



Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-887



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

Geneviève Marchand
Nancy Lacombe



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

travaillent pour vous !

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.
De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.
www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CSST.
Abonnement : www.csst.qc.ca/AbonnementPAT

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2015
ISBN : 978-2-89631-822-3 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
Juillet 2015



Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-887

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

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Geneviève Marchand, Nancy Lacombe

IRSST



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

SOMMAIRE

Les bactéries du genre *Legionella* sont répandues dans plusieurs environnements tant naturels qu'artificiels. Les concentrations rencontrées dans les environnements naturels sont très faibles. Les phénomènes de contamination se rencontrent principalement dans les réservoirs artificiels où les températures de l'eau sont maintenues entre 25 et 42 °C, et où existe une certaine stagnation ainsi que la présence de dépôts, de biofilms et d'amibes. Les bains à remous, les piscines, les condensateurs d'évaporation, les brumisateurs et les tours de refroidissement sont reconnus comme étant des sources responsables de l'éclosion de légionellose en raison de la croissance importante des bactéries du genre *Legionella* dans ces milieux.

La bactérie du genre *Legionella* est responsable de deux maladies, la fièvre de Pontiac qui est une infection pulmonaire ressemblant à une grippe et la maladie du légionnaire qui est une pneumonie grave. Les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des États-Unis ont rapporté plus de 6 800 cas de légionellose en 2009-2010 et la France a recensé 1 298 cas confirmés en 2012.

Un nouveau règlement modifiant le Code de sécurité intégrant des dispositions relatives à l'entretien d'une installation de tour de refroidissement à l'eau est entré en vigueur au Québec en juillet 2014. Ce règlement impose un suivi des concentrations de *Legionella pneumophila* dans l'eau des tours de refroidissement. Une tour de refroidissement ne doit pas contenir des concentrations en *Legionella pneumophila* considérées comme représentant un risque pour la population ou les travailleurs.

À la suite de l'éclosion de légionellose de l'été 2012 dans la ville de Québec, le directeur de la santé publique a émis des recommandations. Une de celles-ci consistait à mettre en place une méthode pour faire « l'identification rapide des sources lors d'une éclosion à partir de prélèvements et d'analyses par culture, q-PCR ou toutes autres méthodes à développer selon leur sensibilité et leur spécificité particulières ».

Cette étude a permis de valider trois systèmes moléculaires de détection et de quantification de la bactérie *Legionella* dans les échantillons d'eau. Les trois systèmes se sont révélés être très spécifiques pour effectuer cette analyse. Un premier système (JFP/JRP: LegLC) détecte l'ensemble des espèces du genre *Legionella*, un second (PT69-PT70: lpneuFL) est spécifique pour l'espèce *Legionella pneumophila* et le troisième (P66/P65: Sg1) est très spécifique pour les *Legionella pneumophila* appartenant au sérotype 1¹⁸. En plus de pouvoir utiliser ces systèmes pour confirmer une identification lorsque la méthode par culture est employée, ils pourront être appliqués pour faire une analyse rapide et spécifique directement à partir des échantillons d'eau. La qualité de l'extrait d'ADN est très importante pour la réalisation de la polymérase en chaîne (PCR). Un ADN de qualité produit de meilleures quantifications en raison d'un plus grand contrôle des inhibiteurs. Du fait des risques d'inhibition de la PCR, il est essentiel d'inclure les contrôles nécessaires pour tous les échantillons. Les trousse d'extraction ont démontré des résultats très variables entre elles. Cette étape du processus analytique doit être contrôlée et suivie afin de produire des extraits de qualité pour la PCR.

Bien que cette approche de détection et de quantification par la PCR ne puisse remplacer, pour l'instant, la méthode par culture reconnue dans le règlement, elle est néanmoins en mesure, dans certaines situations critiques, de fournir des résultats beaucoup plus rapidement en plus de pouvoir produire des résultats d'analyse pour certains échantillons ayant une charge microbienne hétérotrophe élevée et ne pouvant être analysés par la méthode traditionnelle de culture, comme c'est le cas actuellement pour certaines industries québécoises. L'ensemble des contrôles incorporés au processus analytique permet de renforcer la confiance dans la robustesse des résultats, même pour ces échantillons qui ont une composition très complexe.

