

Présentation de la technique PCR appliquée à la recherche de légionelles et d'amibes dans les eaux

Nadia SEFOUHI

AMPLIGENE

Groupe CARSO

Définition de la PCR

PCR= polymérase chain reaction.

Technique de biologie moléculaire
permettant d'amplifier spécifiquement
un fragment d'ADN.

Matériels et équipements

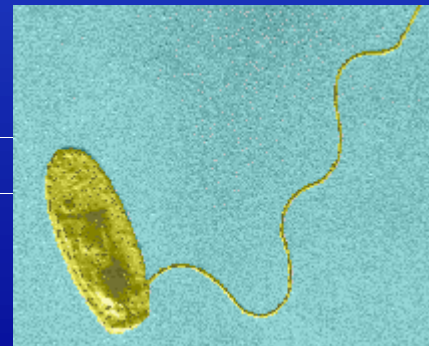
- LightCycler
Appareil de PCR
en temps réel
- MagNa Pure:
automate extraction



1. Recherche des légionelles par PCR

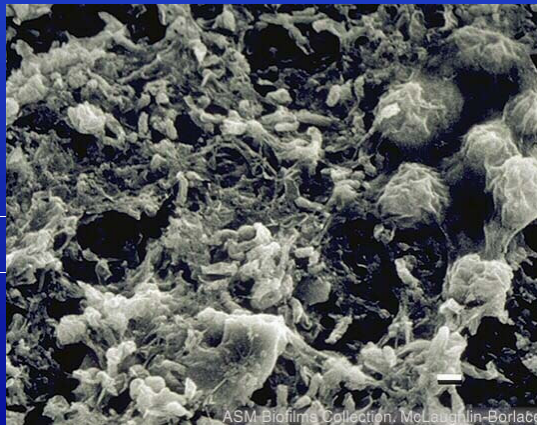
Définition des légionelles

- Bacilles à gram –
- Présentes dans les eaux douces et les sols humides
- 50 espèces dont 20 isolées chez l'homme
- 64 sérogroupes



Définition des légionelles

- Associées à des biofilms
 - -1% des légionelles se situent dans l'eau des réseaux
 - 99% se situent dans les biofilms où sont localisés également les amibes



Processus analytique: 3 étapes (Norme XP T90-471)

- Réception d'un échantillon de 1 litre
 - 1ère étape: concentration de l'échantillon par filtration 100 ml à 1 litre
 - 2ème étape: lyse, extraction et purification de l'ADN total
 - 3ème étape: PCR
- Legionella Spp*
(16S)
- L. pneumophila*
(gène mip)

Interprétation des résultats (1)

Nombre de UG par puits PCR	Résultat	Conclusion
0	<100 UG/l de <i>Legionella</i>	<i>Legionella</i> non détectée
Entre 1 à 24	<500 UG/l de <i>Legionella</i>	Présence de <i>Legionella</i> non quantifiable
>25 (=N)	Nx20 UG/l de <i>Legionella</i>	Présence de <i>Legionella</i>

Interprétation des résultats (2)

- Dans les ECS:
Possibilité de corréler les résultats PCR et les résultats de la culture
- Dans les TAR:
Difficile de corréler les résultats PCR et les résultats de la culture
Les résultats sont souvent plus élevés en PCR

Dans les deux cas, un résultat négatif en UG est prédictif d'un résultat négatif en culture

Normes et accréditation

- Il existe 2 normes:
 - Norme AFNOR: NF T90-431 (méthode par culture)
 - Réglementaire
 - Norme AFNOR PCR: XP T90-471 (avril 2006)
 - **validation de la méthode PCR par des essais inter-laboratoires**
 - Pas de seuil réglementaire
- **AMPLIGENE** accrédité COFRAC pour la méthode PCR depuis novembre 2005

Avantages de la technique PCR

- Rapidité: le délai de rendu des résultats est <24h
- Sensibilité:
 - Limite de détection :100UG/L
 - Détection des bactéries viables cultivables, non cultivables et les bactéries hébergées dans les protozoaires et les amibes.
- Spécificité: pas d'interférence avec la flore associée
- Résultats fiables et reproductibles
- Dosage en même temps des *Legionella* et *Legionella pneumophila*
- Méthode normalisée (XP T90-471)

Pourquoi et quand utiliser la PCR?

