordetella pertussis* (Leslie et coll, 1931) :

- La phase 1 : correspond à des colonies S, lisses, capsulées, hémolytiques et virulentes avec production de toxines et d'antigènes de surface. Ces bactéries isolées sur milieu BG après 48 heures d'incubation dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau, donnent une réaction d'agglutination avec le sérum correspondant. Seuls les vaccins préparés à partir de ces

colonies sont efficaces.

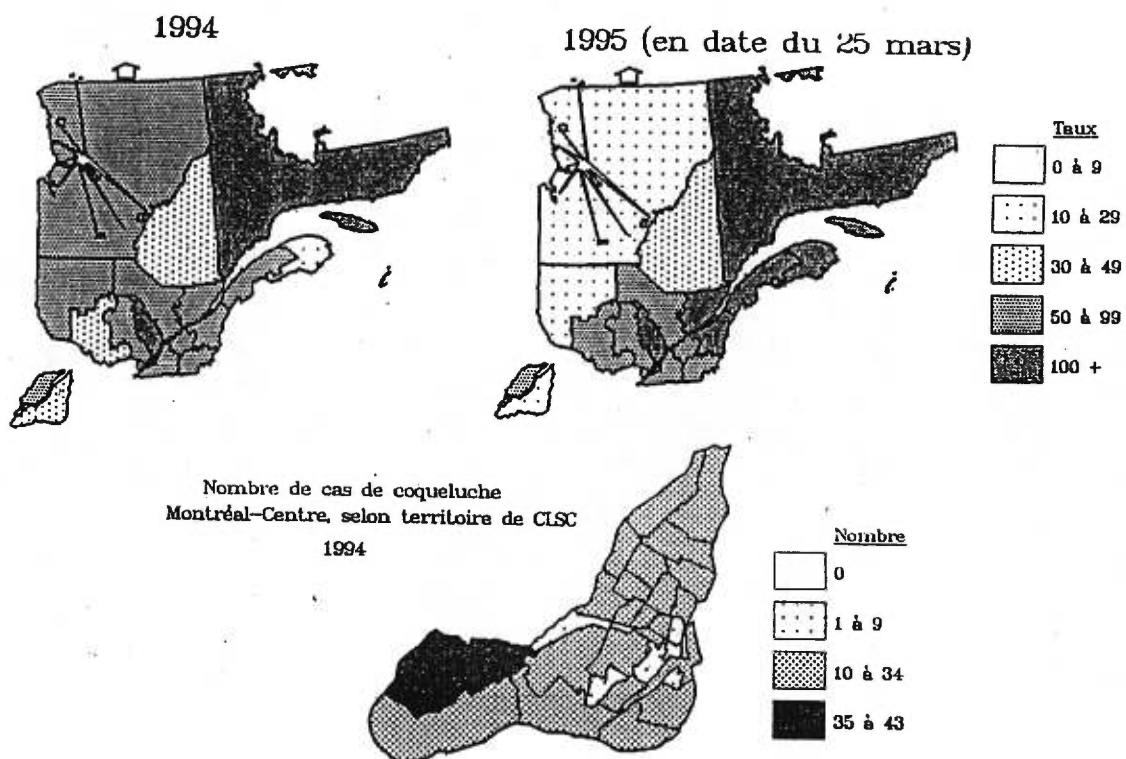
- Les phases 2 et 3 sont des phases intermédiaires.
  - La phase 4: correspond à des colonies R, larges, rugueuses, grisâtres, non hémolytiques, non capsulées et ont perdu leur virulence et plusieurs protéines de paroi (facteur sensibilisant à l'histamine, facteur donnant la lymphocytose, antigène protecteur). Des passages successifs en laboratoire tendent à sélectionner des bactéries en phase 4. Ces variations phénotypiques sont induites par des altérations des conditions de croissance (température et milieu de culture) et sont réversibles (Lacey et coll,1960).
- (5) Les prélèvements pour culture, il existe deux types de prélèvement :
- sécrétion nasopharyngée prélevée à l'hôpital et transportée immédiatement au laboratoire dans un milieu de transport (écouvillon);
  - aspiration nasopharyngée prélevée dans un flacon stérile (liquide).



## II. 3 Épidémiologie

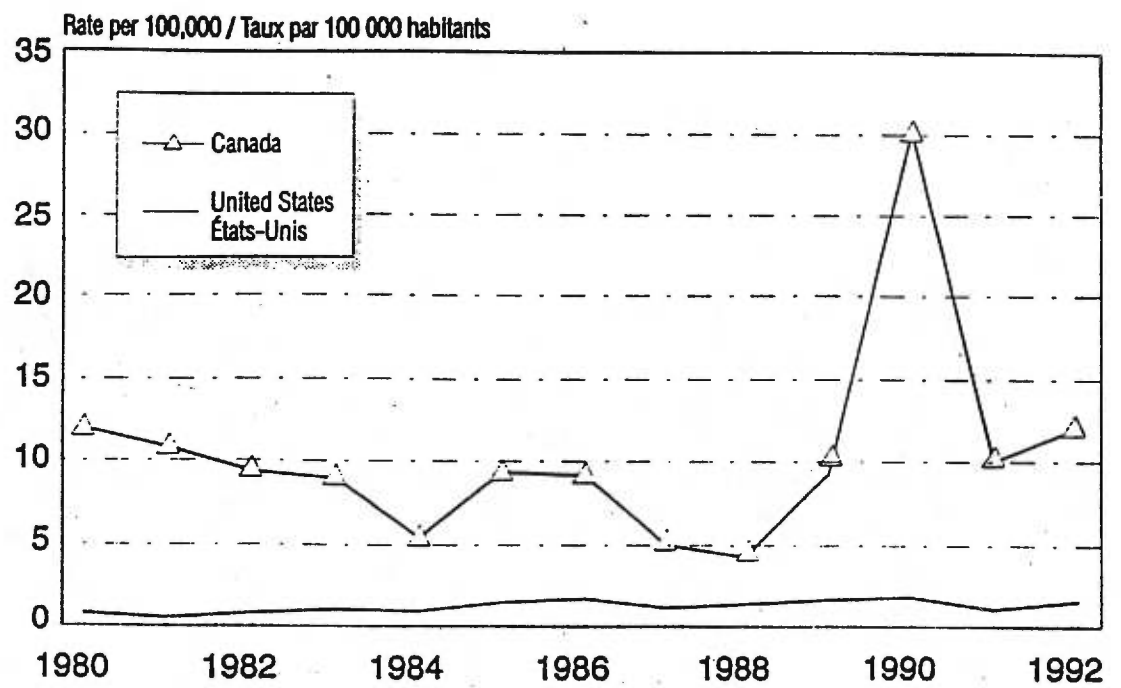
Malgré la mise en place d'un programme systématique de vaccination, on voit apparaître au Québec, "épisodiquement des vagues d'épidémies qui touchent principalement les nourrissons". En 1990, 1619 cas de coqueluche ont été signalés et en 1991, 602 cas (April N et coll., 1993). Plus de 90% des cas déclarés avaient moins de quinze ans. Plus de 3700 cas ont été signalés en 1992 pour l'ensemble du Canada et 1353 cas durant les six premiers mois de 1993 contre 1139 cas pour la même période en 1992 (RTMC, Vol. 19, 1993, pp. 124-135). Ces chiffres peuvent ne pas refléter l'incidence réelle de la maladie à cause des sous déclarations (RMTTC, Vol: 19,1993, pp. 41-45). Chez les enfants de moins d'un an, les taux d'incidence annuelle de la coqueluche s'élèvent à un cas pour 1000. Soulignons enfin que selon le relevé des maladies transmissibles au Canada (1993, Vol. 19, pp. 124-135) les taux de coqueluche déclarés au Canada sont beaucoup plus élevés que ceux déclarés aux États-Unis.

**Figure 1**  
**Incidence (par 100 000) des cas de coqueluche**  
**(Province de Québec)**



source: L. Bédard (1995)

**Figure 2**  
**Cas de coqueluche signalés**  
**Canada et aux États-Unis (1980-1992)**



source: Relevé des maladies transmissibles au Canada (1993, Vol. 19)

## II. 4 Pathogénie

*Bordetella pertussis* a une affinité particulière pour l'épithélium cilié des voies respiratoires supérieures où il se fixe par ses appendices filamenteux et son glycocalix, se reproduit, et libère différents produits qui sont à l'origine des manifestations cliniques de la maladie et de la virulence de la bactérie (Michel-Briand, 1989). Ces produits ont soit un effet d'adhésion de la bactérie aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aussi aux lymphocytes, macrophages et cellules épithéliales non ciliées (adhésines), soit un effet toxique (toxines), soit les deux à la fois. Parmi eux sont désignés les antigènes exploités pour le diagnostic sérologique et entrant dans la préparation des vaccins (Betsou F, 1995):

### (1) Les adhésines:

- FHA (hémagglutinine filamenteuse) et AGGs (agglutinogènes) sont des protéines sécrétées;
- PRN (pertactine) : est une protéine de membrane externe.

(2) Les toxines: la toxine pertussique (TP) est produite par *Bordetella pertussis* seulement, c'est une exotoxine protéique, considérée comme l'antigène majeur déterminant l'immunité anti-coquelucheuse dont les principaux effets sont: l'induction de l'hyperlymphocytose par effet LPF (lymphocytosis-promoting factor); l'inhibition de la sécrétion d'histamine ou effet HSF (histamine-sensitizing factor) ou facteur sensibilisant à l'histamine; l'hypoglycémie par effet IAP (islet activating protein). Cette toxine de poids moléculaire variant entre 100 et 123 KDa est le principal facteur de virulence de *Bordetella pertussis*, elle n'est exprimée qu'en phase 1, et est composée de deux sous unités A et B :

- la sous unité A, formée d'un seul protomère S1, est responsable des effets toxiques. Elle a une activité ADP-ribosyl transferase inactivant les protéines G régulatrices. Elle hypersensibilise à l'histamine et empêche la migration des lymphocytes, d'où l'hyperlymphocytose;
- la sous unité B est composée de quatre protomères

S2, S3, S4 et S5 organisés en un pentamère. Elle participe à l'adhésion, permet la fixation de la toxine au récepteur cellulaire, active les îlots de Langerhans et a une activité mitogène.

La toxine pertussique serait aussi capable d'induire une inhibition de la migration des macrophages vers le site de l'inflammation, une inhibition de l'effet du facteur chimiotactique et de la réponse primaire d'anticorps IgM, et une augmentation de la perméabilité vasculaire.

- (3) Les hémagglutinines sont des glycoprotéines responsables de l'attachement des bactéries à la surface des cellules épithéliales respiratoires. Les hémagglutinines filamenteuses portées par les pili (fimbriae hémagglutinin ou FHA) ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes et permettent l'attachement de *Bordetella pertussis* sur l'épithélium respiratoire, probablement par l'interaction des séquences RGD (aminoacid sequences RGD-glycine-asparagine) avec les intégrines des cellules de l'hôte (Hewlett EL, 1995).
- (4) Une endotoxine thermostable de nature lipopolysaccharidique: que l'on peut assimiler à la toxine des bactéries gram négatif (an-

tigène O) situé dans la paroi bactérienne. Sa structure est composée:

- de lipide A, qui est un glycophospholipide,
- du core, composé d'environ cinq sucres aminés,
- de l'antigène O : formé d'une chaîne répétitive de polysaccharides d'environ 40 sucres (Leive et coll,1980).

Comme le LPS (lipopolysaccharide) des bactéries gram négatif, celui de *Bordetella pertussis* est pyrogène à faible dose lorsqu'il est injecté à un animal, et cause une réaction locale de Shwartzman (Ayme et coll, 1980). Il est mitogénique pour les lymphocytes de souris et possède aussi des propriétés d'adjuvant. Une propriété unique au LPS de *Bordetella pertussis* est la capacité d'induire chez la souris la résistance contre certains adénovirus et un rôle possible du LPS dans l'attachement des bactéries (Winters et coll, 1985).

(5) Une toxine dermonécrotique découverte par Bordet et Gengou,

est thermosensible à 56°C. et détruite par les enzymes protéolytiques. Elle est synthétisée dans toutes les phases de la croissance de la bactérie. Ses propriétés antigéniques sont faibles. Il s'agit d'une toxine protéique intracellulaire de poids moléculaire de 89 à 102 KDa qui se compose de quatre polypeptides. Injectée par voie sous-cutanée elle provoque des lésions nécrotiques. Elle serait aussi capable d'induire une vasoconstriction des vaisseaux sanguins au niveau des cellules musculaires lisses donc une diminution du flot sanguin et dans les cas sévères une nécrose des tissus avoisinants, plus particulièrement au niveau des poumons.

- (6) Les agglutinogènes: le genre *Bordetella* possède 14 agglutinogènes (AGGs) qui sont composés de protéines de poids moléculaires variant entre 10 et 23 KDa. *Bordetella pertussis* a 8 AGGs dont les six premiers sont spécifiques à l'espèce. Les AGGs 1, 2 et 3 sont des antigènes majeurs alors que les AGGs 4, 5 et 6 induisent une très faible réponse immunitaire (Endoh et coll, 1988). Les AGGs 2, 3 et 6 définissent trois types de fimbriae. La démonstration de la présence d'anticorps protecteurs anti-AGGs représente une avenue intéressante pour une protection vaccinale.