Bien que peu de corrélations aient été démontrées entre les résultats quantitatifs par PCR et ceux par culture, il est important de souligner que tous les échantillons positifs déterminés par la méthode de culture l'ont également été lorsqu'analysés par la méthode de la PCR. C'est-à-dire qu'aucun résultat faux négatif n'a été produit par nos systèmes. Ceci renforce son utilisation pour la confirmation de la non-contamination des systèmes de refroidissement industriels qui sont pratiquement impossibles à analyser par la méthode de culture.

Cette étude fournit une approche analytique permettant de caractériser à trois niveaux de spécification, soit au niveau du genre (*Legionella spp*), de l'espèce (*Legionella pneumophila*) et plus spécifiquement du sérogroupe 1 de cette espèce. Toutes les étapes de validation et d'optimisation ont permis d'identifier et de mettre en place un processus analytique fiable et robuste pour la détection de la bactérie dans la majorité des échantillons liquides.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	ix
GLOSSAIRE.....	xi
SIGLES ET ACRONYMES	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1 La bactérie et son environnement	1
1.2 Effets sur la santé	1
1.3 Réglementation au Québec	1
1.4 Incidence en milieu de travail	2
1.5 Méthodes d'analyse	3
1.5.1 Culture bactérienne	3
1.5.2 Biologie moléculaire par PCR	3
1.5.3 La PCR en temps réel (q-PCR).....	5
1.5.4 La PCR pour les cellules viables ou la v-PCR.....	7
1.5.5 La PCR et la Legionella.....	7
2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	9
3. MÉTHODOLOGIE.....	11
3.1 Évaluation des systèmes de détection	11
3.1.1 Diversité des souches bactériennes disponibles.....	11
3.1.2 Extraction de l'ADN des souches bactériennes	11
3.1.3 Vérification de la spécificité des amorces d'amplification.....	12
3.1.4 Vérification et optimisation des systèmes avec sondes de détection.....	14
3.2 PCR viable (v-PCR).....	16
3.2.1 Effet des agents de blocage sur le caractère cultivable des Legionella spp.....	17
3.2.2 Performance du PMA	18
3.3 Préparation du concentrat de l'échantillon	18
3.3.1 Par filtration	18
3.3.2 Par centrifugation.....	19
3.4 Extraction de l'ADN du concentrat d'échantillon	19
3.5 Purification de l'ADN.....	20
3.6 Contrôles de la méthode PCR.....	20
3.6.1 Contrôle négatif	20
3.6.1.1 Extraction.....	20
3.6.1.2 Amplification	20

3.6.2	Contrôle positif	20
3.6.2.1	Amplification avec souche.....	20
3.6.2.2	Amplification avec contrôle interne (IPC).....	20
3.6.2.3	Ajout dosé	21
3.7	Comparaison avec la méthode cultivable	21
3.7.1	Échantillons provenant d'essais de performance	21
3.7.2	Échantillons terrains.....	21
3.8	Contrôle de l'inhibition.....	21
3.9	Analyses statistiques	21
4.	RÉSULTATS	23
4.1	Évaluation des systèmes de détection	23
4.1.1	Extraits d'ADN des souches bactériennes de la collection.....	23
4.1.2	Vérification des amorces d'amplification spécifiques	24
4.1.2.1	Gradients de température	24
4.1.2.2	Essais d'inclusion et d'exclusion des amorces spécifiques	24
4.1.3	Validation des systèmes amorces/sonde	25
4.1.3.1	PT69-PT70: LpneuFL (<i>Legionella pneumophila</i>)	26
4.1.3.2	PT69-PT70: LpneuLC (<i>Legionella pneumophila</i>).....	26
4.1.3.3	JFP/JRP: LegLC (<i>Legionella spp</i>)	27
4.1.3.4	PAN-F-PAN-leg-R: PAN leg-P (<i>Legionella spp</i>).....	27
4.1.3.5	P66/P65: Sg1 (<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1)	28
4.2	PCR viable (v-PCR).....	29
4.2.1	Effet des agents de blocage sur la capacité de culture résiduelle des <i>Legionella pneumophila</i>	29
4.2.2	Performance du PMA	29
4.3	Préparation du concentrat de l'échantillon	30
4.4	Extraction de l'ADN contenu dans le concentrat d'échantillon	32
4.5	Purification de l'ADN.....	34
4.6	Contrôles de la méthode PCR.....	34
4.6.1	Contrôles positifs	34
4.7	Essais du contrôle de l'inhibition par l'albumine	35
4.7.1	Critères de la réaction PCR et des extraits d'ADN.....	35
4.8	Comparaison résultats : PCR par rapport à culture.....	36
4.8.1	Échantillons provenant d'essais de performance	36
4.8.2	Échantillons terrains.....	37
5.	DISCUSSION	45
5.1	Évaluation des systèmes de détection	45
5.1.1	Dosage de l'ADN des souches bactériennes de la collection	45
5.1.2	Vérification des amorces.....	45
5.1.3	Validation des systèmes amorces/sonde	45
5.2	PCR viable (v-PCR).....	46
5.3	Préparation du concentrat de l'échantillon	47
5.4	Extraction de l'ADN de l'échantillon	47
5.5	Les contrôles de la méthode PCR.....	48