- Gérer les crises en cas de dépassement du seuil réglementaire:
 - Indiquer l'efficacité d'un traitement choc
 - Indiquer la survenue d'un problème lors d'un traitement
 - *Analyse PCR 24h*
- Suivre une installation « à risque »: contrôler la prolifération des légionelles pour éviter le dépassement du seuil réglementaire
 - *Analyse PCR hebdomadaire*
- Anticiper les résultats de la norme réglementaire
 - *Analyse PCR mensuelle*

2. Recherche des amibes par PCR

Définition amibe (1)

- Protozoaire de taille variant entre $3\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$ vivant en eaux douces ou salées capable de se déplacer (pseudopodes, flagelles).



Définition amibe (2)

2 types d'amibes:

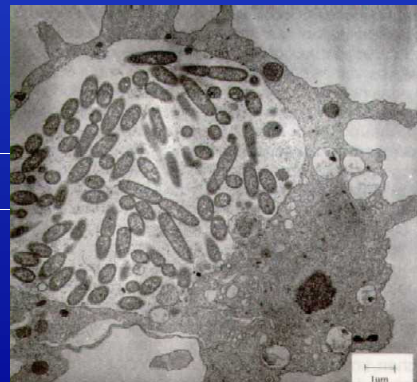
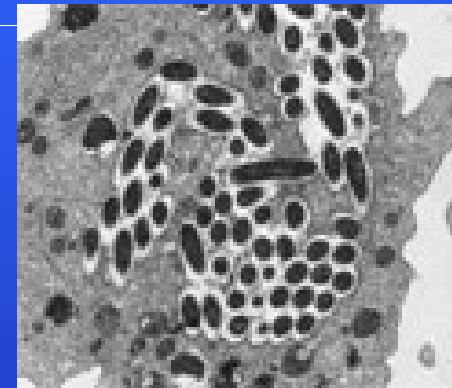
- Libres: évoluent de manière autonome dans l'environnement
- Parasitaires: se développent peu dans l'environnement, sont constamment à la recherche d'un hôte pour leur survie

Intérêt de rechercher les amibes (1)

- Pathogénicité
 - Espèce: *Naegleria fowleri* responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) mortelle à 100%
 - Genre *Acanthamoeba* responsable encéphalite amibienne granulomateuse (EAG)
- Association possible entre amibes pathogènes (*Acanthamoeba*, *Naegleria*) et bactéries pathogènes (*L. pneumophila*)
 - Amibe = vecteur de *légionella*

Intérêt de rechercher les amibes (2)

- 1 amibe peut contenir des centaines de milliers de légionelles
- Genre véhiculant les légionelles:
Naegleria, *Hartmanella*, *Acanthamoeba*



Intérêt de rechercher les amibes (3)

- Amibe confère des propriétés aux légionelles:

Dans les amibes:

- résistance à des conditions d'environnement défavorables: acidité, température, biocides, désinfectants...
- Capacité de proliférer dans les vacuoles des amibes

Les légionelles sont protégés du milieu environnant

Après lyse des amibes:

- Augmente leur virulence vis à vis des cellules de mammifères

1 amibe peut libérer jusqu'à 10 000 *legionella* en l'espace de 36 heures

Processus analytique

- 1ère étape: concentration d'un échantillon de 1 litre par filtration
- 2ème étape: extraction et purification de l'ADN total
- 3ème étape: PCR: amplification de séquences spécifiques
 - Genres: *Naegleria*, *Hartmanella*, *Willaertia*, *vahlkampfia*
 - Genre: *Acanthamoeba*
 - Espèce: *Naegleria fowleri*

Avantages de la PCR amibes

- Technique moins lourde que la méthode par culture
- Pas besoin d'un environnement confiné (laboratoire P3)
- Rapidité de l'analyse: résultats en 24h par PCR
- Permet le criblage rapide des amibes les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement

Conclusion PCR

La PCR est le meilleur outil analytique:

- Pour mesurer la totalité de légionelles présentes dans l'échantillon,
- pour suivre la prolifération des légionelles et des amibes dans les installations à risque,
- pour donner les éléments pertinents pour un traitement efficace,
- et ceci afin d'assurer une meilleure gestion du risque sanitaire.

3. Autre application de la PCR: recherche des virus

**En production ou en développement dans notre
laboratoire**

- Enterovirus
- Rotavirus
- Norovirus
- Adenovirus
- Hépatite A
- Calicivirus
- ...