



Point de vue

Quel est le rôle des LNR/CNR dans la surveillance des maladies?

Paul Martin (paul.martin@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Lyon, FRANCE

Fonctions essentielles des LNR/CNR

Dans leur rapport technique de 2010 (ECDC, 2010) « Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases », les auteurs définissent de manière claire et synthétique cinq types d'activités, les « core-fonctions », pour les laboratoires ou centre nationaux de référence en Europe :

- fonction 1 : diagnostic de référence (reference diagnostics);
- fonction 2 : matériel de référence (reference material resources);
- fonction 3 : expertise scientifique (scientific advice);
- fonction 4 : collaboration et recherche (collaboration and research);
- fonction 5 : surveillance, alerte et réponse (monitoring, alert and response).

Le document est le résultat d'un consensus entre les représentants des points focaux nationaux (NMFPs ou National Microbiology Focal Points) des différents pays de l'Union. Il entend encourager la coopération entre « experts » et laboratoires de référence et servir de document central pour les futures discussions sur le système européen de laboratoires de référence. Les termes de « laboratoire national de référence » (LNR) et de « centre national de référence » (CNR) sont tous deux couramment employés. Cependant cet usage est souvent spécifique de chaque pays et différentes interprétations de chaque terminologie existent. Pour éviter toute confusion et établir une référence commune, nous utiliserons ici, comme le recommande le rapport de l'ECDC (2010), la terminologie « laboratoire de référence en microbiologie ».

Nous développerons ici la *core-fonction 5*, essentielle à nos yeux, des laboratoires de référence en microbiologie : la surveillance, l'alerte et la réponse. En effet, ces activités sont le pivot des interactions entre un laboratoire de référence en microbiologie et l'organisme en charge de la surveillance épidémiologique des maladies au niveau national (ou provincial, suivant le niveau où est située, dans chaque pays, cette responsabilité).

Les objectifs de la fonction 5 peuvent se résumer de la façon suivante pour un agent pathogène donné :

- 1 – mesurer, sur une base annuelle, semestrielle, mensuelle, etc., l'évolution spatio-temporelle de la présence, du nombre d'identifications du pathogène et de ses grandes caractéristiques (résistance aux antibiotiques, antiviraux ou antiparasitaires, nouveaux sérotypes, etc.);
- 2 – alerter les autorités de santé publique de tout événement inhabituel, inattendu, concernant cet agent pathogène : apparition d'une résistance nouvelle aux antibiotiques, émergence d'un nouveau sérotype, shift sérotypique, nouveau facteur de virulence, occurrence inhabituelle de cas groupés, etc. ;
- 3 – en cas de foyer ou de véritable épidémie/épidémiologie, participer activement, en étroite collaboration avec l'organisme chargé de la surveillance épidémiologique de cette maladie, à la documentation des isolats des pathogènes impliqués, de façon à confirmer l'unicité de l'étiologie des cas épidémiques et les différencier si nécessaire des cas endémiques, à

surveiller leur possible microévolution (*i.e.* l'acquisition par exemple d'une résistance aux antiviraux, aux antibiotiques, etc.) et surtout à les caractériser de façon suffisamment précise pour permettre l'identification certaine de l'origine de l'épidémie. Ce dernier point est particulièrement important dans les cas de maladies humaines d'origine alimentaire, pour lesquelles l'identification de la source épidémique est essentielle pour la mise en œuvre des mesures de santé publique qui en découlent. Ce dernier aspect, particulièrement important en termes de santé publique, est en fait très opérationnel. Il nécessite donc une relation de travail équilibrée et en confiance, souvent journalière, entre le laboratoire de référence en microbiologie (ou les laboratoires s'il en existe plusieurs, parfois dépendant de plusieurs ministères comme la santé, l'agriculture, l'environnement, etc.) et l'organisme responsable de la surveillance épidémiologique. La participation du laboratoire de référence en microbiologie aux investigations épidémiologiques (prévue par exemple en France pour les CNR dans leur cahier des charges) est l'un des moyens qui favorisent ce travail en commun.

Les relations entre les deux types d'investigateurs concernés par la surveillance épidémiologique des maladies, microbiologistes et épidémiologistes, sont des interactions **régulières** (pour les tendances spatio-temporelles, l'adoption de nouvelles techniques de laboratoire ou méthodes épidémiologiques, etc.), **fortes** (lors des crises sanitaires, épidémies) et **organisées** (de façon à bien situer le rôle de chacun, notamment lors des investigations d'épidémies). Une relation équilibrée entre ces deux types de partenaires aux cultures scientifiques différentes mais nécessairement complémentaires, facilite et améliore grandement les résultats en termes de santé publique.

