



Détection et quantification de  
*Legionella pneumophila*  
**Comparaison méthode  
culture /PCR**

Nicole WEILL

Directeur Développement Biologie





# Comparaison méthode par culture /PCR

- Normes
- Transport et traitement des échantillons
- Préparation de l'échantillon
- Processus analytique
- Durée analyses
- Unités
- Limites de détection, quantification
- Flore annexe
- Gestion du risque sanitaire



# Norme

<b>Culture</b>	<b>PCR</b>
<b>NF T90-431*</b> <b>Septembre 2003</b> <b>+ amendement A1</b> <b>Avril 2006</b>	<b>XP T90-471</b>  <b>Avril 2006</b>

\* Document non équivalent à la norme ISO 11731 de 1998



# Transport et traitement des échantillons

<b>Culture</b>	<b>PCR</b>
Transport à température ambiante sur 24h ou à +5°C sur 48h	Transport à température ambiante sur 24h ou à +5°C sur 48h
Filtration 1 litre ou centrifugation 1 litre	Filtration de 0,1 litre à 1 litre
	Possibilité de congeler l'ADN extrait



# Processus analytique

<b>Culture</b>	<b>PCR</b>
Dénombrement par culture de <i>Legionella spp</i> <b>puis</b> <i>L. pneumophila</i>	Dosage d'ADN : quantification <i>Legionella spp</i> <b>et</b> <i>L. pneumophila</i>



# Durée de l'analyse

Culture	PCR
1ere lecture à 3 ou 4 jours 2ème lecture à x jours 3ème lecture à 8 ou 10 jours	Extraction 3 heures PCR 2 heures
Résultats sous <b>10 jours</b>	Résultats sous <b>12 heures</b>



# Unités

<b>Culture</b>	<b>PCR</b>
<b>UFC*</b> Unité Formant Colonie	<b>UG*</b> Unité Génome

\* 1 UFC ou 1UG correspond  
approximativement à 1 bactérie



# Limites de quantification Limites de détection

Même ordre de grandeur pour les 2 méthodes



# Flore annexe (hors légionelles) présente dans l'échantillon

Méthode Culture	Méthode PCR
Gène le dénombrement	Pas d'interférence sur la lecture en raison de la spécificité de la méthode (quantification ADN)
Résultat sous estimé ou ininterprétable	Pas d'interférence sur le résultat

Avantage en faveur de la méthode PCR



# Détection

Type de microorganismes détectables	Méthode Culture	Méthode PCR
<i>Legionella</i> cultivables	oui	oui
<i>Legionella</i> stressées non cultivables	non	<b>oui</b>
<i>Legionella</i> contenues dans des organismes ciliés ou des amibes	non	<b>oui</b>
<i>Legionella</i> mortes	non	<b>non</b>

Avantage en faveur de la méthode PCR



# Synthèse comparative des résultats observés par les 2 méthodes

Résultats observés par PCR	Type d'eau	Résultats observés par culture (méthode de référence )
<i>Legionella</i> non détectées	ECS TAR	Résultats équivalents à ceux observés par PCR
<i>Legionella</i> détectées	ECS TAR	Résultats équivalents à ceux observés par PCR *

\*Résultats en général supérieurs par PCR mais plus représentatifs de la situation sur le terrain (nombre réel de légionelles dans l'échantillon).



# Gestion du risque sanitaire en cas de crise

<b>Culture</b>	<b>PCR</b>
Fréquence des analyses limitée par durée du test (10 jours)	Analyses possibles toutes les 24 heures

Avantage en faveur de la méthode PCR



## Gestion du risque sanitaire

Dans le cadre du suivi du **risque sanitaire** engendré par les légionelles, l'analyse par culture ou par PCR peut être suivie par des analyses plus fines de **séquençage** permettant d'établir la carte d'identité précise des bactéries incriminées.

Par exemple :

- Etablissement d'une relation entre un cas de légionellose déclarée et une contamination de circuit dans un établissement quel qu'il soit.
- Etablissement d'une « cartographie » des souches présentes à un moment donné dans une installation permettant d'appréhender un risque pathogène pour l'environnement humain.



## Conclusion

Dans le cadre du suivi du **risque sanitaire** engendré par les légionelles, la méthode PCR a de nombreux atouts :

1 - Possibilité de détecter des bactéries stressées non cultivables, abritées dans un biofilm ou dans des organismes vivants (type amibes ou ciliés )

→ mesure réelle de la quantité de Légionelles présentes dans un circuit

2 - Délais d'analyse court et donc possibilité de réaction rapide en cas de

- légionellose déclarée

- suivi après contamination d'un circuit d'eau chaude sanitaire ou de tour d'aéroréfrigération.

La détection et la quantification des légionelles par la méthode PCR permet donc une bonne maîtrise du risque sanitaire en général et en particulier dans le cadre de la responsabilité civile des exploitants.