5.6	Comparaison résultats : PCR par rapport à culture.....	49
5.7	La portée	50
5.8	Les limites	50
5.9	Applicabilité des résultats	51
6.	CONCLUSION.....	52
	BIBLIOGRAPHIE	53
	ANNEXE A : Liste des souches bactériennes utilisées pour la validation des systèmes de détection	63
	ANNEXE B : Dosage ADN des souches de la banque et ratio de la densité optique mesurée à 260 nm et 280 nm	79
	ANNEXE C : Abrégé de la méthode et Sommaire de la démarche recommandée pour l'analyse de <i>Legionella</i> par PCR	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Mesures à prendre en fonction de la concentration en <i>Legionella pneumophila</i>	2
Tableau 2 :	Amorces universelles testées pour vérifier l'amplification du gène codant pour l'unité 16S des bactéries de la banque de l'IRSST.	12
Tableau 3 :	Paires d'amorces testées pour utilisation dans un système de détection de la <i>Legionella</i> par amplification PCR.....	13
Tableau 4 :	Sonde de type TaqMan® avec les amorces spécifiques.....	15
Tableau 5 :	Combinaisons des traitements pour le blocage d'amplification de l'ADN de <i>Legionella pneumophila</i>	17
Tableau 6 :	Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur PT69-PT70: LpneuFL.	26
Tableau 7 :	Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur JFP/JRP: LegLC.....	27
Tableau 8 :	Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur P66/P65: Sg1.	28
Tableau 9 :	Condensé des résultats attribuables à un contrôle interne d'amplification (IPC).	34
Tableau 10 :	Résultats obtenus par les méthodes de culture sur gélose et par la méthode de la q-PCR comparativement à ceux attendus par la CDC. Résultats non quantitatifs, présentés sous forme de présence/absence.	36
Tableau 11 :	Résultats obtenus sur des échantillons provenant du terrain par les méthodes de culture et de PCR pour les systèmes de détection LegLC et LpneuFL. Comparaisons de type présence/absence.....	38
Tableau 12 :	Analyse de variance effectuée sur les trois méthodes d'analyse (culture, q-PCR, v-PCR) pour les systèmes JFP/JRP: LegLC, et PT69-PT70: LpneuFL.	42
Tableau 13 :	Analyse de comparaison multiple de Tukey-Kramer effectuée sur les trois méthodes d'analyse. Méthode de culture comparée aux méthodes q-PCR et v-PCR pour les systèmes JFP/JRP: LegLC et PT69-PT70: LpneuFL.	42
Tableau 14 :	Liste des marqueurs utilisés dans les trois différents systèmes de détection moléculaire pour l'analyse de la <i>Legionella</i>	96
Tableau 15 :	Sommaire de la sélectivité des trois systèmes de détections moléculaires pour l'analyse de la <i>Legionella</i>	96

