

*Détection moléculaire des bactéries du genre Legionella dans l'eau des tours de refroidissement et l'eau de consommation*

**Geneviève Marchand**  
**Direction de la recherche**

**Nancy Lacombe**  
**Direction des laboratoires**

*Détection moléculaire des bactéries du genre Legionella dans l'eau des tours de refroidissement et l'eau de consommation **et les sols...***

**Geneviève Marchand**  
**Direction de la recherche**

**Nancy Lacombe**  
**Direction des laboratoires**



# *INTRODUCTION*

# Environnements naturels



## Two Related Occupational Cases of *Legionella longbeachae* Infection, Quebec, Canada

Marianne Picard-Masson, Élisabeth Lajoie,<sup>1</sup>  
 Judith Lord,<sup>1</sup> Cindy Lalancette,  
 Geneviève Marchand, Éric Levac,  
 Marc-André Lemieux, Patricia Hudson,  
 Louise Lajoie

The investigation team included members with expertise in infectious diseases and in occupational and environmental health. Public health experts from the Institut national de santé publique du Québec (Quebec City, Quebec), the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité de Montréal (Montreal, Quebec), and the USPHS joined the

# Environnements artificiels

Légionellose, Québec 2012  
LE SOLEIL,  
PATRICE LAROCHE



A decorative fountain in the lobby of the JW Marriott in Chicago is one of the suspected sources of an outbreak of Legionnaires' disease  
<http://www.dailymail.co.uk>

Christchurch's Jellie Park spa pool tests positive for legionella  
FAIRFAX NZ



- **Températures (25 et 42 °C)**
- **Stagnation**
- **Sédiments**
- **Biofilms**
- **Amibes**

## *Effets sur la santé*

- Inhalation d'aérosols de petite taille
  
- Deux maladies :
  - fièvre de Pontiac, ressemble à une grippe
  - maladie du légionnaire, pneumonie très grave

L'espèce responsable de la majorité des infections pulmonaires est

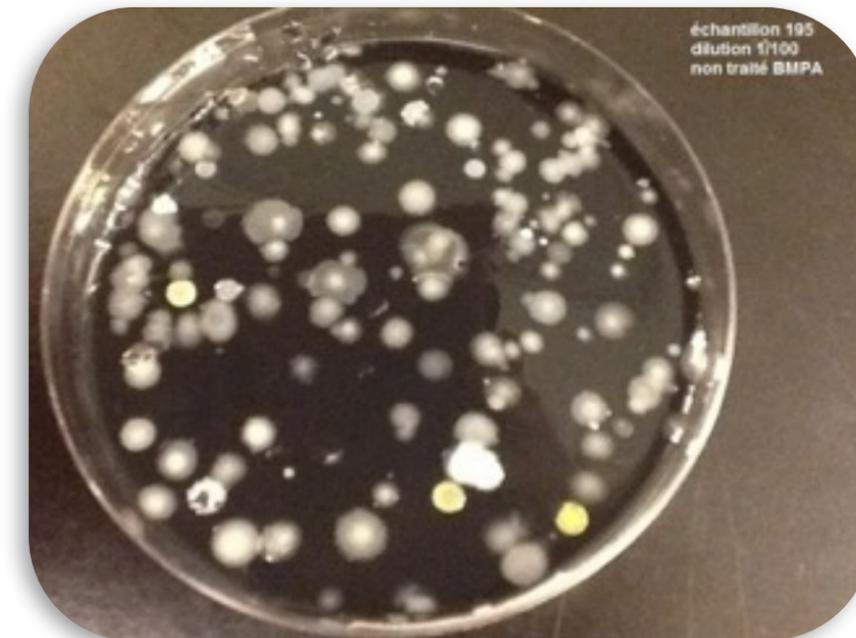
*Legionella pneumophila*

- près de 90 % des cas

Sauf en Australie et en Nouvelle-Zélande *Legionella longbeachea*

## *Méthode d'analyse traditionnelle: La culture bactérienne*

- Période d'incubation de 7 à 10 jours
- Cellules viables, mais non cultivables
- Inhibition par autres bactéries
- Biocides interfèrent avec la croissance
- Pénètrent les amibes
- Très laborieuse



- ❖ Ces limitations produisent une sous-estimation des concentrations réelles
- ❖ *Délais de réponse trop longs pour des interventions efficaces*

A decorative graphic consisting of a light blue circle on the left and a vertical light blue bar extending from the top to the bottom of the page, positioned between the white and dark blue background sections.