Le diagnostic moléculaire, un challenge pour le rôle des laboratoires de référence en microbiologie dans la surveillance de la circulation des souches

L'importance de l'épidémiologie moléculaire pour l'activité des laboratoires de référence en microbiologie n'est plus à démontrer, que ce soit lors des épidémies d'origine alimentaire, pour retrouver l'origine de la contamination et l'aliment incriminé, ou en santé animale et humaine, pour déterminer par exemple l'origine d'un clone de pathogène impliqué dans une infection nosocomiale, l'origine d'une maladie virale émergente en Europe, ou déterminer les caractéristiques de virulence d'une population donnée de bactéries pathogènes. Dans tous ces cas, l'implication des microbiologistes aux côtés des épidémiologistes est essentielle.

Du point de vue du laboratoire de référence en microbiologie, le diagnostic moléculaire, surtout lorsqu'il est réalisé en première intention, ce qui est de plus en plus souvent le cas, représentera dans le futur un véritable défi. En effet le diagnostic moléculaire va, pour la majorité des agents pathogènes, remplacer les méthodes classiques de culture et d'isolement des souches bactériennes, virales ou fongiques, et donc modifier considérablement nos



Point de vue

possibilités de caractérisation phénotypique et génotypique des isolats pathogènes, mais aussi réduire progressivement la nature et la mémoire de nos collections et limiter les possibilités d'analyse historique rétrospective. Ce point peut être important sur le plan épidémiologique et clinique, mais aussi sur le plan fondamental, notamment en limitant les études sur l'évolution des agents pathogènes.

Cependant, il ne s'agit pas d'un phénomène très récent. Cette problématique existe déjà depuis plusieurs années avec les micro-organismes pathogènes non cultivables ou difficilement cultivables. C'est par exemple le cas des virus des hépatites, et en particulier du virus de l'hépatite E (VHE). Pour ce dernier, qui n'est pas cultivé en routine, les microbiologistes ont cependant développé tout un système de diagnostic et de typage moléculaire (Baylis, 2011) réalisé directement à partir des échantillons biologiques que fournit la clinique (selles, sérum) ou même à partir d'échantillons d'eau. La PCR ciblée suivie d'un séquençage du brin amplifié permet de classer le virus dans l'un des quatre génotypes décrits, puis de le sous-typier et de le situer dans l'arbre phylogénétique des VHE. Ce même type de démarche s'étend maintenant à d'autres genres viraux, difficilement cultivables ou non (Kroneman, 2011 ; Ren, 2013).

Ce type d'approche est réalisable tant pour les virus que pour les bactéries, pour lesquelles le typage moléculaire est souvent venu remplacer le sérotypage classique, long et laborieux (Doumith, 2004). Bien que certaines techniques de typage moléculaire des bactéries puissent théoriquement être réalisées sans passer par l'étape classique de culture bactérienne, du moins lorsque le prélèvement est potentiellement mono-microbien, comme le typage des VNTR (Variable Number Tandem Repeat), le SLST (Single Locus Sequence Typing), le typage du gène de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, ou même le MLST (Multi-Locus Sequence Typing), en pratique les techniques de typage moléculaire des bactéries sont réalisées après culture et isolement classiques. C'est le cas des typages les plus utilisés comme le MLST et le typage VNTR, et bien sûr de la macro-restriction d'ADN (PFGE) pour laquelle des quantités importantes d'ADN sont nécessaires. Dans un proche avenir, le développement de l'accès aux séquences complètes de génomes bactériens (Whole Genome Sequence, WGS) ou viraux à des fins d'épidémiologie moléculaire par des méthodes NGS (Next Generation Sequencing) apporteront de telles qualités et quantités d'informations, utiles tant aux épidémiologistes qu'aux cliniciens infectiologues, qu'il y a des chances importantes de voir ces techniques se généraliser dans un avenir peut-être pas très lointain. La connaissance que le WGS apportera sur le virulome, sur le « toxome » (ensemble de tous les gènes de toxines) et le résistome (Wright, 2007) d'un ou de plusieurs isolats cliniques pourra être essentielle à la prise en charge du malade, comme à la prise de décision en santé publique. De plus le WGS, aujourd'hui réalisable à partir d'ADN obtenu à partir de culture pure peut aussi être réalisé, au moins théoriquement, par WGA (Whole Genome Amplification) basée sur une Amplification par déplacements multiples (MDA) utilisant la DNA-polymérase du phage Phi29 et des primers randomisés (random primers) (Lasken, 2003). Des kits de WGA sont aujourd'hui commercialisés et permettent, à partir de 10 ng d'ADN, d'obtenir entre 40 et 50 µg d'ADN en fin de réaction, une quantité suffisante pour obtenir une séquence complète. D'autres méthodes ont été adaptées à la détection et l'amplification de très faibles quantités d'ADN

dans les prélèvements pathologiques, comme par exemple pour les bactéries de l'espèce *Chlamydia trachomatis* (Seth-Smith, 2013).