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	La réaction cyclique de la méthode PCR.	4
Figure 2 :	Courbe de la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles de la PCR.	5
Figure 3 :	Construction d'une courbe standard pour le système PT69-PT70: LpneuFL. Nombre de cycles (Ct) en fonction de la concentration d'ADN (ng/μl).	6
Figure 4 :	Programme d'amplification utilisé pour la réalisation des essais de spécificité et de sélectivité effectués sur les amorces JFP/JRP.	14
Figure 5 :	Programme d'amplification utilisé pour la réalisation des essais de spécificité et de sélectivité effectués sur le système JFP/JRP: LegLC.	16
Figure 6 :	Courbes d'amplification de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Amplification des extraits d'ADN provenant de la banque avec les amorces 517F et 1387R (gène codant pour le 16S).	23
Figure 7 :	Représentation des courbes d'amplification par q-PCR et SYBR® Green obtenues pour les deux paires d'amorces conservées lors des essais de spécificité : a) JFP/JRP et b) Lp-mip-PT69-Lp-mip-PT70.	25
Figure 8 :	Exemple représentant les courbes d'amplification par q-PCR et la détection Taqman® obtenues pour les essais de spécificité et de sélectivité effectués avec le système P66/P65 : LegSg1 : a) Spécificité, b) Sélectivité.	29
Figure 9 :	Concentrations (UG/μl) de <i>Legionella pneumophila</i> détectées par l'approche de la v-PCR avec les amorces PT69-PT70 dans des bouillons de culture ayant des proportions variables de cellules cultivables et non cultivables. Concentration initiale de 10 ⁷ UFC/ml. La durée du traitement est de 10 minutes et la concentration de PMA est de 100 μM.	30
Figure 10 :	Graphique en boîte représentant les concentrations de <i>Legionella pneumophila</i> obtenues pour chaque traitement appliqué de concentration/extraction des cellules bactériennes de l'échantillon. Résultats obtenus par l'analyse avec le système PT69-PT70: LpneuFL. Essais réalisés sur des eaux provenant de tours de refroidissement dites propres et sales selon la charge de la matière en suspension dans l'eau. Trousse d'extraction utilisée Fast DNA.	31

Figure 11 :	Graphique en boîte représentant les concentrations de <i>Legionella pneumophila</i> obtenues pour chaque traitement de concentration/extraction des cellules bactériennes de l'échantillon appliqué. Résultats obtenus par l'analyse avec le système PT69-PT70: LpneuFL. Essais réalisés sur des suspensions bactériennes préparées à partir d'eau de tours dites propres. Trousse d'extraction utilisée ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep TM	32
Figure 12 :	Comparaison des concentrations de <i>Legionella pneumophila</i> obtenues par l'amplification avec le système PT69-PT70: LpneuFL pour différentes méthodes d'extraction. (A-H : Suspensions de Legionella).....	33
Figure 13 :	Comparaison des concentrations de <i>Legionella pneumophila</i> mesurées dans des échantillons terrains avec et sans albumine ajoutée à la réaction PCR.....	35
Figure 14 :	Droites de tendance et coefficients de corrélation entre les résultats obtenus par la méthode q-PCR et ceux obtenus par la méthode par culture ainsi que les résultats attendus de la CDC.....	37
Figure 15 :	Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par la méthode de culture et ceux obtenus par les méthodes de q-PCR et v-PCR pour le système PT69-PT70: LpneuFL.....	39
Figure 16 :	Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par la méthode de culture et ceux obtenus par les méthodes de q-PCR et v-PCR pour le système JFP/JRP: LegLC.	39
Figure 17 :	Représentation graphique des éclipses de probabilité obtenues pour les méthodes de PCR en fonction de la méthode par culture pour les systèmes LpneuFl et Leg LC. Haut: LpneuFL; bas: Leg LC; gauche q-PCR et droite v-PCR.	40
Figure 18 :	Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par méthodes de q-PCR et de v-PCR pour le système PT69-PT70: LpneuFL.	41
Figure 19 :	Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par méthodes de q-PCR et de v-PCR pour le système JFP/JRP: LegLC.....	41
Figure 20 :	Histogramme représentant les concentrations obtenues par les trois méthodes pour les systèmes JFP/JRP: LegLC, et PT69-PT70: LpneuFL.....	43

GLOSSAIRE

ADN : L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule qui est utilisée dans la nature comme support du matériel génétique des êtres vivants. Il est formé des acides nucléiques : adénine, guanine, cytosine, thymine.

ADN polymérase : Enzyme qui intervient dans la réplication de l'ADN.

Amorces : Courte séquence d'ADN, complémentaire au début d'une matrice que l'on veut multiplier et servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette matrice par un ADN polymérase.

Amplification d'ADN : copie d'une matrice d'ADN par l'ADN polymérase.

Concentrat : Culot cellulaire préparé dans le but d'augmenter la concentration de bactéries par unité de volume d'une suspension avant de l'analyser.

Intercalant d'ADN : Molécule qui s'insère entre les deux brins d'ADN.