*OBJECTIF*

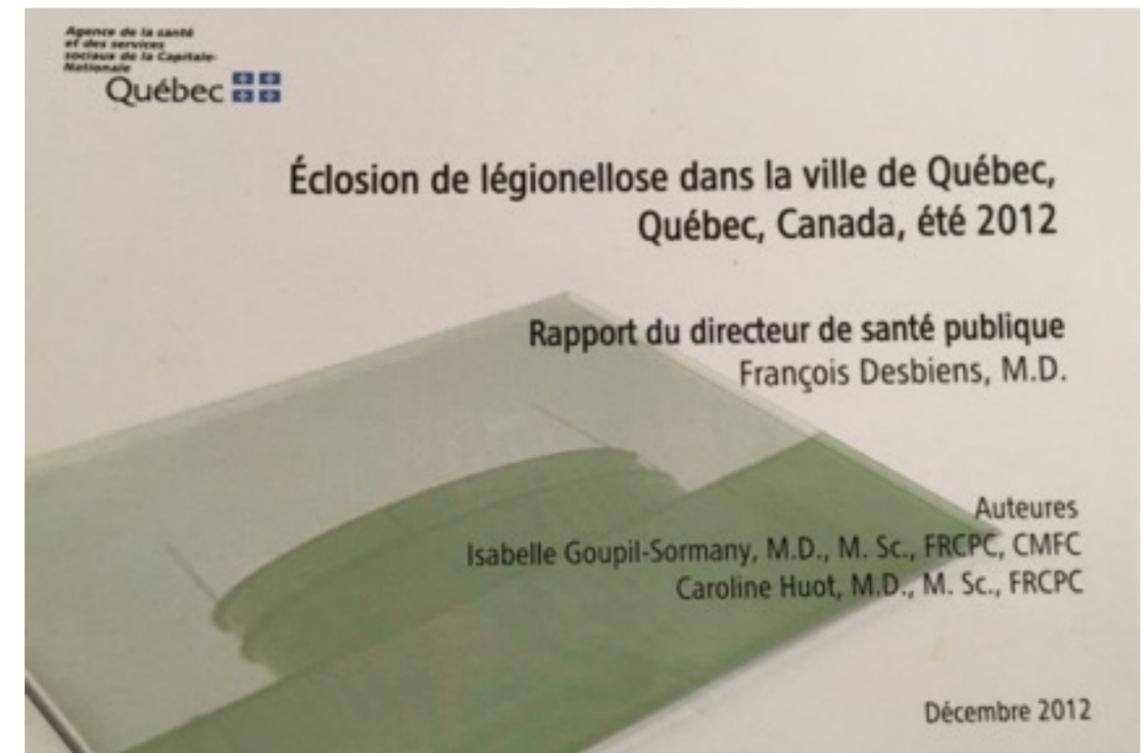
## Objectif

Développer une méthode d'analyse indépendante de la culture microbienne sur milieux gélosés afin d'analyser la bactérie *Legionella pneumophila* dans les eaux de tours de refroidissement et d'eau chaude.

## *Pendant le projet... éclosion à Québec en 2012*

### Recommandations émises :

- Surveillance, prévention et contrôle
- Normes, règlement et contrôle dans les TRE
- Maintien et accès à l'expertise



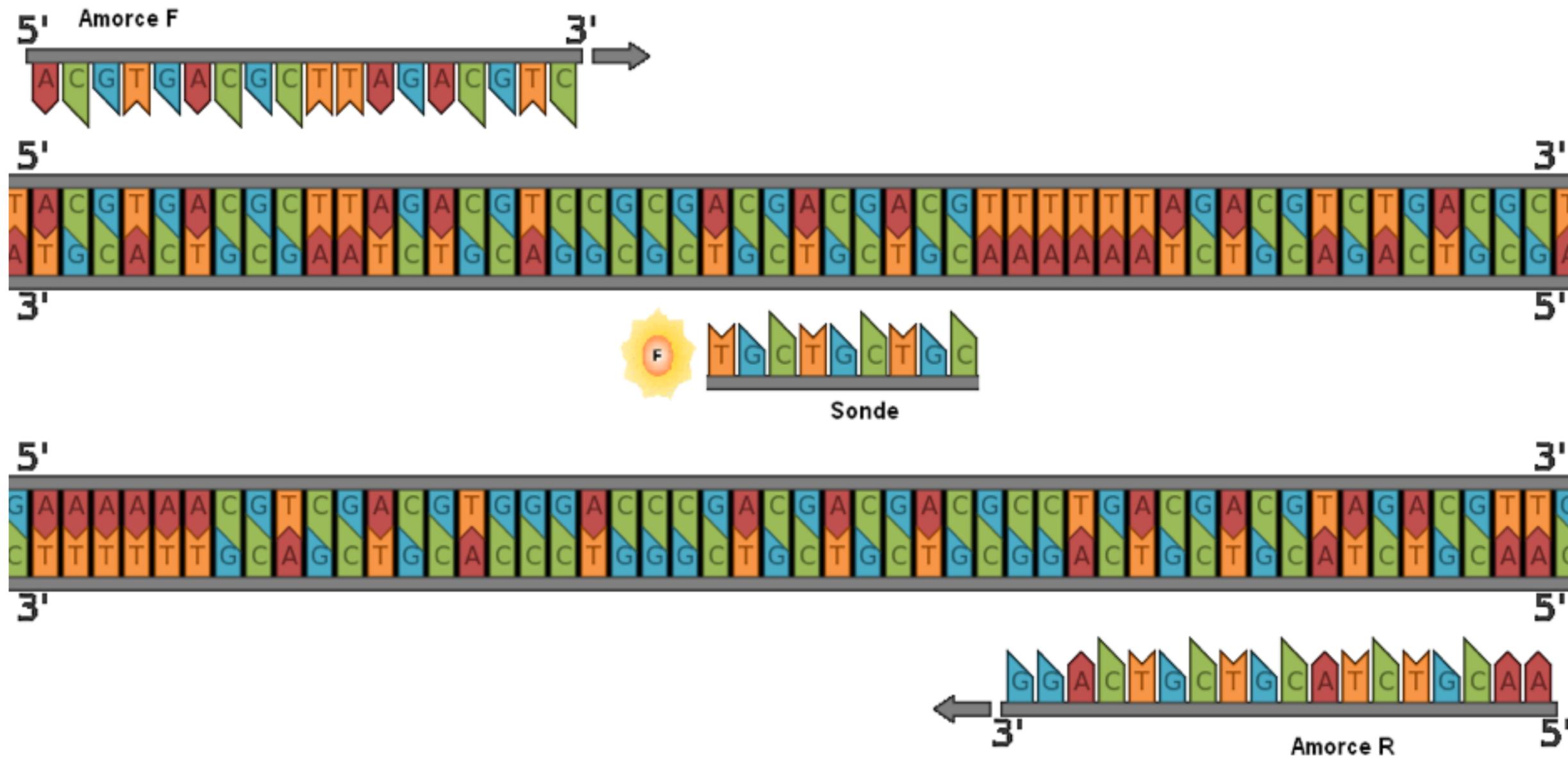
La recommandation 10-a se lit comme suit :

Identification **rapide des sources** d'une éclosion à partir de prélèvements et d'analyses par cultures, **q-PCR** ou toute autre méthode à développer selon leur sensibilité et leur spécificité particulière.