- (7) L'adénylate cyclase: une enzyme extra-cytoplasmique de poids moléculaire de 43 à 200 KDa, qui activée par une protéine intracellulaire des cellules cibles, la calmoduline, catalyse la production d'AMPcyclique à partir de l'ATP. Elle pourrait être à l'origine de la paralysie des mouvements ciliaires des cellules épithéliales, des bronches, de l'inhibition de la chimiotaxie des leucocytes, de la perte du pouvoir anti-infectieux des neutrophiles et de la cytotoxicité des cellules tueuses. Elle permet aussi l'inhibition de la phagocytose.
- (8) Une cytotoxine trachéale (TCT, Tracheal Cytotoxin), sa composition est similaire à celle du peptidoglycane des bactéries gram négatif: acide diaminopimélique, acide muramique, alanine, acide glutamique et résidus glucosamines. Ce glycopeptide de poids moléculaire d'environ 1,2 KDa se retrouve dans le peptidoglycane de *Bordetella pertussis*. Cette cytotoxine permet l'inhibition de la synthèse de l'ADN et de la croissance de l'épithélium cilié. Elle permet aussi de détruire les cellules épithéliales trachéales in vitro. Aucune étude n'a démontré l'induction d'anticorps protecteurs anti-TCT.

(9) Une hémolysine.

(10) Une protéine de 69-KD dont la fonction est inconnue.

Une fois lysée par les défenses de l'organisme, la bactérie libère plusieurs substances comme: la toxine dérmonecrotique, la cytotoxine trachéale et l'adénylate cyclase qui contribuent à détruire les cellules ciliées, empêchent la régénération de l'épithélium respiratoire et donnent une infiltration cellulaire autour des bronchioles et des vaisseaux sanguins (qui constitue la lésion initiale de la maladie). Il en découle une irritation des cellules trachéobronchiques voire une nécrose, ce qui facilite la possibilité d'une surinfection virale ou bactérienne (Michel-Briand, 1989 ).

## **II. 5 Manifestations cliniques**

Après une période d'incubation de sept à dix jours apparaît une phase catarrhale de dix à quinze jours caractérisée par un catarrhe nasal et bronchique non spécifiques suivie de la phase d'état accompagnée d'une toux caractéristique. On appelle toux coqueluchoïde une toux convulsive s'accompagnant de cyanose du visage et d'apnée suivie d'une inspiration sifflante comparée au "champ de coq". Cette toux peut

persister plusieurs mois alors que la durée moyenne des quintes de toux est de cinquante-deux jours. Ces durées sont variables et peuvent aller de deux à cent-soixante-quatre jours selon l'étude de Jenkinson basée sur 500 cas de coqueluche évalués entre 1977 et 1992.

Cependant si la toux est souvent le signe le plus évocateur de la coqueluche, certains cas restent difficiles à diagnostiquer. La maladie, de gravité moyenne est plus sévère chez les nourrissons de moins d'un an et moins sévère chez les sujets immunisés. Elle touche davantage les enfants de moins de trois ans et les personnes adultes de sexe féminin, probablement en raison du contact avec les enfants (Jenkinson D, 1995).

## **II. 6 Transmission de la maladie**

C'est une maladie hautement contagieuse qui se transmet par voie aérienne, par les gouttelettes salivaires durant les premiers vingt et un jours de la maladie (jusqu'à 5 jours après la prise d'érythromycine). Le réservoir de la maladie reste les adolescents et les jeunes adultes. Le taux d'attaque de la maladie chez les personnes susceptibles varie de quatre-vingt-dix à cent pour cent dans la même famille et de cinquante

pour cent dans la même classe (April N et coll,1993).

## II. 7 Diagnostic clinique

Au Canada, on recommande d'utiliser les définitions suivantes pour la reconnaissance et la prise en charge des épidémies :

- "cas clinique : toux durant deux semaines ou plus ainsi qu'une ou plusieurs des manifestations suivantes: toux paroxystique, quintes aboutissant à des vomissements ou associées à une apnée et "chant de coq" inspiratoire en l'absence d'autre cause connue;
- cas confirmé : soit la confirmation par un laboratoire d'une infection par *Bordetella pertussis*, indépendamment des symptômes, soit un cas clinique ayant un lien épidémique avec un cas confirmé au laboratoire;
- cas soupçonné : toute toux paroxystique d'une certaine durée ou toux avec "chant de coq" inspiratoire ou quintes aboutissant à des vomissements ou a des nausées ou associées à une apnée, en l'absence d'autre cause connue" (RMTC, Vol. 20, pp.193-199, 1994).

L'OMS exige les critères de diagnostic suivants: toux avec quintes pendant plus de 21 jours avec culture positive et/ou réponse sérologique en Elisa et/ou contact avec un cas prouvé bactériologiquement (Grimperel E, 1995).

Le diagnostic de la coqueluche est d'abord clinique, mais la confirmation repose sur des examens de laboratoire ( nécessaires pour spécifier le type de Bordetella).

## **II. 8 Le diagnostic de laboratoire**

Il existe deux types de méthodes pour diagnostiquer la coqueluche : (1) les méthodes dites standards comme la culture et la sérologie et (2) les méthodes nouvelles

### **II. 8. 1 Les méthodes standards**

#### **II. 8. 1. 1 La culture**

Parmi les différents tests pour diagnostiquer la coqueluche, la culture demeure le seul test spécifique. Elle est considérée comme le "Gold standard". Pour l'analyse, deux types de prélèvements sont utilisés en culture :

- ❑ un écouvillon nasopharyngé, tampon d'alginate de calcium frotté dans la narine (le coton contient des acides gras qui inhibent la croissance des micro-organismes), acheminé dans un milieu de transport à base de charbon, le transport du prélèvement se fait à la température ambiante et non à 4 degrés celsius;
  
- ❑ aspiration nasopharyngée prélevée dans un flacon stérile. Pas de prélèvement sanguin puisque la bactérie ne passe pas à travers la muqueuse bronchique. L'utilisation des milieux sélectifs permet d'éliminer les bactéries de la flore nasopharyngée;

Trois conditions sont nécessaires pour augmenter les chances d'avoir une culture positive:

- (1) le prélèvement doit se faire le plus tôt possible dans la maladie;
  
- (2) l'utilisation d'un milieu de transport (qui permet une meilleure survie durant le transport) et l'ensemencement le plus tôt possible des spécimens;

- (3) l'utilisation d'un milieu de culture spécial : le milieu de Bordet Gengou enrichi au sang frais qui a l'avantage de montrer l'hémolyse par rapport au milieu Regan-Lowe.

La culture se fait sur une gélose au sang, un BG et un BG+, après une période de 24 à 48 heures d'incubation, on recherche une colonie avec hémolyse complète. Si colonie douteuse on repique sur BG et BG+ en CO<sub>2</sub> et GS en CO<sub>2</sub> avec une strie de staphylocoque (effet de satellisme normalement négative).

On conserve les milieux BG et BG+ pendant sept jours à 36 degrés Celsius. Actuellement il est préconisé d'allonger la période d'incubation jusqu'à 12 à 14 jours selon Katzko et coll. En effet pour une période d'incubation de 5 jours, 14 des 45 cultures (31%) de l'étude ont été faussement négatives. Pour un temps d'incubation de plus de 7 jours, seulement 8 des 45 cultures (18%) ont été faussement négatives, alors qu'au delà de 12 jours le risque de faux négatifs est considéré faible (Katzko et coll, 1996).

L'examen des boîtes se fait tous les jours à la recherche des colonies à croissance lente (tableau 1) :

- (a) on fait un gram qui nous montre des petits bâtonnets gram négatif;
- (b) on recherche les caractères biochimiques: oxydase, catalase, fermentation du glucose, nitrate, urée, citrate;
- (c) état frais: à la recherche de la mobilité; *Bordetella pertussis* (-), *Bordetella parapertussis* (-), *Bordetella bronchiseptica* (+);
- (d) agglutination avec des sérums spécifiques *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*.



**Tableau 1**  
**Identification**

	<b>Bordetella per- tussis</b>	<b>Bordetella para- pertussis</b>	<b>Bordetella bron- chiseptica</b>
<b>croît sur BG, BG + en</b>	<b>3 à 4 jours</b>	<b>1 à 2 jours</b>	<b>1 à 2 jours</b>
<b>G. sang en CO2</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Oxydase</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Catalase</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Glucose OF</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Urée</b>	<b>-</b>	<b>+ 24 hres</b>	<b>+ 4 hres</b>
<b>Nitrate</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Mobilité</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Citrate</b>	<b>-</b>	<b>+/-</b>	<b>+</b>

source: Martineau B. (1996)

## Principales caractéristiques de la culture

### Avantages :

- spécificité à 100%;
- permet d'étudier les souches, la sensibilité aux antibiotiques et de suivre leur évolution (Grimprel E, 1995);

### Inconvénients :

- ◆ même si le rendement est meilleur la première semaine, il n'atteint que 50 à 60% dans le meilleur des cas (Grimprel E, 1995);
- ◆ les chances d'avoir une culture positive sont plus élevées au début de la maladie jusqu'à 3 à 4 semaines du début de l'apparition des symptômes cliniques; après 6 semaines, seulement 15% à 20% des cas auront une culture positive (Onorato, Wasilak, 1987),

- ◆ nécessite un milieu spécial: BG, culture délicate et lente jusqu'à sept jours d'incubation,
- ◆ l'antibiogramme n'est pas nécessaire en routine (la bactérie est sensible à l'érythromycine) il est utilisé pour la recherche seulement (Lebel P, 1995),
- ◆ le coût du test uniquement est d'environ 15 \$, sans compter celui du personnel.

### **II. 8. 1. 2 Sérologie**

La méthode sérologique standard consiste en la détection d'anticorps produits contre *Bordetella pertussis* dans deux échantillons de sérum du malade obtenus à 4 semaines d'intervalle. Elle met en évidence une augmentation significative des anticorps, et se fait surtout dans un but épidémiologique (et non de diagnostic). Son intérêt survient plus tard dans la maladie, car la possibilité de détecter la bactérie par culture diminue progressivement durant l'évolution de cette infection (Hewlett EL, 1995).

La détection d'anticorps spécifiques à *Bordetella pertussis* est signifi-

tive d'infection ou de vaccination. Des techniques spécifiques utilisant des adhésines (FHA, PRN) et des toxines (toxine pertussique, adénylcyclase hémolysine) purifiées comme antigènes cibles ont été mises au point (Njamkepo E, 1995).

Les techniques immunologiques de mise en évidence des anticorps spécifiques à *Bordetella pertussis* les plus utilisées actuellement sont Élipa, Western-blot, agglutination :

- (i) "Elisa (Enzyme-Linked-immunosorbent-assay). C'est une technique développée pour le diagnostic sérologique de plusieurs maladies infectieuses, technique quantitative immunoenzymatique. Il existe par ailleurs plusieurs trousse commerciales pour évaluer qualitativement (et semi quantitativement) les anticorps IgG et/ou IgA contre *Bordetella pertussis* par Elisa en microplaque. Certaines détectent les IgG produits contre *Bordetella pertussis* après immunisation naturelle ou vaccinale. D'autres détectent les IgG et les IgA produits contre la toxine de pertussis (PT) et contre l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *Bordetella pertussis*.
- (ii) Western-blot : technique semi-quantitative d'immuno-

empreinte révélée par chimioluminescence (Njamkepo E, 1995).

- (iii) Réaction d'agglutination: les agglutinogènes de la surface de la bactérie (*Bordetella pertussis*) induisent la formation d'anticorps agglutinants (les agglutinines). Un taux élevé de ces anticorps est en corrélation avec une protection après une guérison ou une vaccination contre *Bordetella pertussis*. Ces "agglutinogènes" bactériens n'induisent pas toujours la formation d'agglutinines et plusieurs personnes qui n'ont pas ces anticorps semblent protégés.

La réaction d'agglutination, peu sensible, était la plus standardisée et la plus utilisée, pour la détection des anticorps vaccinaux. Les méthodes utilisant des suspensions bactériennes se sont avérées peu spécifiques. La faible détection d'anticorps, le faible niveau de sensibilité et le manque de réactifs commerciaux limitent l'étendue de cette technique en milieu hospitalier.

## Principales caractéristiques de la sérologie

### Avantages:

- sensibilité à 90 pour cent (supérieure à la culture);
- spécifique à 92 pour cent;
- elle est rapide et facile (en moins de quatre heures).

### Inconvénients:

- ◆ utilise deux sérums; à quinze jours d'intervalle;
- ◆ elle se fait tard dans l'évolution de la maladie;
- ◆ non standardisée.

### II. 8. 1. 3 Détection d'anticorps sécrétoires

*Bordetella pertussis* adhère à l'épithélium respiratoire, se multiplie, induisant ainsi une immunité locale sur la muqueuse du tractus respiratoire. La détection des IgA sécrétoires spécifiques à *Bordetella pertussis* produits à la suite d'une infection à *Bordetella pertussis* traduit une

infection récente et peut constituer une méthode de diagnostic de la coqueluche (Onorato, et Wassilak, 1987).

La présence d'IgA sécrétoires spécifiques à *Bordetella pertussis* a été confirmée dans les sécrétions nasopharyngées de 50% et 100% des patients avec culture positive 2 à 3 semaines et 4 à 12 semaines respectivement, de l'apparition des premiers symptômes (Onorato, et Wassilak, 1987). La détection des IgA sécrétoires spécifiques à *Bordetella pertussis* dans les sécrétions nasopharyngées, comme pour la recherche d'anticorps dans le sérum du malade doit se faire tard dans la maladie environ quatre semaines, quand la culture et l'IFD sont les deux négatives.

#### **II. 8. 1. 4 Contre-immunoélectrophorèse**

Cette méthode consiste en la détection directe de l'antigène bactérien par contre-immunoélectrophorèse à l'aide d'un anti-sérum spécifique, elle serait aussi sensible que la culture et doit se faire tôt dans l'évolution de la maladie.