Le diagnostic moléculaire réalisé dans les laboratoires de microbiologie clinique ne se fait pas en une seule étape : avant l'étape d'amplification proprement dite, les étapes de dilution des inhibiteurs potentiels et de concentration de l'ADN ou de l'ARN, constituent aussi des sources essentielles de matériel biologique. En effet, seuls quelques micro litres sont généralement utilisés pour la PCR diagnostique, et le reste peut être conservé quelques semaines au moins et être utilisé à la demande par les laboratoires de référence, à des fins de caractérisation génotypique et d'épidémiologie moléculaire, comme à des fins de recherche.

Enfin, l'expérience de TYPENED en Hollande (Niesters, 2013) est aussi une des réponses à ce défi en permettant d'intéresser les microbiologistes cliniques et les infectiologues aux données de l'épidémiologie moléculaire. Le concept est basé sur une base de données partagée qui collige les données cliniques, microbiologiques (séquences) et épidémiologiques. Tous les laboratoires participants, cliniques et de référence, ont accès à toutes les données de la base, ce qui permet une comparaison en temps réel entre les données obtenues par un laboratoire de diagnostic et celles obtenues par d'autres laboratoires dans la même période de temps par exemple, ou ayant la même expression clinique, la même réponse thérapeutique, etc. Cliniciens comme épidémiologistes de santé publique et microbiologistes des laboratoires de référence y trouvent ainsi chacun un intérêt.

Les perspectives de développement de ces systèmes sont prometteuses, car elles s'ouvrent sur une réelle amélioration de la surveillance des maladies infectieuses au niveau global, tant pour le clinicien infectiologue que pour le microbiologiste, l'épidémiologiste et le gestionnaire du risque. Avec ou sans étape de culture classique du pathogène et après quelques améliorations techniques dans l'instrumentation, obtenir les séquences complètes de chaque pathogène impliqué dans une pathologie sera possible et accessible. Cela permettra, outre une meilleure adéquation thérapeutique avec les données de la microbiologie moléculaire, une intégration rapide et en temps réel des données globales sur le ou les malades, les agents pathogènes et les données épidémiologiques. En effet, la transmission et l'échange de données moléculaires sont incomparablement plus « transportables » que les isolats de pathogènes bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. À la condition que ces données soient partagées, cela constitue l'opportunité de créer un système global de bases de données reliées entre elles pour la caractérisation génétique des microorganismes isolés des malades, humains ou animaux, et des sources potentielles de contamination (prélèvements hospitaliers, aliments, eaux de boisson, etc.) Cette surveillance intégrée (Aarestrup, 2012) permettra une réponse de santé publique mieux coordonnée, y compris transfrontalière lorsque nécessaire, et plus adaptée aux menaces réelles pour la santé publique.

Références

Aarestrup F M, Brown E W, Detter C, Gerner-Smidt P, Gilmour M W, Harmsen D, et al. 2012. Integrating genome-based informatics to modernize global disease monitoring, information sharing, and response. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 Nov [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1811.120453>



Point de vue

Baylis S A, Hanschmann K-M, Blümel J, Nübling C M, on behalf of the HEV Collaborative Study Group, 2011. Standardization of Hepatitis E Virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*, 49:1234-1239.

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 42:3819-3822.

ECDC, 2010. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC; 2010.

Lasken R S, Egholm M, 2003. Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends in Biotech*, 21:531-535.

Niesters H G, Rossen J W, van der Avoort H, Baas D, Benschop K, Claas EC, Kroneman A, van Maarseveen N, Pas S, van Pelt W, Rahamat-Langendoen J C, Schuurman R, Vennema H, Verhoef L, Wolthers K, Koopmans M, 2012. Laboratory-based surveillance in the molecular era: the TYPENED model, a joint data-sharing platform for clinical and public health laboratories. *EuroSurveillance*. 2013;18(4):pii=20387. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20387>

Seth-Smith H M B, Harris S R, Skilton R J, Radebe F M, Golparian D, Shipitsyna E, Duy P T, Scott P, Cutcliffe L T, O'Neill C, Parmar S, Pitt R, Baker S, Ison C A, Marsh P, Jalal H, Lewis D A, Unemo M, Clarke I N, Parkhill J, Thomson N R, 2013. Whole-genome sequences of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples without culture. *Genome Res*, 23:855-866.

Wright, G D, 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*, 5:175-186.

Ren X, Yang F, Hu Y, Zhang T, Liu L, Dong J, *et al.* 2013. Full genome of influenza A (H7N9) virus derived by direct sequencing without culture. *Emerg Infect Dis* [Internet], 2013 Nov [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1911.130664>

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H V D, Penaranda S, Oberste M S, Vinjé J, Koopmans M, 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses? *J Clin Virol*, 51:121-125.