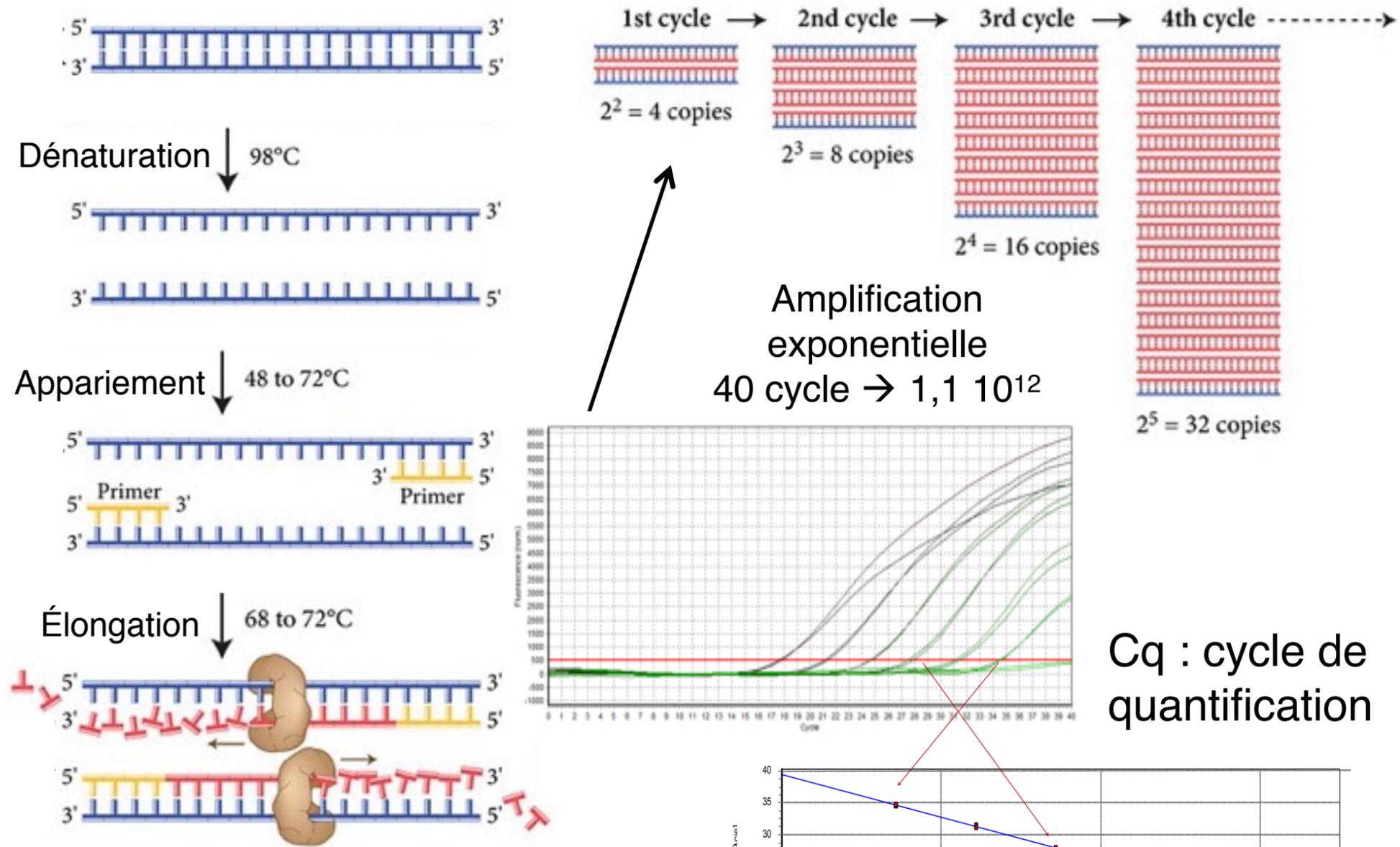


*La PCR*

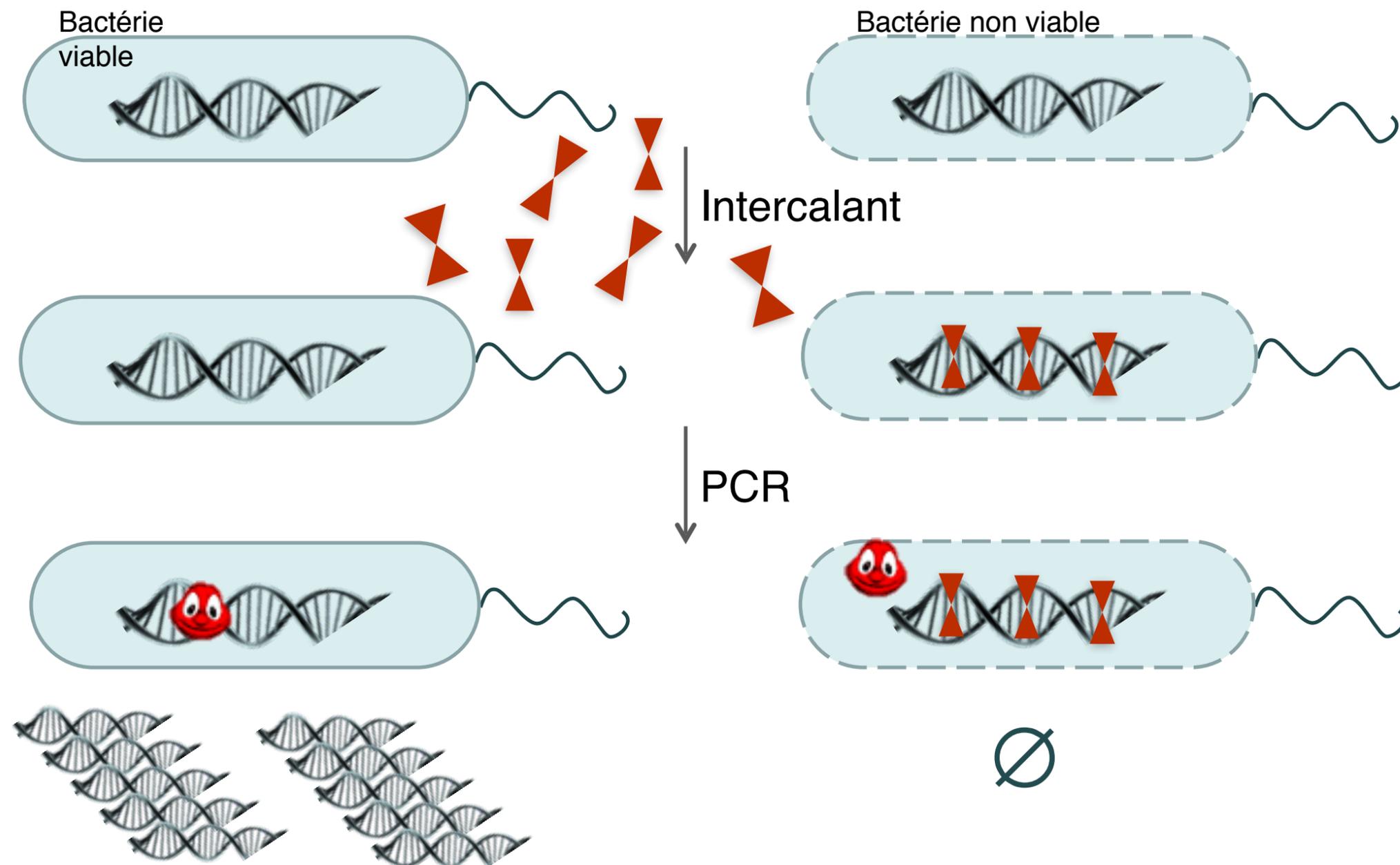
# La réaction cyclique de la