Toutefois il a été constaté dans la pratique qu'aucune de ces techniques n'a montré à la fois une spécificité et une sensibilité élevée.

## **II. 8. 2 Les nouvelles méthodes**

### **II. 8. 2. 1 L'immunofluorescence directe sur lame**

C'est la détection de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis* dans les sécrétions ou aspirations nasopharyngées grâce aux anticorps monoclonaux de souris conjugués à la fluorescéine, qui maintenant domine, car les anti-sérums polyvalents se sont avérés non spécifiques, et c'est pourquoi la technique d'IFD avait été pratiquement abandonnée.

Par la même technique, on peut confirmer des colonies de *Bordetella* prélevées sur milieu de culture. Les mêmes ACMs sont utilisés pour la CMF.

Récemment Brodeur et coll. ont produit des ACMs marqués à la fluorescéine ayant une haute spécificité pour le lipooligosaccharide (LOS) de *Bordetella pertussis* et de *Bordetella parapertussis*. Ces ACMs n'ont pas démontré de réactions croisées avec d'autres micro-organismes de la flore normale du tractus respiratoire (Peppler, 1995). Ils s'avèrent utiles pour la détection rapide de *Bordetella pertussis* par immunofluorescence directe sur lame (Peppler, 1995). L'utilisation de la combinaison



culture et IFD peut augmenter la sensibilité du diagnostic au cours de cette maladie.

L'immunofluorescence directe sur lame, de plus en plus souvent utilisée, est rapide mais sa spécificité est encore discutée à cause du pourcentage élevé de faux positifs dus aux réactifs et à l'autofluorescence du mucus du tractus respiratoire (Halperin et coll. 1990) .

### **Principales caractéristiques de l'immunofluorescence directe**

#### **Avantages :**

- Spécificité: à 90% ( 5 à 10% de faux positifs selon la littérature);
- Rapide et facile;
- Elle permet de distinguer entre *Bordetella pertussis* et *Bordetella parapertussis*;
- Ne nécessite pas la présence de bactérie viable;
- Elle se fait tard dans l'évolution de la maladie et même chez les patients sous antibiotiques;

- Test peu coûteux (moins de 30\$);
- Plusieurs trousseaux sont commercialisés.

**Inconvénients :**

- ◆ Peu sensible à 60% plus ou moins 10%(Lebel P, 1995);
- ◆ Non standardisée, utilisée juste pour confirmer la culture ou pour un diagnostic présomptif;
- ◆ De faux positifs dus au mucus ou à des réactions croisées avec les autres bactéries de la flore normale du nasopharynx;
- ◆ Difficultés d'interprétation : les résultats dépendent beaucoup de l'expertise du personnel technique et nécessitent des ACMs de haute affinité.

**II. 8. 2. 2 ADN recombinant**

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis l'utilisation des sondes moléculaires pour l'identification des bactéries, des virus et autres

micro-organismes. Des sondes d'ADN pour l'identification de *Bordetella pertussis* ont été développées, utilisant des fragments d'ADN clonés d'une souche mutante déficiente en toxine pertussique. Ces sondes s'hybrident avec des séquences répétitives présentes dans le génome bactérien (*Bordetella pertussis*) mais avec seulement quelques fragments d'ADN de *Bordetella parapertussis* et de *Bordetella bronchiseptica*. D'autres codant pour la toxine pertussique, la FHA, ainsi que certaines séquences répétitives du génome bactérien ont été exploitées pour la première fois pour confirmer le diagnostic de la coqueluche chez des enfants suspectés d'avoir la maladie (Onorato, et Wassilak, 1987).

Certaines méthodes ont consisté à cloner au hasard des fragments du génome bactérien (*Bordetella pertussis*) afin d'identifier des séquences spécifiques de FHA, LPF et des protéines de la membrane externe (Onorato, et Wassilak, 1987).

### **Principales caractéristiques de l'ADN recombinant**

#### **Avantages:**

- Spécificité: 100% quand une seule séquence d'acide nucléique est utilisée (Onorato, et Wassilak, 1987);

- Sensibilité: au moins aussi sensible que la culture mais nécessite moins de temps (Reizenstein et coll, 1992).

#### **Inconvénients :**

- ◆ La sonde moléculaire ne permet pas de différencier les souches de *Bordetella* en raison de leur haut niveau d'homologie (Onorato, et Wassilak, 1987);
- ◆ Utilisée seulement pour le diagnostic et non pour des études épidémiologiques.

#### **II. 8. 2. 3 PCR (Polymerase chain réaction)**

Le principe du PCR repose sur la possibilité d'amplifier sélectivement une séquence d'ADN double brin in vitro par un cycle dénaturation-hybridation-extension en présence d'une ADN polymérase qui entraîne une duplication exponentielle de chacun des brins. Ceci permet d'augmenter très fortement la quantité d'ADN initiale (Métézeau P., 1994). Cette technique a connu de grands progrès ces dernières années. La mise au point récente d'amorces spécifiques à l'ADN de *Bordetella pertussis* permet la détection de la bactérie dans les prélèvements cli-

niques, écouvillons et aspirations nasopharyngées. Elle n'est pas standardisée mais certaines équipes la considèrent comme une méthode alternative chez les patients atteints de coqueluche après plusieurs semaines et dont les résultats de la culture restent négatifs.

Parmi les protéines cibles pour amorce Guiso et coll. ont retenu une partie de la séquence d'insertion répétée (IS. 481). Elle est détectable par hybridation en "dot-blot", et a donné les résultats suivants: parmi 36 aspirations nasopharyngées de sujets suspects de coqueluche, 10 étaient positifs en culture et en PCR, sur 17 qui étaient positifs en PCR seulement. Pour l'auteur, cette technique a une meilleure sensibilité que la culture avec une spécificité de 100%, elle est plus rapide mais la confirmation par un "dot-blot" est nécessaire. Il précise avoir obtenu une corrélation de 100% avec la technique de PCR utilisée dans une autre institution (Prével A, 1995).

### **Principales caractéristiques de la PCR**

#### **Avantages:**

- Très sensible à 100%;

- Spécifique: 100% (selon les amorces);
- Rapide (moins de 24 heures),

**Inconvénients:**

- ◆ Parfois trop sensible: donc de faux positifs;
- ◆ Non standardisée;
- ◆ Nécessite du matériel et du personnel spécialisés.

**II. 8. 2. 4 CHO (Chinese Hamster Ovary)**

La sensibilité des cellules ovariennes du hamster chinois à la toxine pertussique se traduit par un changement morphologique spécifique de ces cellules, ce principe a été utilisé comme moyen de diagnostic rapide de *Bordetella pertussis*.

D'autres tests similaires de cytotoxicité ont été développés auparavant pour la détection de la toxine du *Clostridium difficile* dans le diagnostic de la colite pseudo-membraneuse (Halperin et coll, 1990).

Les cellules ovariennes du hamster chinois sont sensibles à des faibles

quantités de toxine pertussique. Au picogramme près, l'effet cytopathique est spécifique à *Bordetella pertussis*. La présence d'autres microorganismes n'interfère pas avec l'effet cytotoxique produit par *Bordetella pertussis* (Halperin et coll, 1990).

D'après les auteurs de cette étude, ces essais de cytotoxicité pour la détection de la toxine pertussique dans des échantillons cliniques ou sur des cultures permettent de conclure que ce test est sensible, spécifique et rapide ce qui pourrait dans le futur augmenter la rapidité et la fiabilité des méthodes de diagnostic de la coqueluche. Ils précisent aussi que la culture reste le test standard par sa spécificité absolue, mais le délai est long et la sensibilité est faible (Halperin et coll, 1990).

#### **II. 8. 2. 5 Recherche de l'adénylate cyclase (Ac).**

La détection des produits spécifiques élaborés par *Bordetella pertussis* offre une autre approche de diagnostic rapide de la coqueluche, la présence de l'adénylate cyclase dans les prélèvements pourrait être un marqueur de l'infection.

L'adénylate cyclase catalyse la formation d'AMP cyclique à partir d'ATP en présence d'une protéine, la calmoduline. L'AMP cyclique est dosée

par une méthode immunoenzymatique ou de radiocompétition.

Une étude visant la recherche de cette toxine dans des prélèvements nasopharyngés a été publiée par Scheftel et coll. en comparaison avec la culture sur milieu de Bordet Gengou. L'étude menée sur 303 prélèvements de patients suspects de coqueluche dont 68% des enfants de moins d'un an, a donné 114 résultats positifs dont 26 positifs en culture à *Bordetella pertussis* et 2 positifs à *Bordetella parapertussis*, 5 négatifs avec culture positifs à *Bordetella pertussis*, pour une sensibilité de 93% et une spécificité de 91% (Scheftel JM, 1995).

#### **II. 8. 2. 6 Méthodes de typage moléculaire des bactéries**

Plusieurs méthodes d'épidémiologie moléculaire sont utilisées actuellement pour la caractérisation de souches responsables d'une épidémie et des souches vaccinales de *Bordetella pertussis*. Ces techniques sont basées sur la variabilité du génome bactérien à l'intérieur de chaque espèce de *Bordetella pertussis* :

- (i) la ribotypie: utilisée pour *Bordetella pertussis* dont le génome est stable, afin de comparer des souches endémiques d'origine géographique très différente. Elle ne décèle toute-



fois que des différences importantes. Il existe par ailleurs d'autres méthodes plus discriminantes;

- (ii) le sérotypage des isolats et des préparations vaccinales par agglutination sur lame avec des anti-sérums monospécifiques obtenus par absorption croisée et dirigée contre les trois principaux agglutinogènes de surface de *Bordetella pertussis*. Ceci a permis de distinguer trois sérotypes: type 1, 2, 3; type 1, 2; type 1, 3 (RHMC, Vol. 19, 1993. pp. 182-187);
- (iii) l'analyse par électrophorèse en champs pulsés (ECP) de fragments d'ADN chromosomique d'isolats. Cette technique est effectuée au Pertussis Reference Laboratory de l'University of Manchester, au Royaume-Uni (RHMC, Vol. 19, 1993, pp. 182-187). Cette méthode a permis de distinguer 15 génotypes différents parmi les isolats cliniques;
- (iv) P.C.R. en utilisant des amorces arbitraires (arbitrary primed polymerase chain reaction, APPCR).

Ces deux dernières méthodes sont utilisées dans le cadre d'une épidémie familiale ou pour étudier une contamination intra-hospitalière.

## **II. 9 Traitement et prévention**

### **II. 9. 1 Le traitement symptomatique**

- (a) Hospitalisation des enfants de moins de six mois pour surveillance respiratoire et cardiaque;
- (b) oxygénothérapie si nécessaire;
- (c) aspiration des sécrétions au besoin;
- (d) hydratation;
- (e) médicaments antitussifs, mycolytiques, antihistaminiques;
- (f) corticoïdes, dont l'indication est discutée, diminuent le nombre de quintes de toux et la durée d'hospitalisation (Lebel M, 1995).

### **II. 9. 2 Antibiothérapie**

Plusieurs antibiotiques sont actifs sur la bactérie tel que l'ampicilline, le co-trimoxazole mais l'érythromycine reste l'antibiotique de choix, parmi tous ses dérivés, l'estolate d'érythromycine serait le plus efficace en

raison de sa plus forte concentration dans le sérum et dans les liquides biologiques (April N, 1993). Récemment une souche de Bordetella pertussis résistante à l'érythromycine a été isolée chez un enfant de deux mois en Arizona (Mc.Nicol et coll, 1995).

On donne généralement l'érythromycine à raison de 40-50 mg par kg par jour ou 1-2 g pour les adultes par voie orale pendant 14 jours en dose fractionnée, le traitement permet d'éliminer Bordetella pertussis en trois à quatre jours après le début de la prise médicamenteuse et diminue la durée de la maladie ainsi que le risque de transmission.

### **II. 9. 3 Prophylaxie**

C'est le même antibiotique à raison de 40 à 50 mg par kg par jour ou 1g pour les adultes pendant 10 jours.

### **II. 9. 4 Prévention de l'infection**

Il est conseillé aux patients présentant une coqueluche d'arrêter de fréquenter une garderie ou une école afin de limiter la transmission de la maladie jusqu'à cinq jours après le début de la prise d'antibiotique ou jusqu'à trois semaines après le début de la maladie.

On prescrit l'érythromycine pour les personnes au contact avec le patient durant la phase contagieuse et quand le délai entre le début du contact et le moment de l'intervention est moins de 14 à 21 jours.

L'immunité passive à l'aide d'immunoglobuline ne s'est pas démontrée efficace pour la prévention. L'immunité transmise par la mère au nouveau né ou via le lait maternel est en effet faible ou nulle.

### **II. 9. 5 Le vaccin**

La vaccination complète de tous les enfants reste le moyen de prévention de la coqueluche le plus efficace. Le vaccin anticoquelucheux (vaccin cellulaire), parmi les premiers vaccins offerts au Canada en 1943, est préparé à partir de *Bordetella pertussis* inactivé par la chaleur et adsorbé sur hydroxyde d'aluminium.

Le comité consultatif national de l'immunisation recommande l'administration du vaccin contre la diphtérie, la coqueluche et le tétanos (DCT) aux enfants à l'âge de 2, 4, 6 et 18 mois pour la série primaire, suivie d'une dose de rappel entre 4 et 6 ans.

