

AFTH Bagnères de Bigorre
le 7/11/2008

Prof. Céline Ohayon-Courtès,
LHE, Univ. Bordeaux 2

Recherche de Légionelles par PCR

CARACTÈRES BACTÉRIENS

- La mise en évidence des bactéries peut reposer sur deux types de caractères

- ▮ Le phénotype :

- ensemble de caractères observables, influencés par l'environnement de la bactérie
- objectivés par la culture, l'isolement, la morphologie, les tests biochimiques et immunologiques ...

- ▮ Le génotype :

- ensemble des constituants génétiques, exprimés ou non, déterminant partiellement le phénotype
- portés par l'ADN et les gènes

MÉTHODE PHÉNOTYPIQUE

- La mise en culture

- ▮ Filtration sur membrane, concentration
- ▮ Ensemencement de milieux
- ▮ Incubation et multiplication

} 5 à 10 j

- Lecture et sélection des colonies

- Étapes d'identification

- ▮ Repiquage sur milieux différentiels
- ▮ Tests immunologiques

} 2 à 4 j

MÉTHODE GÉNOTYPIQUE : LA PCR

- Filtration, concentration

- Extraction et purification de l'ADN

- Amplification de la séquence cible de l'ADN

- ▮ Spécifique du genre *Legionella* spp
- ▮ Spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila*

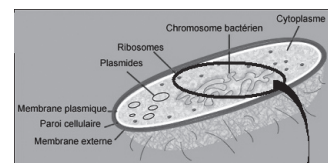
- Quantification des séquences amplifiées

- Durée totale de 8 à 48h

BASES THÉORIQUES

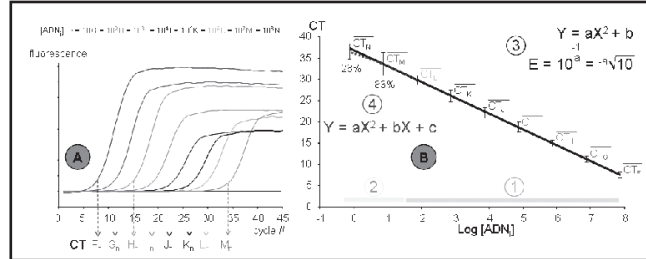
- Reproduire la réplication naturelle de l'ADN

- ▮ En ciblant une zone
- ▮ En fournissant les amorces, les enzymes et les oligonucléotides nécessaires
- ▮ En répétant le cycle entre 30 et 50 fois



PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL (qRT-PCR)

- Utilisation d'un indicateur fluorescent de la production des amplicons durant chaque cycle
- L'augmentation du signal est proportionnelle à la quantité des produits de PCR



CARACTÉRISTIQUES DES DEUX MÉTHODES

Culture	qRT-PCR
Multiplication des bactéries viables et cultivables	Amplification de l'ADN des bactéries viables cultivables ou non et des mortes intègres
Numération en UFC/l	Quantification en UG/l Plus souvent positive Signal > culture Mal corrélée à la culture
Limite détection 50 UFC/l Limite quantification 250 UFC/l	Limite détection 30 à 200 UG/l Limite quantification 100 à 500 UG/l
<p>Faux négatifs possibles</p> <p><u>Du fait de la technique :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - sélectivité des milieux et des traitements - absence de test d'identification de toutes les espèces <p><u>Du fait de l'échantillon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - présence de flore interférente - perte de cultivabilité des souches (stress) 	<p>Faux négatifs rares</p> <p><u>Du fait de la technique :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - défaut d'extraction, - défaut de purification <p><u>Du fait de l'échantillon :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - présence d'inhibiteurs Éliminés par contrôles internes <p>Grande fiabilité des résultats négatifs</p>
	Détecte l'ensemble des espèces de <i>Legionella</i>

Culture	qRT-PCR
Bonne prédictivité du risque sanitaire	Prédictivité du risque sanitaire inconnue
Niveaux d'alerte et réglementaires établis par cette méthode Plus représentative du caractère infectieux des souches ?	Aucun niveau de risque établi par cette méthode Rend compte des BVNC qui peuvent conserver leur caractère infectieux ?
Isolement de la souche pour enquête épidémiologique Sérotypage possible de <i>L. pneumophila</i>	Constitue donc un complément de la méthode par culture Contrôle sanitaire

APPLICATION AU LHE

- Analyse d'échantillons d'eau mise en œuvre
 - ▮ depuis plus de 5 ans par PCR traditionnelle
 - ▮ en qRT-PCR depuis 2 ans
- Utilisée à visée de recherche car méthode non « officielle » pour la surveillance des eaux (note DGS du 3 mars 2005)
- Demandes ponctuelles des DDASS ou de certains établissements à visée prédictive d'un risque pour des installations
- En revanche, grande utilité pour l'identification sans ambiguïté des souches de *Legionella* non *pneumophila* isolées par culture
 - ▮ N'agglutinant pas avec les tests disponibles mais possédant les caractères de *Legionella*
 - ▮ Confirmation du genre en 4h
 - ▮ Envoi au CNR pour confirmation du genre et identification de l'espèce si nécessaire : 1/50 résultat non concordant avec le CNR avec une souche issue d'une eau minérale sulfurée
 - ▮ De même, identification des souches de *Staphylococcus aureus* isolées par culture

CONCLUSION

- La qRT-PCR est une méthode aujourd'hui fiable et validée grâce aux travaux de la normalisation
 - Facile à mettre en œuvre du fait de l'existence de kits commerciaux performants et validés
 - Complément utile des techniques traditionnelles par sa très grande spécificité
- ➔ Outil d'avenir qui a déjà modifié les pratiques des laboratoires