méthode PCR



# La réaction cyclique de la méthode PCR



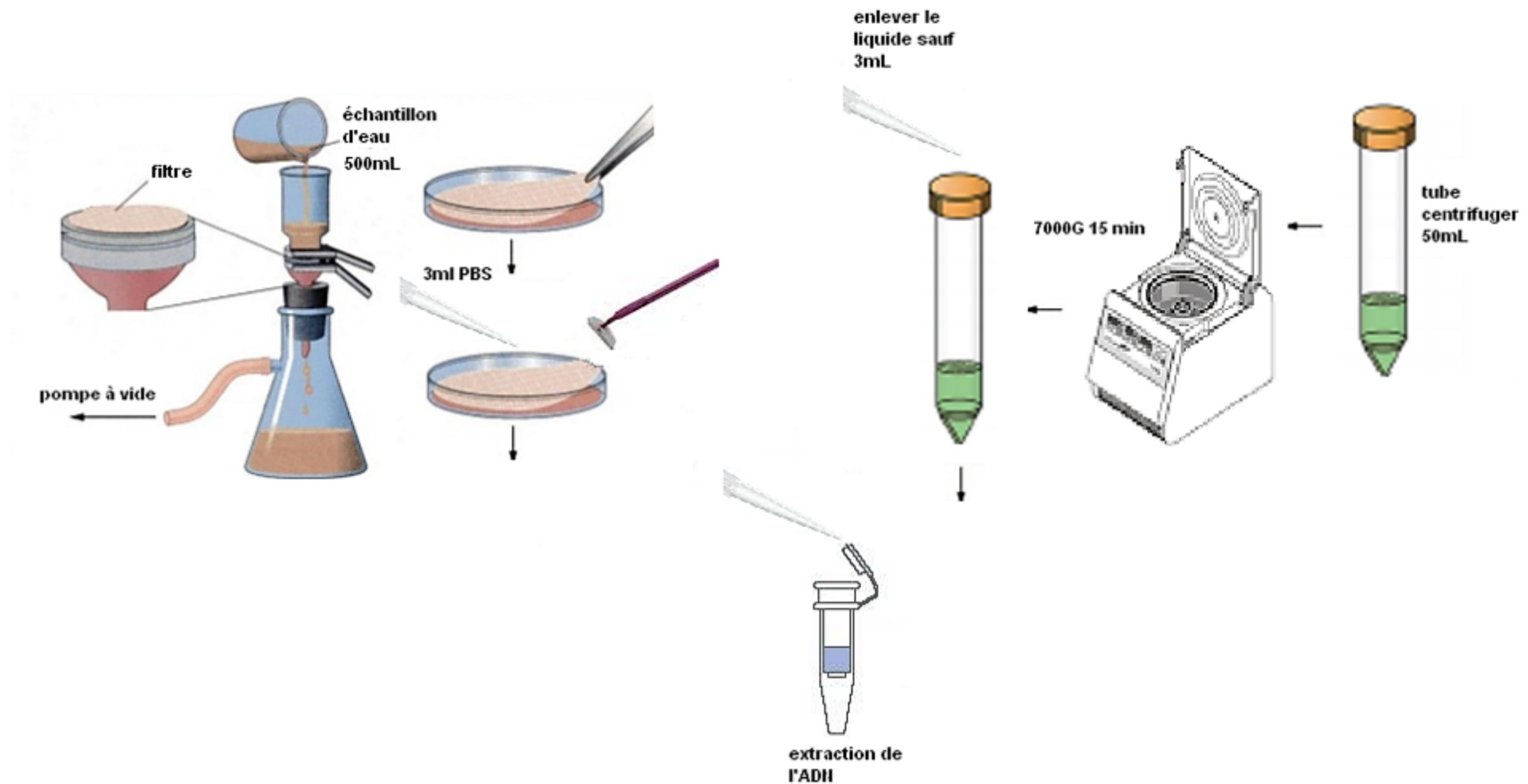
# PCR viable (v-PCR)