Un vaccin acellulaire, serait mieux toléré que le vaccin entier, a été utilisé pour la première fois au Japon en 1980 après deux décès à la suite

d'une injection de vaccin entier. Il est constitué de un ou plusieurs antigènes de virulence. Aux États-Unis, le vaccin acellulaire est administré pour le dernier rappel. Actuellement un vaccin acellulaire associé aux anatoxines diphtériques et tétaniques (DtaPvaccines) est autorisé au Canada pour la quatrième et la cinquième dose chez les enfants âgés de quinze mois ou plus.

Le vaccin acellulaire, recommandé par le comité consultatif national de l'immunisation canadien, est selon des études récentes, mieux supporté, plus sécuritaire et plus efficace, tout en permettant de se combiner aux autres vaccins (Halperin S, 1996).

D'après les résultats d'une étude auprès d'enfants vivants dans un foyer où il y avait un cas de coqueluche, les vaccins classiques utilisés actuellement conféraient une protection de 63% contre l'infection avec toux légère, de 95% contre les formes graves et de 96% contre les cas d'infections bénignes ou graves confirmés par culture (RMTC, Vol. 19, 1993, pp. 182-187).

Cette protection partielle soulève plusieurs questions: le vaccin perd-il de son efficacité? Le taux de vaccination de la population est-il adé-

quat, ou serait-il responsable de cette protection partielle? La cause de cette protection partielle est encore mal élucidée, mais des données préliminaires semblent indiquer que l'efficacité du vaccin entier n'atteint pas les taux de 80 à 85% (RMTC, Vol. 21, 1995, pp. 45-48).

Parmi plusieurs facteurs probablement impliqués, quatre hypothèses sont particulièrement explorées :

- (i) des changements d'une forme de vaccin liquide à une forme adsorbée (RMTC, Vol. 21, 1995, pp. 45-48);
- (ii) les perturbations causées dans la chaîne de froid (RMTC, Vol. 19, 1993, pp. 33-38);
- (iii) des modifications au niveau de la bactérie;
- (iv) la diminution de l'efficacité du vaccin pourrait être attribuable à un changement de souches dominantes en circulation par rapport aux souches vaccinale (RMTC, Vol. 19, 1993, pp. 182-187).

### III. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Notre objectif est de comparer les résultats obtenus par cytométrie en flux à la culture, l'IFD et la PCR, afin d'établir avec plus d'exactitude la spécificité et la sensibilité de cette technique de diagnostic rapide. L'analyse comparative porte sur un échantillon de mille cent (1100) prélèvements (écouvillons et aspirations nasopharyngés) faits en culture et en CMF. La comparaison des résultats de l'analyse par cytométrie, PCR et IFD portera sur les cent premiers spécimens qui ont pu être analysés.

Les anticorps nous ont été fournis gracieusement par le docteur Bernard Brodeur du Laboratoire National d'Immunologie à Ottawa. Le docteur R. Irvin du Département de microbiologie médicale et maladies infectieuses de l'Université d'Alberta à Edmonton a procédé gracieusement lui aussi à l'analyse par PCR de 100 spécimens. La lecture par microscopie à fluorescence a été réalisée pour les mêmes spécimens par l'équipe du docteur Brodeur et ce à l'insu des résultats de la culture qui ont été réalisés au Laboratoire de microbiologie et immunologie de l'hôpital Sainte-Justine.

## **III. 1 La Cytométrie en Flux (CMF)**

### **III. 1. 1 Historique**

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse cellulaire de haute précision. Utilisant une source lumineuse monochromatique (laser) interceptant les cellules à analyser dans une gaine liquidienne en flux laminaire. Plusieurs auteurs (Shapiro, Darzynkiewicz, Steen), s'accordent pour dire qu'elle est fiable et permet en un temps très court d'étudier simultanément plusieurs paramètres d'un grand nombre de cellules ou d'événements.

En 1934, Moldavan a conçu le premier appareil de numération cellulaire en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photoélectrique. Coulter met au point en 1949 un compteur permettant d'énumérer les globules rouges et de mesurer leur taille par la variation de leur résistance (impédance) électrique. Quelques années plus tard, en 1953, Crosland et Taylor eurent l'idée d'injecter lentement des cellules en suspension au centre d'une veine liquide plus rapide qui les entraîne, les centre et les aligne (le flot laminaire). Des améliorations importantes seront apportées sur les appareils en 1965 par Kawentsky grâce auxquelles il devient possible de



mesurer deux paramètres simultanément sur la même cellule et à une vitesse de 500 cellules par seconde. Ces deux paramètres sont la taille corrélée avec l'intensité de la lumière diffusée à petit angle et la quantité d'ADN et d'ARN obtenue en mesurant l'absorption de la lumière ultraviolet par les acides nucléiques.

En 1969 Van Dilla adopte le laser comme source lumineuse d'excitation. Ceci permettra d'avoir une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation et une stabilité du chromatisme.

En 1972 Hulett et collaborateurs publient les résultats de leurs travaux de trie cellulaire réalisés par "Fluorescence Activated Cell Sorter" (FACS) dans lequel ils utilisent la déflexion des gouttelettes chargées électriquement et déviées par un champ électrique afin d'obtenir des sous populations cellulaires pures.

Actuellement, plusieurs appareils basés sur les mêmes principes permettent l'analyse individuelle, précise, quantitative, rapide des cellules et des particules cellulaires et subcellulaires.

### **III. 1. 2 Le principe de la cytométrie en flux**

Le principe de la CMF repose sur l'utilisation des marqueurs fluores-

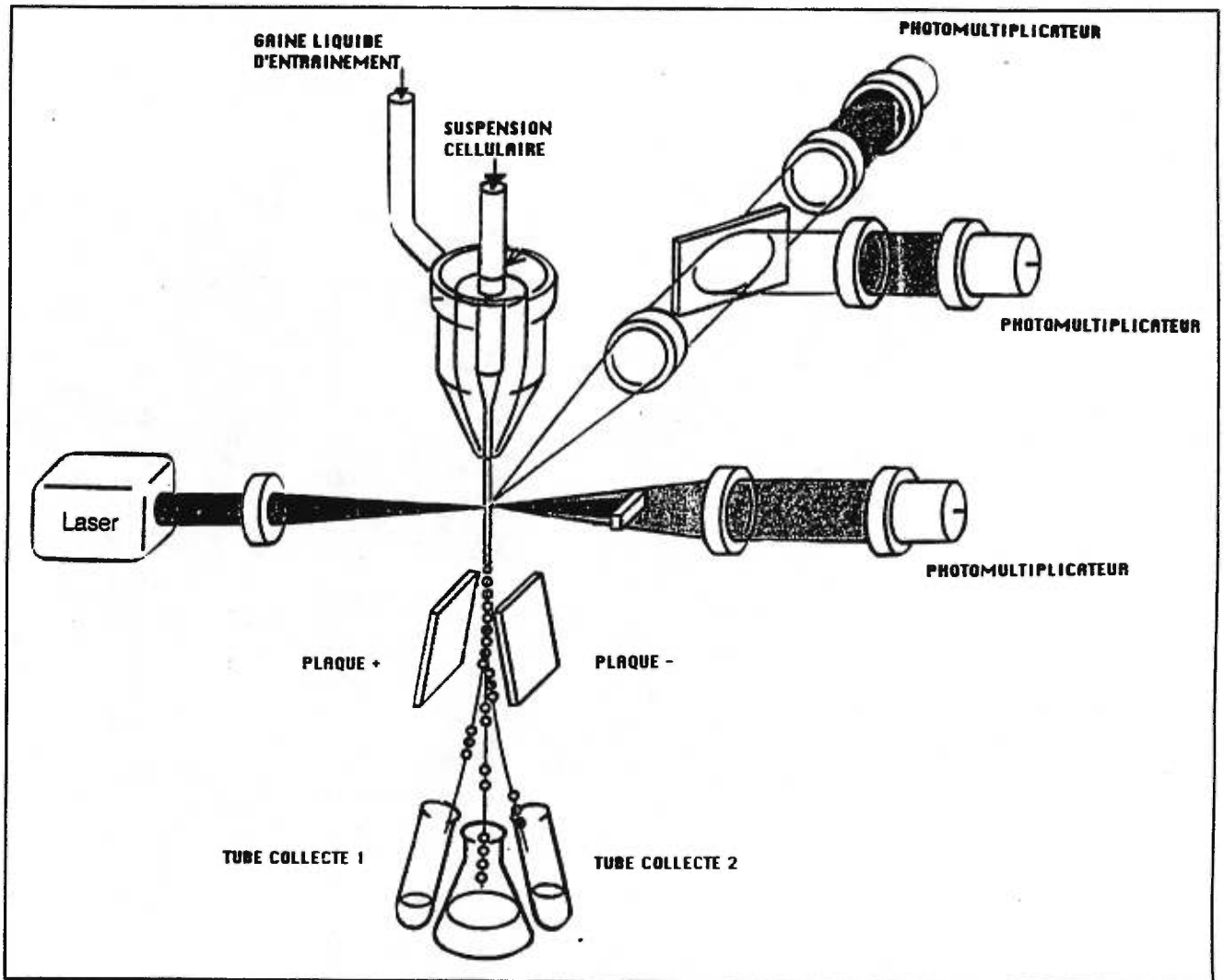
cents ou fluorochromes, permettant de reconnaître et mesurer des constituants cellulaires, des activités enzymatiques, ou la viabilité cellulaire. Ces fluorochromes émettent une lumière d'une certaine longueur d'onde lorsqu'ils sont excités par une lumière d'une longueur d'onde différente (plus énergétique). En plus de la fluorescence il est possible de mesurer la lumière diffractée par les cellules. Cette lumière diffractée reflète des paramètres physiques comme la morphologie ou la taille cellulaire selon l'angle de diffraction :

- (i) sous un petit angle: inférieur à dix degré (FSC = Forward Scatter), l'intensité de la lumière diffractée varie avec la taille de la cellule;
- (ii) sous un angle plus grand (SSC = Side Scatter), la valeur de l'intensité de la lumière réfractée et réfléchiée est fonction de la granularité interne de la cellule, qui elle est dépendante de la réfringence du cytoplasme, la présence de granulations, et le rapport nucléocytoplasmique (Métézeau P, 1994).

Les échantillons à analyser doivent se présenter sous forme d'une suspension de particules isolées ayant une concentration variant entre

$5 \cdot 10^4$  et  $10^7$  cellules par millilitre. La concentration dépend du type de cellule, de l'échantillon et de l'événement à analyser. Chaque point représente un seul événement, et chaque point est généré par une seule particule. La nature de cette particule est soit une cellule intacte, une cellule abîmée, un noyau isolé ou un débris quelconque (Greimers G,1990).

Figure 3  
Les principales caractéristiques du cytomètre



Source : Métzéau (1994)

### III. 1. 3 Le cytomètre utilisé

Les échantillons furent analysés sur le cytomètre à flux FACScan (Becton Dickinson) équipé d'un laser Helium Néon à 488 nm refroidi à l'air. Cette longueur d'onde couramment employée permet l'excitation de nombreux fluorochromes dont l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui est la molécule habituellement couplée aux anticorps monoclonaux. Un colorant intercalaire de l'ADN, l'iodure de propidium (IP) peut-être utilisé pour quantifier simultanément les acides nucléiques ADN et ARN. Dans notre étude la FITC a été utilisée conjointement à l'IP pour étudier simultanément une protéine membranaire qui est l'antigène (lipopolysaccharide de Bordetella) et l'acide nucléique. L'iodure de propidium permet de différencier les bactéries des débris. Ces deux fluorochromes sont excités à 488 nm (lumière bleue-verte). Ils émettent respectivement une fluorescence verte (FITC) [FL1=Fluorescence line 1] et rouge (IP) [FL2 = Fluorescence line 2] qui seront sélectivement filtrées et analysées.

### III. 2 L'échantillon

Les spécimens ont été recueillis auprès d'un échantillon de mille cent (1100) enfants examinés à l'hôpital Sainte Justine de Montréal et suspects de coqueluche. Les prélèvements ont été effectués entre les mois d'avril 1994 et d'août 1995.

Une première analyse de ces échantillons cliniques a été effectuée au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Sainte-Justine. Elle a consisté en la recherche de *Bordetella* par culture. Les aspirations nasopharyngées sont déposées dans des flacons stériles alors que les écouvillons nasopharyngés faits de tampon d'alginate de calcium frotté dans la narine sont conservés dans un milieu de transport au charbon activé à la température ambiante.

À notre demande, ces mêmes 1100 échantillons, une fois ensemencés sur des milieux de culture, sont récupérés et classés pour être analysés par cytométrie en flux et pour l'immunofluorescence sur lame, à l'insu des résultats de la culture. Cent spécimens ont été acheminés au laboratoire du docteur Pepler pour la recherche de *Bordetella pertussis* par PCR.

### III. 3 Les réactifs

- (1) solution tampon: PBS;
- (2) anticorps monoclonaux anti-Bordetella pertussis et anti-Bordetella parapertussis marqués à FITC, dilués tous les deux (1/25);
- (3) iodure de propidium: cinq mg pour deux cc de PBS;
- (4) sérum normal de souris;
- (5) suspension de Bordetella pertussis et de Bordetella parapertussis Mac Farlan 0.5 diluée à un sur cent (1/100);
- (6) grille de Nylon (Nytex 40 MESH);
- (7) une lame pour chaque spécimen type Becton Dickinson numéro 3032 pour immunofluorescence;
- (8) tube 12 ( 75 mm Falcon 2008 pour FACS can), un minimum de quatre tubes pour le premier spécimen et deux tubes pour les autres.