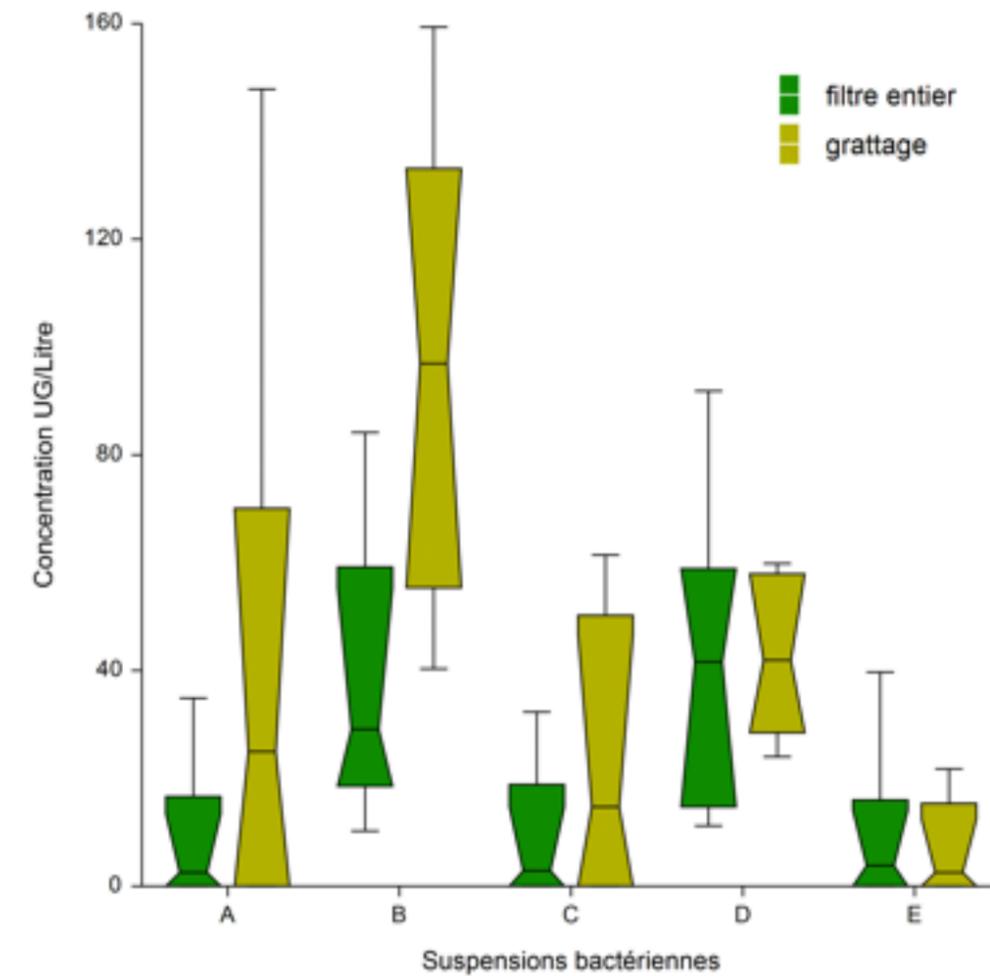
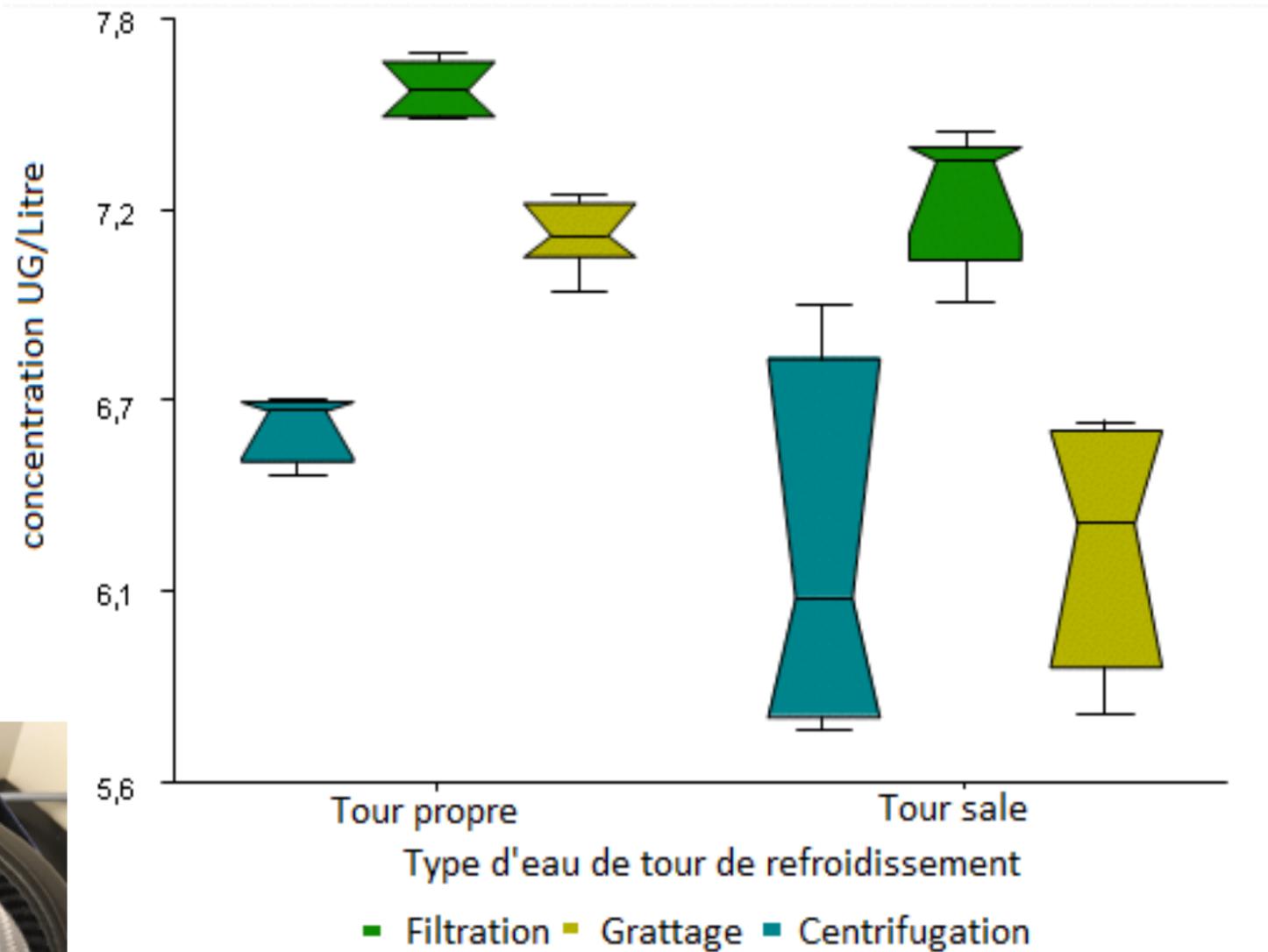


*PRÉPARATION DE  
L'ÉCHANTILLON*

# Concentration de l'échantillon



# Concentration de l'échantillon



\*\*Pas de centrifugeuse réfrigérée à grande capacité lors de la réalisation du projet



# *EXTRACTION DE L'ADN*

# *Extraction de l'ADN*



# Extraction de l'ADN

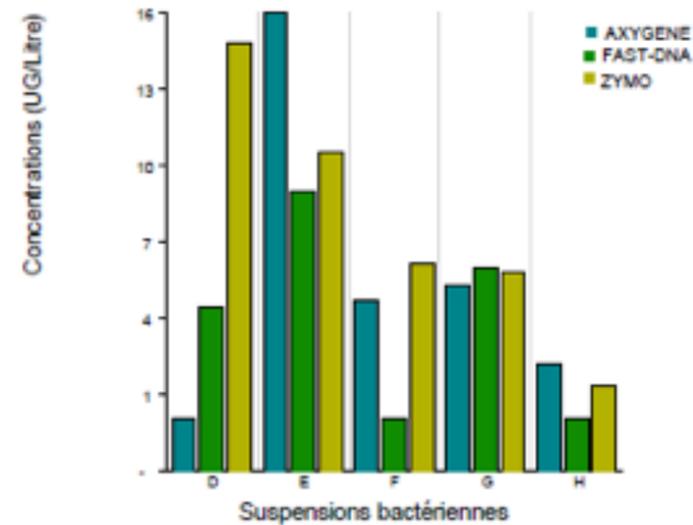
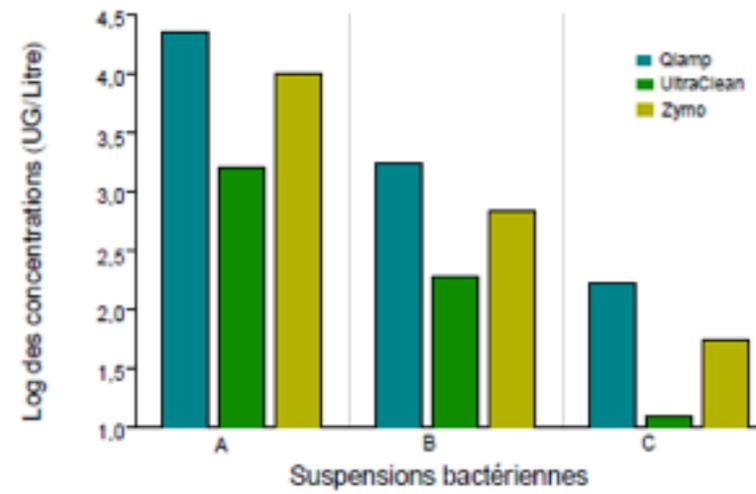


Figure 12 : Comparaison des concentrations de *Legionella pneumophila* obtenues par l'amplification avec le système PT69-PT70: LpneuFL pour différentes méthodes d'extraction (A-H : Suspensions de Legionella).