Vu les rares cas d'association de Bordetella pertussis et de Bordetella

parapertussis (un à 3 pour mille) dans le même spécimen et pour réduire le coût de la technique on prend le parapertussis comme témoin négatif du pertussis et le pertussis comme témoin négatif du parapertussis.

### **III. 4 Préparation des spécimens**

- (1) On commence par inscrire le nom du patient, le numéro et le type de prélèvement;
- (2) on met cinq cent microlitres de PBS dans le premier tube, on enlève la tige du milieu de transport qu'on met dans le tube contenant du PBS (pour écouvillons nasopharyngés) et dans un tube sans PBS (pour l'aspiration nasopharyngée);
- (3) on agite au vortex;
- (4) on filtre sur grille de Nylon pour enlever les débris qui bloqueraient la tubulure de l'appareil;
- (5) on ajoute dix microlitres de sérum normal de souris pour bloquer les sites d'absorption non spécifiques et on incube pendant dix minutes à température ambiante;



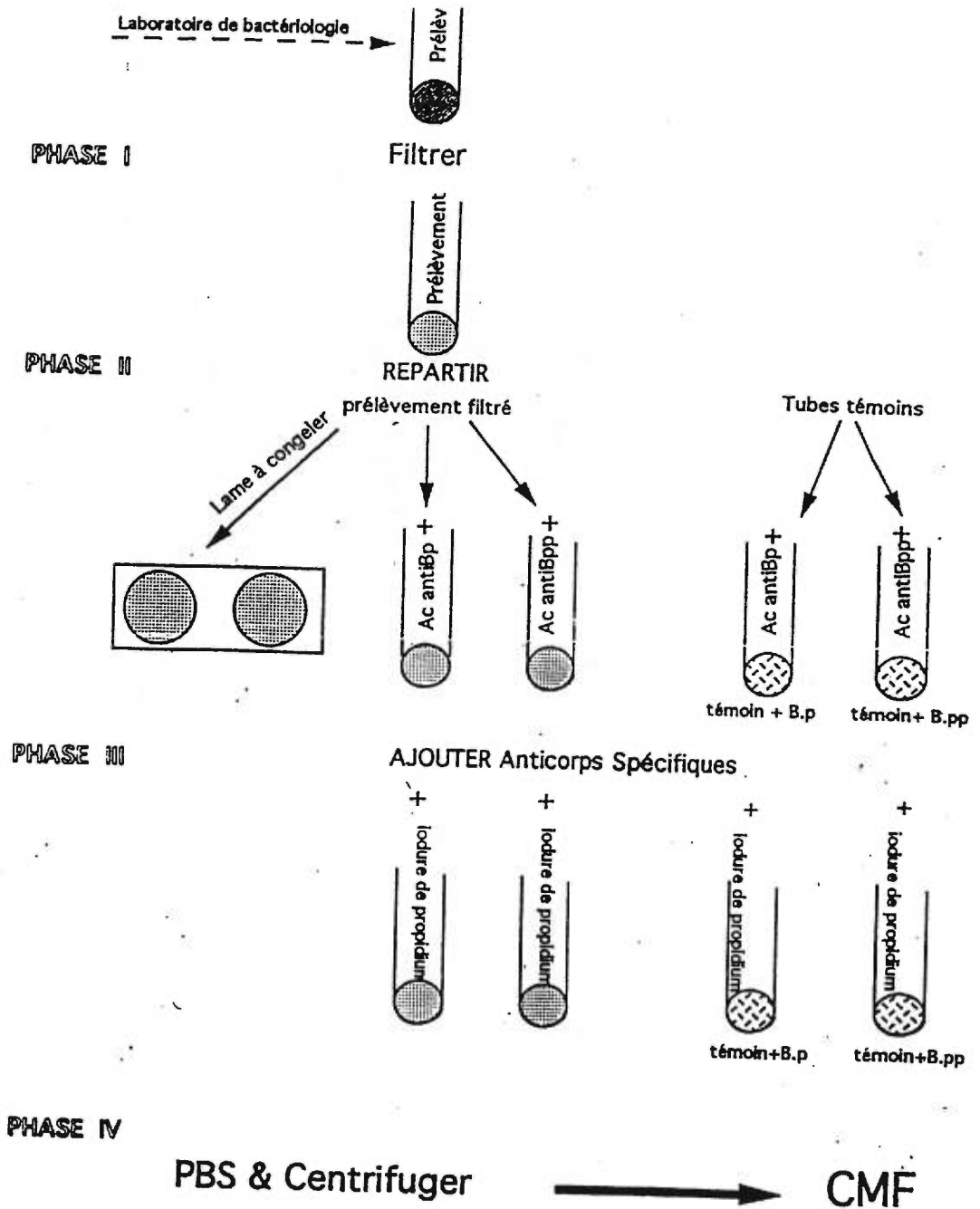
- (6) on dépose cent microlitres de notre solution dans le tube marqué *Bordetella pertussis* et cent microlitres dans le tube marqué *Bordetella parapertussis*, et cinquante microlitres sur la lame, qui une fois séchée, sera congelée et envoyée dans une boîte en plastique bien scellée au laboratoire LCDC pour l'immunofluorescence directe et pour l'analyse par PCR;
- (7) on ajoute vingt-cinq microlitres d'anticorps anti-*Bordetella pertussis* dans le tube marqué *Bordetella pertussis* et dans le tube témoin positif *Bordetella pertussis*;
- (8) on ajoute vingt microlitres d'anticorps anti-*Bordetella parapertussis* dans le tube marqué *Bordetella parapertussis* et dans le tube témoin positif *Bordetella parapertussis*;
- (9) on laisse agir pendant vingt minutes à température ambiante à l'obscurité (pour ne pas affecter les anticorps marqués par la lumière);
- (10) on ajoute trois gouttes d'iodure de propidium et on laisse agir pendant dix minutes à température ambiante;
- (11) on ajoute deux millilitres de PBS;

(12) on centrifuge à 1200G/5mn;

(13) on enlève le surnageant;

(14) on garde le culot pour l'analyse au CMF.

**Figure 4**  
**Les phases d'analyse**



### III. 5 Calibrage et ajustement de l'appareil

Les données sont recueillies en "mode liste" et analysées à l'aide du logiciel Lysys (Becton Dickinson), une fenêtre d'intérêt (gate) est déterminée.

Pour l'ajustement des paramètres de l'appareil FACScan on introduit le tube contrôle non marqué (tube 1), le tube contenant les bactéries marquées à l'iodure de propidium (tube 2) puis les tubes témoins *Bordetella pertussis* (tube 3) et *Bordetella parapertussis* (tube 4) dans le cytomètre.

Les données FSC, SSC, FL1 et FL2 sont accumulées en échelle logarithmique pour différencier les bactéries des débris, on délimite une première zone à étudier sur les paramètres marqués à l'IP en FSC vs FL2 (taille vs fluorescence rouge), c'est ce qu'on appelle fenêtre bi-paramétrique, en identifiant les particules contenant des acides nucléiques marquées en rouge par l'iodure de propidium (par comparaison des tubes 1 et 2).

Le contrôle positif (*Bordetella pertussis*, tube 3) sert à délimiter une deuxième zone d'intérêt en FL1 où l'on identifie le *Bordetella pertussis*

marqué en vert.

On commence par lire les tubes en SSC vs FL1 (granularité vs fluorescence verte) et FSC vs FL1 (taille vs fluorescence verte). Les données sont accumulées sur 2000 éléments de la zone d'intérêt pour les prélèvements nasopharyngés, et sur 10,000 pour les sécrétions nasopharyngées car elles contiennent beaucoup plus de particules.

Pour l'analyse on fixe nos marqueurs sur les témoins positifs, on délimite une zone de positivité en respectant les critères de positivité. Une zone est considérée positive si:

1. elle est hors de l'axe d'autofluorescence (l'autofluorescence augmente en fonction de la taille);
2. il y a un gain minimum en FL1 d'au moins cinq fois l'autofluorescence de base (gain différentiel par rapport à l'autofluorescence). En modifiant ce paramètre on modifie la spécificité du test;
3. il existe au moins 95% des éléments positifs du contrôle positif (les particules ou événements positifs doivent

avoir les mêmes caractéristiques que le contrôle positif);

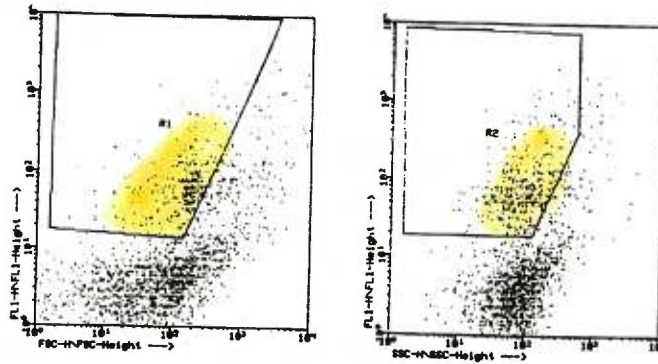
4. il existe cinq fois plus de points dans cette zone que celui du contrôle négatif (pour augmenter la spécificité on demande qu'il y ait nettement plus d'événements positifs avec les caractéristiques recherchées que d'événements aléatoires avec les mêmes caractéristiques). En modifiant ce paramètre, on modifie la sensibilité du test.

### **III. 6 Interprétation des résultats**

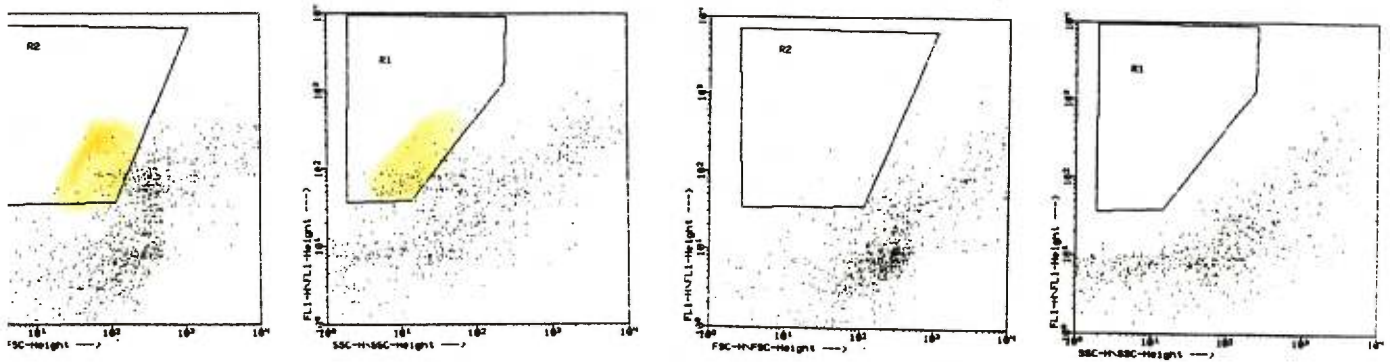
Une fois l'analyse par CMF complétée, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus par culture. Les résultats discordants (positif en culture et négatif par CMF ou négatif en culture et fortement positif en CMF) font l'objet d'une seconde analyse par CMF pour vérifier les résultats obtenus. Ces derniers sont reportés dans un tableau comparatif alors que certains ont été carrément éliminés à cause de l'absence des résultats de la culture ou en raison d'une difficulté dans la technique du CMF.

Figure 5

Exemple de résultats (B. pertussis) négatif / positif



Témoïn positif (B.pertussis)



Résultat positif (B.pertussis)

Résultat négatif (B.pertussis)



Nos résultats sont interprétés selon les critères de positivité préalablement choisis sur une base expérimentale en utilisant des bactéries de culture. Voici les repères utilisés pour la lecture des résultats obtenus:

- **Résultat négatif**: si absence de point dans la zone de positivité;
- **Résultat positif** : si le nombre de point dans la zone de positivité est au moins cinq fois plus important que le nombre de point dans celle du contrôle négatif (les événements non spécifiques ayant les mêmes caractéristiques).
- **Résultat douteux** : si le nombre de point est inférieur au minimum requis pour être interpréter positif et supérieur au bruit de fond du contrôle négatif.

Nous avons aussi introduit des nuances dans l'interprétation de nos résultats positifs qui sont classés selon la typologie suivante:

- **Faiblement positifs** : + ( moins de vingt événements),
- **Moyennement positifs** : ++ ( plus de vingt événements),
- **Fortement positifs** : +++ (indénombrables).

## IV. RÉSULTATS

### IV. 1 Résultats des cent premiers prélèvements

Dans le tableau (2) nous avons regroupé les résultats des cent premières lames. En raison du coût élevé des tests de PCR, seules les cent premières lames parmi les mille cent de notre échantillon ont pu être analysées selon les quatre méthodes prévues au départ.

**Tableau 2**  
**Résultats des quatre tests**

Résultats des tests	Culture	CMF	Immunofluorescence	PCR
<b>Positif</b>	13	14	36	15
<b>Négatif</b>	87	85	52	75
<b>Total</b>	100	99*	88**	90***

\*un échantillon non analysé, \*\* pas d'échantillon, \*\*\* non amplifiés

## IV. 2 Résultats des mille cent prélèvements

Dans le tableau (3), nous avons d'abord transcrit l'ensemble des résultats (culture et CMF) sans distinction du type de prélèvement. Une nuance sera introduite par la suite (tableau 4 (a) et 4 (b), afin de déceler s'il existe une relation entre la variation de la sensibilité spécificité en fonction de la nature du prélèvement.