*MARQUEURS  
MOLÉCULAIRES*

# Évaluation des systèmes de détection moléculaire

Sg1-PB

LpneuLC

L-Mip-PT69

16S rARN

L-Mip-R1548

L-Mip-L920

JRP

JFP

Leg-LC

Mip-R2

wzt

JamT

LpneuFL

LpR

JamF

Mip-F1

P66

LpF

Leg -FL

ssrA

PAN leg-P

Mip

L-Mip-PT70

Leg 705

P65

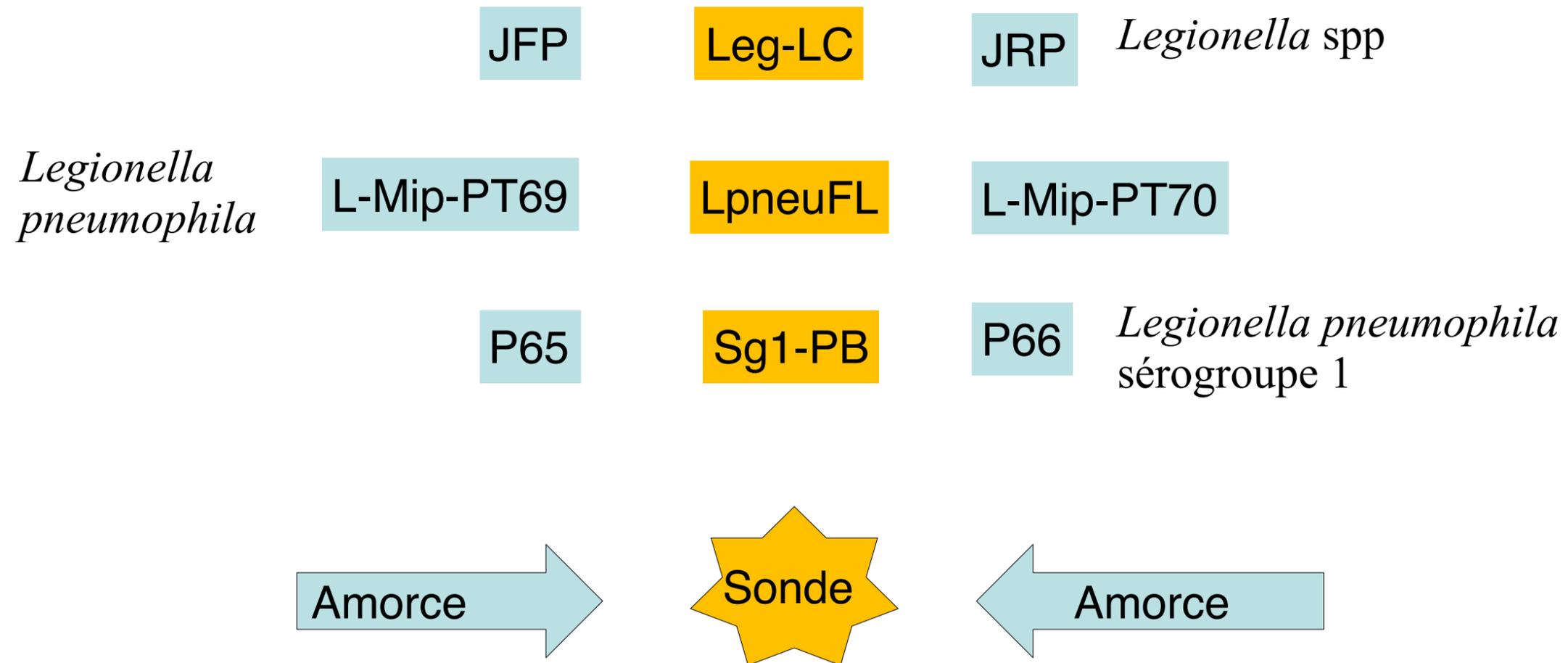
Mip-R2

LpT

JamR

Mip-F2

# Les systèmes de détection moléculaire sélectionnés



# Sélectivité et spécificité

## *Legionella pneumophila* marqueur PT69-PT70 : LpneuFL

	Positif	Négatif
<i>Legionella pneumophila</i>	130	0
<i>Legionella sp</i>	3	35
Autres genres	1	110

100 %

8 %  
<1 %



3 %

## *Legionella spp* marqueur JFP/JRP : LegLC.

	Positif	Négatif
<i>Legionella spp</i>	177	0
Autres genres	1	110

100 %

<1 %

→ *Fluoribacter gormanii*

## *Legionella pneumophila* sérotype 1 marqueur P66/P65 : Sg1.

	Positif	Négatif
<i>Legionella pneumophila (Sg 1)</i>	19	1
<i>Legionella pneumophila (non Sg1)</i>	3	77
<i>Legionella spp</i>	0	18
Autres genres	0	94

95 %

4 %  
0 %  
0 %



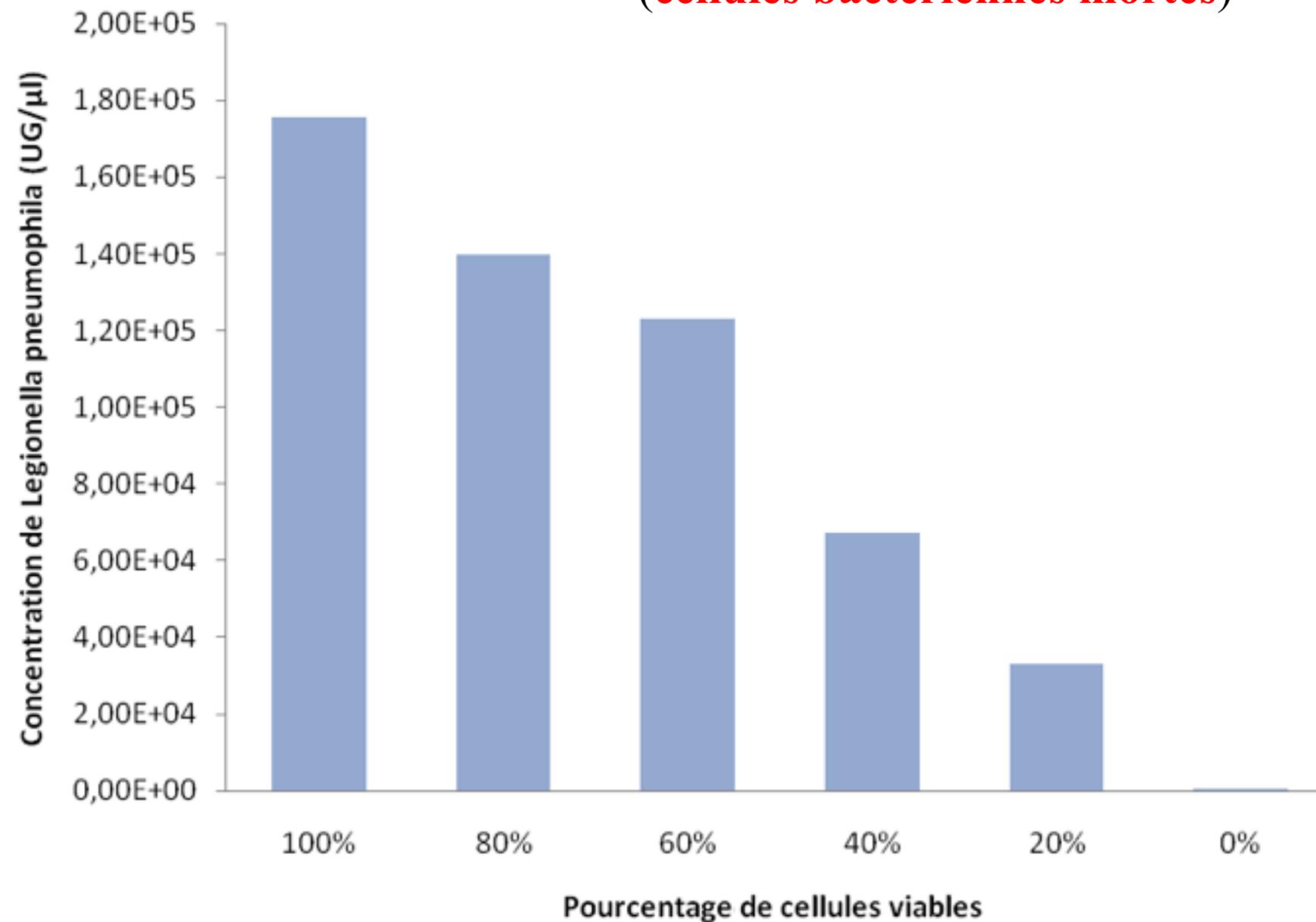
1,4 %

*PERFORMANCES*

*V-PCR*

# Performance de la *v*-PCR

Préparation d'un mélange de cellules fraîches et de cellules autoclavées  
**(cellules bactériennes mortes)**





*COMPARAISONS  
CULTURES*

*q-PCR*

*v-PCR*

## Culture vs q-PCR – Essais de performance

	<i>Legionella spp</i>	<i>L. pneumophila</i>	Négatif
CDC	14	2	8
PCR	11	3	10
Culture	3	2	19

- Les essais de performance de la CDC ont connu certaines difficultés
- Le laboratoire participe maintenant aux essais de la FEPTU (Angleterre)
  - De nouvelles comparaisons seront effectuées éventuellement

## Culture vs q-PCR et v-PCR - Échantillons TRE

<i>Legionella spp</i>	PCR JFP/JRP : Leg LC			
	q-PCR		v-PCR	
Culture	Positive	Négative	Positive	Négative
Positive (46)	46 (100 %)	0	38 (82,6 %)	6 (13 %)
Négative (13)	8 (61,5 %)	5 (38,5 %)	5 (38,5 %)	7 (15,2 %)

<i>Legionella pneumophila</i>	PCR PT69-PT70 : Lpneu FL			
	q-PCR		v-PCR	
Culture	Positive	Négative	Positive	Négative
Positive (43)	39 (90,7 %)	2 (4,6 %)	26 (60 %)	13 (30 %)
Négative (15)	3 (20 %)	9 (60 %)	0	10 (66,7 %)

Les % calculés prennent en considération les DT.

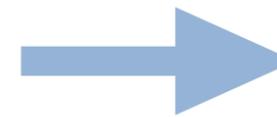


# *PORTÉES ET LIMITES*

## *Les plus*

### Systemes de détection

- *Legionella pneumophila* Sg1
- *Legionella pneumophila*
- *Legionella spp*



Bonne efficacité  
Bonne spécificité

Analyse **rapide** en situation critique-éclosion

Et en tout temps...

Analyse d'échantillon ayant une charge élevée en bactéries hétérotrophes

➤ Situation présente dans certaines industries

## *Les moins*

Pas encore acceptée par la législation québécoise

- **Reconnue en 2015 dans le guide d'intervention du MSSS**

Complexité d'analyse en présence d'inhibiteur de la PCR

- **Utilisation de la dd-PCR**

Variabilité de la performance selon les méthodes de préparation de l'échantillon et de l'extraction de l'ADN



- **Extraction par billes magnétiques maintenant en place**
- **Demeure à l'affût des trousse d'extraction**



# *CONCLUSION*

## Conclusion

- Disponibilité de la méthode de détection et de quantification des *Legionella* utilisant la q-PCR et la **v-PCR** disponible pour :
  - procédés (TRE de climatisation et industrielle)
  - consommation (eau chaude, spa, fontaine)
  - sols

**La connaissance des limitations méthodologiques permet d'interpréter les résultats avec intelligence.**