**Tableau 3**  
**Cytométrie/Culture (1100 prélèvements)**

	<b>CMF (pos.)</b>	<b>CMF (nég.)</b>	<b>Total</b>
<b>Culture (pos.)</b>	89	54	143
<b>Culture (nég.)</b>	126	816	942
<b>Total</b>	215	870	1085*

\*15 spécimens discordants

**Tableau 4 (a)**  
**Écouvillons nasopharyngés**

	<b>CMF (pos.)</b>	<b>CMF (nég.)</b>	<b>Total</b>
<b>Culture (pos.)</b>	66	45	111
<b>Culture (nég.)</b>	93	631	724
<b>Total</b>	159	676	835

**Tableau 4 (b)**  
**Aspirations nasopharyngées**

	<b>CMF (pos.)</b>	<b>CMF (nég.)</b>	<b>Total</b>
<b>Culture (pos.)</b>	23	9	32
<b>Culture (nég.)</b>	33	185	218
<b>Total</b>	56	194	250

### **IV. 3 Concordance vs discordance des résultats**

#### **IV. 3. 1 CMF et culture(mille cent prélèvements)**

##### **IV. 3. 1. 1 Tout prélèvement confondu**

Comme le montre le tableau (5), il existe une concordance parfaite de 83,41% des résultats qui se répartit comme suit:

- CMF positive et culture positive** : 89 spécimens sur 1100 soit 8,21%;
- CMF négative et culture négative** : 816 sur 1100, soit 75,20%.

Il existe une concordance parfaite de 83,41% et on note 15 spécimens discordants.

Tableau 5

## Concordance CMF / Culture (1100 prélèvements)

Concordance/Discordance	Résultats
CMF (+) Culture (+)	89
CMF (+) Culture (-)	126
CMF (-) Culture (+)	54
CMF (-) Culture (-)	816*
<b>Total</b>	<b>1085*</b>

\*15 spécimens indéterminés.

#### IV. 3. 1. 2 Selon le type de prélèvement

##### (a) Écouvillons nasopharyngés

- CMF positive et culture positive** : une concordance de 66 spécimens sur un échantillon de 845 soit 7,81%.
- CMF négative et culture négative** : une concordance de 638 spécimens sur un échantillon de 845 soit 75,50%.

Une concordance totale de 83,31%.

**Tableau 6**  
**CMF / Culture (écouvillons nasopharyngés)**

Concordance/Discordance	Résultats
CMF (+) Culture (+)	66
CMF (+) Culture (-)	95
CMF (-) Culture (+)	46
CMF (-) Culture (-)	638
<b>Total</b>	<b>845</b>

**(b) Aspirations nasopharyngées**

- CMF positive et culture positive** : une concordance de 23 cas sur un échantillon de 255 soit de 9,02%,
- CMF négative et culture négative** : une concordance de 189 cas sur un échantillon de 255 soit 74,12%,

Une concordance totale de 83,14%.

**Tableau 7**  
**CMF / Culture (aspirations nasopharyngées)**

<b>Concordance/Discordance</b>	<b>Résultats</b>
<b>CMF (+) Culture (+)</b>	23
<b>CMF (+) Culture (-)</b>	34
<b>CMF (-) Culture (+)</b>	9
<b>CMF (-) Culture (-)</b>	189
<b>Total</b>	255



#### IV. 3. 2 CMF et culture (cent prélèvements)

- CMF positive et culture positive** : une concordance de 4 spécimens sur 99, ce qui correspond à 4%;
- CMF négative et culture négative** : une concordance de 76 spécimens sur 99 soit 76,77%;

Une concordance parfaite de 80,81%.

**Tableau 8**  
**CMF - Culture (100 prélèvements)**

Concordance/Discordance	Résultats
<b>CMF (+) Culture (+)</b>	4
<b>CMF (+) Culture (-)</b>	10
<b>CMF (-) Culture (+)</b>	9
<b>CMF (-) Culture (-)</b>	76
<b>Total</b>	99*

\* 1 cas indéterminé

#### IV. 3. 2. 1 Culture / PCR / IFD (cent prélèvements)

- ❑ **Culture positive / PCR positive** : une concordance de 7 cas sur 90, soit 7,78%.
- ❑ **Culture négative / PCR négative** : une concordance de 69 cas sur 90, soit 76,76%.

Une concordance parfaite de 84,44% et 10 spécimens douteux.

**Tableau 9**  
**Culture- PCR**

Concordance/Discordance	Résultats
Culture (+) PCR (+)	7
Culture (-) PCR (+)	8
Culture (+)PCR(-)	6
Culture (-) PCR(-)	69
<b>Total</b>	<b>90</b>

- Culture positive et IFD positive:** une concordance de 6 cas sur 88 soit 6,82%
  
- Culture négative et IFD négative:** une concordance de 47 sur 88 soit 53,41%

Une concordance parfaite de 60,23%.

**Tableau 10**  
**Culture / IFD**

<b>Concordance/Discordance</b>	<b>Résultats</b>
<b>Culture (+) IF (+)</b>	<b>6</b>
<b>Culture (+) IF (-)</b>	<b>5</b>
<b>Culture (-) IF (+)</b>	<b>30</b>
<b>Culture (-) IF (-)</b>	<b>47</b>
<b>Total</b>	<b>88</b>

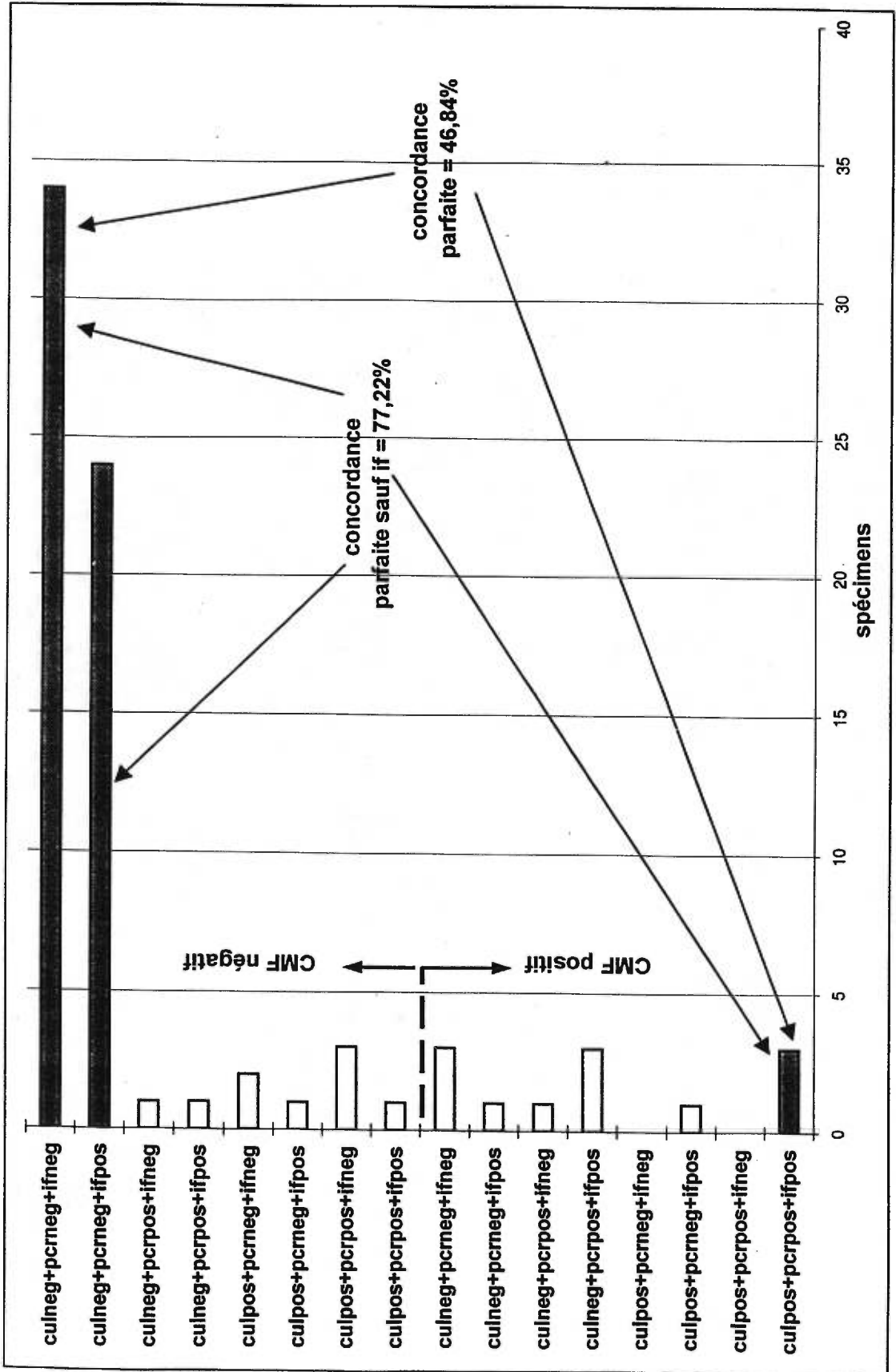
#### **IV. 4 Sommaire des résultats**

Nous avons une meilleure appréciation de la concordance des résultats, en comparant seulement les résultats de la culture, CMF et PCR. C'est à dire en isolant ceux de l'IFD qui donnent un taux élevé de faux positifs. On a aussi noté que le niveau de concordance est plus élevé pour les mille cent que pour les cent premiers spécimens. Ce qui justifie par ailleurs notre option pour un échantillon plus important.

La figure (6) montre qu'il existe une concordance parfaite de 46,84% des résultats (culture, CMF, PCR et IFD), ce taux augmente à 77,22% si l'on retire de la comparaison les résultats obtenus à partir de l'IFD.

Figure 6

Concordance vs discordance CMF / Culture, IFD, PCR



## V. DISCUSSION

### V. 1 Sensibilité et spécificité de la cytométrie

Dans notre étude on ne peut pas calculer exactement la sensibilité/spécificité<sup>1</sup> de la CMF puisqu'on ne connaît pas l'état du malade mais seulement les résultats de sa culture donc on ne peut calculer la sensibilité et la spécificité de la cytométrie que par rapport à la culture, c'est à dire :

- probabilité (cytométrie positive/culture positive)
- probabilité (cytométrie négative/culture négative)

Cependant, étant donné qu'on dispose (du moins approximativement) de la prévalence de la coqueluche dans l'échantillon ainsi que de la sensibilité et de la spécificité de la culture, on peut utiliser ces informations pour améliorer nos calculs. Plus précisément selon Thibodeau (1981), on trouve des formules où la "vraie" sensibilité/ spécificité (telle

---

<sup>1</sup> sensibilité = probabilité (cytométrie positive / malade)  
spécificité = probabilité (cytométrie négative / non -malade)

que donnée par la définition) s'exprime comme fonction de la sensibilité/spécificité par rapport à la culture, de la sensibilité et de la spécificité de la culture ainsi que de la prévalance de la maladie<sup>2</sup>.

En appliquant les facteurs de correction, nos résultats montrent que malgré l'utilisation des spécimens (écouvillons nasopharyngés surtout) une fois la culture faite et qui sont probablement vidés en partie de leur contenu, la sensibilité de la CMF serait légèrement supérieure à celle de la culture.

- prévalance de la maladie = 30 à 40%
- sensibilité de la culture = 40% ou 60%
- spécificité de la culture = 100%

Selon les corrections de Thibodeau: pour les prélèvements nasopharyngés la sensibilité est égale à 59,5%, la spécificité 87,2%. Avec correction, la sensibilité est égale 59,5% et la spécificité est de 99% (si sensibilité de la culture = 40%) et 95% (si la sensibilité de la culture = 60%).

---

<sup>2</sup> sans correction = par rapport à la culture; avec correction = utilisant les formules de Thibodeau

Les sensibilités avec et sans correction sont les mêmes puisque la spécificité de la culture étant de 100%. Ainsi pour les nasopharyngés, sur les 111 cultures positives la cytométrie en détecte 66, pour une sensibilité de 59,5%. Puisque la sensibilité de la culture n'est pas parfaite, sur les 724 ayant une culture négative, il existe un certain pourcentage de faux négatifs. On peut l'estimer en utilisant les formules de Thibodeau (1981).

## **V. 2 Une variation selon le type de prélèvement**

On note une différence de sensibilité selon le type de prélèvement comme l'indiquent les tableaux 4 (a) et 4 (b). Pour les aspirations nasopharyngées la sensibilité est de l'ordre de 70%, alors que pour les écouvillons nasopharyngés (lesquels la culture a été faite au préalable), elle est de 60%. La spécificité est de 84.9% sans correction, et de 99% (si la sensibilité de la culture est de 40%), et de 95% (si la sensibilité de la culture est de 60%). Cette différence pourrait s'expliquer par la séquence des évaluations. Là encore, il est possible que certains spécimens positifs à la culture soient négatifs en cytométrie à cause d'une absence de bactéries en seconde évaluation (CMF). Pour une culture positive, il suffit d'une seule colonie, alors que pour une CMF positive il



faut au moins cinq fois le bruit de fond.

Le fait que cette situation se présente plus souvent avec les écouvillons nasopharyngés pourrait expliquer la différence observée et indiquer que la vraie sensibilité est probablement plus de l'ordre de 70% pour les aspirations nasopharyngées et de l'ordre de 60% pour les écouvillons.

### **V. 3 Récapitulation**

Bien qu'il existe un taux de concordance élevé entre la CMF et la culture (1100 spécimens) d'une part et la CMF et les autres tests (100 spécimens) d'autre part, la mesure de la spécificité et de la sensibilité de la CMF par rapport à la culture nous montre que les résultats dépendent largement de l'état des échantillons et du type de spécimen à analyser.

Nous avons vu que, nonobstant le fait d'avoir travaillé sur des échantillons manipulés une première fois pour les besoins de la culture et qui étaient probablement vidés de leurs contenus sur les géloses, la CMF a atteint une sensibilité supérieure à la culture (70% pour les aspirations

nasopharyngées et 60% pour les écouvillons). La spécificité pour les deux types de spécimens est estimée à 99%. Des débris de charbon présents dans le milieu de transport (écouvillons) ou du mucus dans les aspirations nasopharyngées conduiraient parfois à des résultats faussement positifs. Ce problème a été en bonne partie contourné en filtrant soigneusement les échantillons cliniques, les réactifs et le liquide d'entraînement du cytomètre. Les résultats faussement négatifs pourraient être expliqués par le faible nombre de bactéries sur les échantillons analysés. L'hypothèse de faux négatifs dus à la membrane qui sert à filtrer les spécimens avant l'analyse et qui pourrait retenir les bactéries ne serait pas viable dans la mesure où ces membranes ont été testées plusieurs fois pour les bactéries, et d'autre part, elles sont fréquemment utilisées en cytométrie dans des protocoles similaires.

La mise en évidence des spécimens positifs en CMF et négatifs en culture soulève la possibilité des résultats faux positifs par CMF ou probablement d'une sensibilité plus grande de cette technique (CMF) par rapport à la culture.

Les réactions croisées avec d'autres bactéries capables de lier le fragment Fc des anticorps (staphylocoque et streptocoque) ont été con-

tournées en préincubant pendant quelques minutes les cellules avec du sérum normal de souris pour saturer les sites de fixation non spécifiques.

L'idéal serait d'avoir deux échantillons cliniques prélevés dans les mêmes conditions, un destiné à la culture et l'autre à la cytométrie, ce qui est difficile à faire chez des enfants. La possibilité de mettre en suspension l'écouvillon et de le partager en deux augmente la chance d'avoir des faux négatifs en culture vu la sensibilité de la bactérie.

Nous avons pu constater que le gain de sensibilité que donne la PCR par rapport à la culture est faible, l'IFD donne de nombreux faux positifs. La CMF offre un certain nombre d'avantages par rapport à la culture dont: une spécificité de 99% et une sensibilité égale à 60-70% (35 à 50% supérieure à la culture), des délais plus courts (20 minutes au lieu de 5 à 7 jours). La CMF permet d'analyser plusieurs échantillons simultanément avec des réactifs moins coûteux. Enfin, contrairement à la culture, nous pouvons analyser des bactéries non viables qui sont antigéniquement stables et identifiables par des critères morphologiques et de diffraction de la lumière.

À l'exception du cytomètre, la méthode utilisée de marquage est simple et ne nécessite aucun équipement inhabituel. Ainsi l'analyse par CMF est hautement reproductible.

Finalement, pour comparaison, rappelons les résultats de trois études réalisées dans des laboratoires de différents pays :

- (i) Dans une série de 5683 cas de coqueluche survenus en Alberta de décembre 1989 à janvier 1991 les analyses par IFD, culture et PCR ont donné les résultats suivants: 88,4% des positifs IFD, seulement 11,6% ont été confirmés par la culture dont 78 cas positifs à *Bordetella parapertussis*; et 84,6% IFD positifs, culture et PCR négatifs. Selon l'auteur le haut pourcentage d'IFD positive, culture négative pourrait correspondre à de faux positifs dus probablement à des bactéries non viables par le transport et précise la nécessité d'utiliser la PCR pour confirmer les résultats de l'IFD et de la culture (Ewanowich et coll, 1993);
- (ii) La seconde étude a porté sur 226 cas de coqueluche signalés au service de santé de la ville de Chicago, 70 étaient positifs (*Bordetella pertussis*) en culture ce qui cor-

respond 31% (Relevé Épidémio. Hebd, n°13, 1994);

- (iii) Sur 500 cas de coqueluche confirmés en Angleterre entre 1977 et 1992, des résultats de culture ont été obtenus chez 239 patients seulement, dont 100 positifs à *Bordetella pertussis* et 2 à *Bordetella parapertussis* (Jenkinson D, 1995).

En ce qui nous concerne, nous regrettons de n'avoir pas pu bénéficier des tests PCR et IFD pour l'ensemble de notre échantillon (1100 spécimens). Ce qui nous aurait aidé à tirer des conclusions plus pertinentes. Car les 100 premiers résultats obtenus des laboratoires de l'Université d'Edmonton laissent supposer que la technologie n'est pas encore complètement au point quant à sa sensibilité et sa spécificité. La sérologie, prévue et souhaitée dans notre projet, aurait aussi enrichie la comparaison.

## VI. CONCLUSION

Outre la qualité et l'efficacité des vaccins utilisés pour prévenir la coqueluche, la fiabilité des techniques de diagnostic a une part prépondérante dans la lutte contre les épidémies et la prévention des séquelles neurologiques et pulmonaires de la coqueluche. Le problème, comme nous l'avons vu, se situe au niveau des méthodes de dépistage et de diagnostic, ainsi que par les délais imposés pour pouvoir annihiler les séquelles de la maladie par un traitement adéquat.

La mise en culture demeure le test de référence et le seul moyen pour suivre l'évolution des souches, pour étudier la virulence et la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques. Mais cette technique exige des milieux de culture spéciaux, et les colonies ne sont visibles qu'à partir du quatrième jour. Sa sensibilité demeure faible du fait de la fragilité de la bactérie et ce, même si les conditions de prélèvement, de transport et d'ensemencement sont respectées. Par ailleurs, l'utilisation de nombreux tests différents devient très coûteuse et difficilement réalisable.

Les résultats de notre étude montrent que la CMF offre un certain nombre d'avantages par rapport à la culture :

- Avec une spécificité de 99% et une sensibilité de 60 à 70%, elle nous évite les délais trop longs de la culture : 20 minutes au lieu de 5 à 7 jours.
- La CMF permet d'analyser plusieurs échantillons simultanément (50 et plus à la fois) avec des réactifs moins coûteux, et d'entreprendre autant des études cliniques que fondamentales.
- Ce type de technique est aussi applicable aux autres agents microbiens tels que Pneumocystis et Legionella.
- Elle offre l'avantage d'une quantification précise et fiable des signaux fluorescents provenant d'anticorps liés aux micro-organismes;
- Elle fournit une échelle d'intensité continue capable de détecter des signaux beaucoup plus faibles qu'en microscopie à fluorescence.
- Elle offre la possibilité d'une mesure simultanée de plusieurs signaux par cellule.

- Elle est d'une automatisation extrêmement facile et d'une rapidité d'analyse considérable. Le cytomètre analyse environ 2000 cellules/seconde.
- Grâce à cette technique et contrairement à la culture, nous pouvons analyser des bactéries non viables qui sont antigéniquement stables et identifiables après les avoir gardées plusieurs jours ou semaines à des températures de (+) 4 ou (-) 20 degrés Celsius. Ce qui permet d'éviter les contraintes liées au transport et à la conservation du prélèvement.

Les résultats obtenus stimulent la recherche et la poursuite d'autres travaux avec des échantillons de cette importance (au moins mille) afin de déterminer une réelle sensibilité de la CMF et que les spécimens soient destinés directement à l'analyse par la cytométrie en flux.

Nous concluons enfin que grâce à ses caractéristiques de fiabilité, d'efficacité et de simplicité et surtout le coût peu élevé des tests (si on possède déjà un cytomètre), la cytométrie en flux pourrait s'avérer être une alternative possible aux besoins en outil de diagnostic rapide tel que le recommandent différents organismes de santé (CCNI, CCE, SCP).



De gros efforts restent toutefois nécessaires pour réduire l'incidence de la coqueluche chez les jeunes enfants ainsi que la morbidité grave associée à celle-ci. La CMF facilite le choix rapide d'un traitement et d'une prophylaxie efficace des contacts afin d'éviter la transmission chez les nourrissons chez lesquels s'observent les formes les plus graves de la maladie.

## BIBLIOGRAPHIE

**Adolf M et I (1988)** : La cytométrie en flux, pour l'étude de la cellule normale ou pathologique, Medsi, Vol.1, Mc-Graw - Hill, Paris.

**Alonso JM, Brezin C, Ray B (1985)** : Bordetella pertussis et la coqueluche. Bull. Inst. Pasteur, 83, pp.19-31.

**April N et coll (1993)** : La coqueluche, situation et orientation. Rédigé par le groupe de travail, Centre de coordination de la Santé Publique de la région de Québec. Centre hospitalier Laval, CLSC Orléans, MSSS, DGSP.

**April N et coll (1994)** : La coqueluche : protocole d'intervention. Rédigé par le groupe de travail, Centre de coordination de la Santé Publique de la région de Québec. Centre hospitalier Laval, CLSC Orléans, MSSS, DGSP.

**Ayme G, Caroff M, Chaby R, Cavaillon NH, LeDur A, Moreau M, Muset M, Mynard M-C, Roumiantzeff M, Schulz D, Szabo L (1980)**: Biological Activities of Fragments Derived from Bordetella pertussis Endotoxin : isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. Infect. Immun. 27, pp. 739-745.

**Baker JD, Halperin SA, Edwards K, Miller B, Decker M, Stephens D, (1992)**: Antibody Response to Bordetella pertussis Antigens after Immuni-

zation with American and Canadian Whole-cell vaccines. The Journal of Pediatrics. Vol. 121, n° 4, octobre, pp. 523-527.

**Bédard L (1995):** La coqueluche: problème émergent? Conférence, hôpital Sainte-Justine, le 19 avril.

**Betsou F (1995) :** Facteurs impliqués dans la virulence des Bordetelles. Dans 12<sup>es</sup> journées de pathologie infectieuse pédiatrique organisées par le groupe de pathologie infectieuse de la Société française de pédiatrie. «La coqueluche», Paris 16-17 mai 1995, Arch Pédiatr (1995) 2, 1226-1231.

**Bordet J, Gengou O (1906) :** L'endotoxine coquelucheuse, Ann Inst Pasteur, Paris, 23, pp. 415-419.

**Bordet J, Gengou O (1906) :** Le microbe de la coqueluche, Ann Inst Pasteur, Paris, 23, pp. 731-741.

**Canada Diseases Weekly Report (1990) :** Flambée de la coqueluche dans l'Île de Montréal, Vol. 16, pp. 107-110, avril, Santé et Bien-être Canada.

**Centers for Disease Control (1993):** Resurgence of pertussis-United States, MMWR 1993; 42, pp.952-53, 959-60.

**Cherry JD (1993) :** Acellular Pertussis Vaccine A Solution to the Pertussis Problem, The Journal of Infectious Diseases,168, pp.21-24.

**Comité Consultatif National de L'immunisation (1993):** Le vaccin contre la coqueluche. Le guide canadien d'immunisation; 4<sup>ème</sup> édition, Ottawa, Santé Canada, pp. 49-54.

**Comité Consultatif National de L'immunisation, Comité Consultatif de L'épidémiologie, Société Canadienne de Pédiatrie (1995) :** Déclaration concernant la prise en charge des personnes exposées à la coqueluche et la lutte contre les épidémies de coqueluche. RMTc, 20, pp.193-199.

**Comité consultatif national de l'immunisation, Le Comité consultatif de l'épidémiologie et la Société canadienne de pédiatrie (1990):** Déclaration au sujet de la prise en charge des personnes exposées à la coqueluche et de la lutte contre les flambées de coqueluche. RHMC, 16, pp. 127-130.

**Cunningham RE (1994):** Overview of Flow Cytometry and Fluorescent Probes for Cytometry, in Methods in Molecular Biology, Vol. 34, pp. 219-224, Human Press, Toronto.

**Darzynkiewicz Z et coll (1980) :** New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. Cytometry Vol. 1 pp. 98-108.

**De Serres G, Boulianne N, Duval B et coll (1994) :** Résultats préliminaires de l'étude sur l'efficacité contre la coqueluche dans les garderies. Colloque provincial sur les maladies infectieuses, Montréal, avril .

**Deen JL, Mink CM, Cherry JD, Christenson PD, Pineda EF, Lewis K, Blumberg DA, Ross LA (1995):** Household Contact Study of Bordetella pertussis Infections. *Clinical Infections Dis*, n° 21, pp. 1211-1219.

**Direction de la Prévention et Protection de la Santé Publique (1987) :** Maladies infectieuses: rapport annuel 1986, Québec, Ministère de la santé et des services sociaux.

**Direction de la Santé Publique (1991) :** Surveillance des maladies infectieuses à déclaration obligatoire au Québec. Définitions nosologiques. Québec, Ministère de la Santé et des Services Sociaux.

**Edwards KM, Decker MD, Graham BS, Mezzatesta J, Scott J, Hackell J (1993) :** Adult Immunization with Acellular Pertussis Vaccine, *JAMA*, January 6, Vol. 269, 1, pp. 53-56.

**Endoh M et coll (1988) :** Cytopathic effect of heat-labile toxin from Bordetella parapertussis on aortic smooth muscle cells from pigs of guinea pigs. *Microbiol. Immunol.* 32, pp. 113-118.

**Ewanowich C A, Chui LWL, Paranchych MG et coll. (1993) :** Major Outbreak of Pertussis in Northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent antibody and culture results by using polymerase chain reaction methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31, pp.1715-1725.

**Feigin RD and Cherry JD (1992)** : Pertussis. Feigin RD and Cherry JD (ed.), Textbook of pediatric infectious diseases. WB Saunders Co, Philadelphia, pp.1208-1218.

**Freyja L, Reed GF and Meade BD (1996)**: Collaborative Study for the Evaluation of Enzyme-linked Immunosorbent Assays Used To Measure Human Antibodies to Bordetella pertussis Antigens, Clin. and Diagnostic Laboratory Immunology, pp. 689-700.

**Friedman RL (1988)** : Pertussis: The disease and new diagnostic methods. Clin. Microbiol. Rev.1 pp.365-376.

**Galazka A.(1992)** : Control of Pertussis in the World. World Health Stat Q, 45, pp.238-47.

**Gold R, Dery P, Halperin S et coll. (1994)**: Cas de coqueluche chez des enfants hospitalisés dans cinq hôpitaux pédiatriques canadiens de soins tertiaires, RMTC, Vol. 20, pp. 31-34.

**Greimers R (1990)**: Cytométrie en flux: analyses multiparmétriques et tri Cellulaire. Laboratoire d'Anatomie Pathologique, C.H.U.B.-35, J. Bouniver, Université de Liège.

**Grimprel E (1995)** : Méthodes de diagnostic direct de la coqueluche. Dans 12<sup>es</sup> journées de pathologie infectieuse pédiatrique organisées par le groupe de pathologie infectieuse de la Société française de pédiatrie. «La

coqueluche», Paris 16-17 mai 1995, Arch Pédiatr (1995) 2 pp. 1226-1231.

**Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guison N (1995):** Human Bordetella bronchiseptica Infection Related to contact with infected Animals: Persistence of Bacteria in Host. J. Clin. Microbiol. Vol. 33, n° 8, pp. 2002-2006.

**Hallander HO, et coll. (1993) :** Comparaison of Nasopharyngeal Aspirates with Swabs for Culture of Bordetella pertussis. J. Clin. Microbiol. pp. 31-50.

**Halperin S (1992) :** Office Diagnosis of Pertussis , Can J. Infect Dis, 3, pp. 221-222.

**Halperin S (1996):** Acellular Pertussis Vaccines have Arrived, Can. J. Infect. Dis. Vol. 7, n° 6, november-december, pp. 359-360,

**Halperin S, Langley JM and Eastwood BJ (1996):** Effect of Inactivated Poliovirus Vaccine on the Antibody Response to Bordetella pertussis Antigens When Combined with Diphtheria-Pertussis-Tetanus Vaccine. In Clinical Infectious Diseases, Vol. 22 pp. 59-62.

**Halperin S, Bortolussi R, Kasina A, and Wort AJ (1990):** Use of a Chinese hamster ovary cell cytotoxicity assay for the rapid diagnosis of pertussis. J. Clin. Microbiol. 28, pp. 32-38.

**Halperin S, Bortolussi R, Wort AJ (1989):** Evaluation of Culture, Immu-

nofluorescence, and Serology for the Diagnosis of Pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 27, pp.752-757.

**Hanrahan A, Waters J (1988):** Réactions fâcheuses au point d'injection des quatrième et cinquième doses de vaccin DCT-Alberta. *RHMC*, 14, pp. 45-47.

**Hewlett EL (1990):** *Bordetella Species*, in *Principles and Practice of Infectious Diseases*, third edition, Churchill Livingstone, New York, pp1756-1762,

**Hewlett EL (1995) :** *Bordetella Species* in *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, Douglas and Bennett's, Vol. 2 fourth edition, pp.2078-2084.

**Irons, LI, Gorringe AR (1988) :** Pathogenesis and Immunity in Pertussis. Wardlaw A.C et R. Parton (éd), John Wiley, Sons Ltd. pp. 95-120.

**JAMA (1992):** Pertussis Vaccines Seeking a Better Mousetrap, Editorials of JAMA, May 27, Vol. 267, n°20, pp. 2788-2790.

**Jenkinson D (1995):** Natural Course of 500 Consecutive Cases of Whooping Cough: a general practice population study, *B. M. J.* 310, pp.299-302.

**Jenkinson D (1995):** The Modern Face of Whooping Cough. In the Practitioner, Vol. 239, october, pp. 620-621.

**Katzko G, Hofmeister M, Church D (1996) :** Extended Incubation of Cul-



ture Plates Improves Recovery of *Bordetella* spp. J. Clin. Microbiol. 34-6, pp. 1563-2564.

**Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie (1991)** : Programme canadien de surveillance des maladies transmissibles: définitions de cas et méthodes de surveillance particulière à chaque maladie, Ottawa, Santé et Bien-être Social Canada

**Laboratoire de la Lutte Contre la Maladie (1991)** : Sommaire annuel des maladies à déclaration obligatoire, Ottawa, Santé et Bien-être Social Canada.

**Lacy BW (1960)** : Antigenic Modulation of *Bordetella pertussis*. J. Hyg. Camb. 58, pp. 57-93.

**Lebel M (1995)**: "Mise à jour sur la coqueluche. Aspects cliniques et thérapeutiques". Conférence, hôpital Sainte-Justine, le 19 avril.

**Lebel P (1995)**: Mise à jour sur la coqueluche. Aspects microbiologiques, Conférence, hôpital Sainte-Justine, le 19 avril.

**Leive LL, Davis BD, (1980)** : Cell envelope; spores. Microbiology. Davis Bd, Dubleco R, Eisen HN et Ginsberg Hs. Harper & Row publishers pp.71-110.

**Leslie PH, Gardner AD (1931)** : The Phases of *Haemophilus pertussis* , J.

Hyg. Camb. 31, pp.423-443.

**LI Z, Jansen DL, Theresa MF, Halperin SA, Kasina A, O'Connor SP, Ayama T, Manclark C- R, and Brennan M-J (1994)** : Identification of *Bordetella pertussis* Infection by Shared-Primer PCR, *J. Clin. Microbiol.* 32, pp. 783-789.

**Martin D, McNicol P, Marchand R, Lebel P, Peppler MS, Brodeur BR (1995)** : An Improved Immunofluorescent Reagent for Rapid, Direct Detection of *Bordetella pertussis*. *Can J. Infect. Dis.*, Vol.6, 1 January/ February, pp. 16-18.

**Martineau B (1996)** : Systématique bactérienne. Guide d'identification des bactéries aérobies. Décarie Éd., Montréal.

**McNicol et coll (1995):** Evaluation and Validation of a Monoclonal Immunofluorescent Reagent for Direct detection of *Bordetella pertussis*. In *J. of Clinical Microbiology*, 33-11 pp. 2868-2871.

**Métézeau et coll (1982)** : La cytométrie en Flux, pour l'étude de la cellule normale ou pathologique, MEDSI, Mc Graw-Hill, collection Laboratoire Technique, Vol.2, Montréal, Paris.

**Métézeau et coll (1988)** La cytométrie en Flux, pour l'étude de la cellule normale ou pathologique, MEDSI, Mc Graw-Hill, Collection Laboratoire Référence, Vol.1 Montréal, Paris.

**Métézeau P (1994)** : La cytométrie en flux, guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules. PULIM, Limoges.

**Michel-Briand Y (1989)** : Bordetella. Dans Bactériologie médicale. Le Minor L et Véron M. Éd. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, pp. 678-693.

**Njamkepo E (1995)** : Diagnostic sérologique de la coqueluche. Dans 12<sup>es</sup> journées de pathologie infectieuse pédiatrique organisées par le groupe de pathologie infectieuse de la Société française de pédiatrie. «La coqueluche», Paris 16-17 mai 1995, Arch Pédiatr (1995) 2 pp. 1226-1231.

**Olcen P, Backman A, Johansson B, et coll (1992)**: Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction for the Efficient Diagnosis of Pertussis. Scand J Infect Dis. 24, pp. 339.

**Onorato et coll (1992)**: Efficacy of Whole - Cell Pertussis Vaccine in Preschool Children in The United States, in JAMA, May 27, Vol. 2676, n° 20, pp. 2745-2749.

**Onorato M, Wassilak S (1987)**: Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. Pediatr. infect. Dis. J. 6, pp. 145-151.

**Painchaud S (1994)**: Épidémie de coqueluche au Québec. Vers un nouveau vaccin? L'Omnipraticien, 16 février,

**Prével A (1995)** : Diagnostic direct par PCR des infections à Bordetella

pertussis. Dans 12<sup>es</sup> journées de pathologie infectieuse pédiatrique organisées par le groupe de pathologie infectieuse de la Société française de pédiatrie. «La coqueluche», Paris 16-17 mai 1995, Arch Pédiatr (1995) 2 pp. 1226-1231.

**Prével A, Zambardi G, Caguin S, Floret D, Freney J, Fleurette J (1997) :** Diagnostic biologique de la coqueluche : apport de l'amplification génétique, La Presse Médicale, Paris, tome 26, n° 16, 17 mars, pp. 769-773.

**Programme canadien de surveillance des maladies transmissibles (1991):** Définitions de cas et méthodes de surveillance particulières à chaque maladie. Can Dis Weekly Report, pp. 1723-26.

**Reizenstein E, Löfdahl S, Granström M, et coll (1992):** Evaluation of an Improved DNA Probe for Diagnosis of Pertussis. Diag Microbiol Infect. Dis. 15, pp. 569-573

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1993) :** Caractérisation des souches responsables d'une épidémie et des souches vaccinales de Bordetella pertussis- Québec, Vol.19, pp.182-187.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1993) :** Conférence de concertation sur la coqueluche. Vol.19, pp. 124-135.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1993) :** Déclaration sur la vaccination anticoquelucheuse. Vol.19, pp.41-45.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1993) :** Étude de la chaîne du froid : danger de congélation des vaccins. Vol.19, pp. 33-36.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1994) :** Déclaration concernant la prise en charge des personnes exposées à la coqueluche et la lutte contre les épidémies des coqueluche. Vol. 20, pp. 193-199.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1995):** Recrudescence de la coqueluche en Montérégie (Québec) 1990-1994, Vol. 21, pp. 40-44.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1995):** La coqueluche au Québec: épidémie depuis la fin des années 80. 21, pp. 45-48.

**Relevé des maladies transmissibles au Canada (1996):** Décembre. Vol. 22-24; pp. 201-208.

**Relevé épidémiologique hebdomadaire (1994),** n° 13, 1er avril

**Robaszkiewicz M, Hardy E, Nousbaum JB, Robert FX, Volant A, Gouerou H (1994):** Cytométrie en flux et pathologies digestives, Rev. Prat, Paris, n° 44, 7, pp. 930-937.

**Robinson JP et coll (1993) :** Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss Inc.

**Santé et Bien-être social Canada (1992):** Guide de prévention des infections, techniques d'isolement et précautions. Ottawa, Santé et Bien-être

social Canada,

**Scheftel JM (1995)** : Recherche de l'adénylate cyclase (AC) dans les prélèvements nasopharyngés et diagnostic de la coqueluche. Dans 12<sup>es</sup> journées de pathologie infectieuse pédiatrique organisées par le groupe de pathologie infectieuse de la Société française de pédiatrie. «La coqueluche», Paris 16-17 mai 1995, Arch Pédiatr (1995) 2, 1226-1231.

**Shapiro ED (1992)**: Pertussis Vaccines, Seeking a Better Mousetrap, in Jama, May 27, Vol. 267, n°. 20, pp. 2788-2790

**Shapiro HM. (1995)**: Practical Flow Cytometry, Third edition, Wiley-Liss Inc.

**Steen HB (1990)**: Flow Cytometric Studies of Micro-organisms, in Flow Cytometry and Sorting, Second Edition, Wiley-liss, Inc, pp. 605-622,

**Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa A (1982)**: Applications of Flow Cytometry on Bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. Cytometry 2, pp.249-257.

**Strorsaeter J et coll (1992)**: Pertussis Antibodies, Protection, and Vaccine Efficacy After Household Exposure. AJDC, Vol. 146, february, pp. 167-172.

**Tenover F (1988)**: Diagnostic Deoxyribonucleic Acid Probes for Infectious Diseases. Clin. Microbiol.1, pp. 82-101.

**Thibodeau LA (1981):** Evaluating Diagnostic, Tests Biometrics 37, pp. 801-804.

**Varughese P (1985) :** Incidence de la coqueluche au Canada, RHMC, 11, pp. 33-35.

**Vesselinova-Jenkins CK, Newcombe RG, Gray OP, Skone JF, Howells CHL., Lennox M. et coll(1978):** The Effects of Immunisation upon the Natural History of Pertussis. A family study in the Cardiff area. J. Epidemiol Community Health, 32, pp. 194-9.

**Wadowsky RM, Michaels RH, Libert T, Kingsley LA, Ehrlich DG (1996):** Multiplex PCR-Based Assay for Detection of Bordetella pertussis in Nasopharyngeal Swab Specimens. J. Clin. Microbiol. 34, pp. 2645-2649.

**Weiss, AA et Hewlett EL 1986) :** Virulence factors of Bordetella pertussis. Ann. Rev. Microbiol. 40, pp. 661-686.

**Winters AL, Baggett DW, Lee JD, Sloan GL, Lemmon RD, Strinson RS (1985) :** Immunomodulation by Bordetella pertussis: antiviral effects. Develop. Biol. Standard. 61, pp.233-240.

**Woolfrey BF, Moody JA (1991) :** Human infections associated with Bordetella bronchiseptica. Clin. Microbiol. Vol. 4, n° 3, Rev. 4, pp. 243-255.

**Wright, SW, Edwards KM, Decker MD, Zeldin MH (1995) :** Pertussis

Infection in Adults With Persistent Cough. JAMA, April 5, Vol. 273, n°13, pp. 1044-1046.

**Yiru Xu and Barbieri JT (1995):** Pertussis Toxin-Mediated ADP-Ribosylation of Target Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Involves a vesicle Trafficking Mechanism, in *Infection and Immunity*, Mar, pp. 825-832.