***Legionella spp* :** Ensemble des espèces de *Legionella*, qui en regroupe plusieurs en même temps.

***Legionella sp* :** Espèce particulière de *Legionella*, mais dont l'identité est inconnue.

Marqueur moléculaire : Séquence moléculaire qui révèle les modifications du patrimoine génétique. Les marqueurs moléculaires sont des indicateurs de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre familles, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. Ils sont utilisés, entre autres, pour faire la sélection des séquences qui serviront à construire les oligonucléotides des amorces et des sondes moléculaires.

PCR : Sigle anglais de *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne. Technique d'amplification enzymatique de l'ADN par la Taq polymérase qui permet, à partir d'un fragment d'ADN, d'obtenir un grand nombre (plusieurs millions) de copies identiques de ce même fragment.

Oligonucléotide : Court segment d'acide nucléique, long de quelques dizaines de nucléotides obtenu par synthèse chimique, sous forme de simple brin.

q-PCR : PCR quantitative, méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN aussi appelé PCR en temps réel.

Séquence d'ADN : Ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN.

Sonde : Oligonucléotide servant à s'accrocher à une séquence ciblée selon les marqueurs moléculaires identifiés. Est utilisée pour la détection.

v-PCR : PCR viable, méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de bloquer l'amplification de l'ADN qui n'est pas contenu dans une cellule intacte.

SIGLES ET ACRONYMES

ADNdb ou dsDNA : ADN double brin

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC : *American Type Culture Collection*

BCYE : *Buffered Charcoal Yeast Extract*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

Ct : *Threshold cycle* ou cycle de seuil

DEL : Diode électroluminescente (*Light-Emitting Diode*)

dNTP : Appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides dans une solution

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EMA : Ethidium monoazide

FAM[™] : Fluorescein amidite

IPC : *Internal Positive Control* (contrôle interne d'amplification)

ISO : *International Organization for Standardization* ou Organisation internationale de normalisation

mip : *Macrophage Infectivity Potentiator*

OHSA : *Occupational Safety and Health Administration*

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)

PMA : Propidium monoazide

RBQ : Régie du bâtiment du Québec

T_m : Température d'appariement théorique

U : Unité de polymérase

UFC : Unité formatrice de colonie

UG : Unité génomique

VIC® : Fluorescence moléculaire de structure inconnue

1. INTRODUCTION

1.1 La bactérie et son environnement

Les bactéries du genre *Legionella* sont répandues dans plusieurs environnements tant naturels qu'artificiels. Les concentrations rencontrées dans les environnements naturels sont très faibles, souvent bien en dessous des limites de détection des méthodes analytiques. Dans certaines situations, la croissance de *Legionella* dans les réservoirs artificiels est favorisée par les conditions de fonctionnement des systèmes de refroidissement⁴. Les phénomènes de contamination se rencontrent principalement dans les réservoirs où les températures de l'eau sont maintenues entre 25 et 42 °C et où une certaine stagnation, la présence de sédiments, de biofilms et d'amibes sont rencontrées. Les bains à remous, les piscines, les condensateurs d'évaporation, les brumisateurs et, évidemment, les tours de refroidissement sont reconnus comme étant des sources responsables de l'éclosion de légionellose, en raison de la croissance importante des bactéries du genre *Legionella* dans ces environnements¹⁻⁵.

1.2 Effets sur la santé

La maladie peut se contracter lors de l'inhalation de fins aérosols d'eau contaminés par cette bactérie⁶. Il n'y a pas d'évidence que la maladie puisse être transmise d'une personne à une autre⁷. La bactérie du genre *Legionella* est responsable de deux maladies, la fièvre de Pontiac, qui est une infection pulmonaire ressemblant à une grippe, et la maladie du légionnaire, qui est une pneumonie très grave⁸⁻¹¹. Le genre *Legionella* est actuellement constitué de 52 espèces et 71 sérogroupes. Une vingtaine d'espèces sont reconnues comme étant pathogéniques¹²⁻¹⁷. L'espèce responsable de la majorité des infections pulmonaires est *Legionella pneumophila*. Elle serait responsable de près de 90 % des cas de maladie^{12,13,16}. Les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des États-Unis ont rapporté plus de 6 800 cas de légionellose en 2009-2010. À l'instar d'autres chercheurs, ils attribuent 84 % des cas de maladie aux *Legionella pneumophila* des sérogroupes 1, 4 et 6¹⁸. En 2012, en France, 1 298 cas confirmés ont été rapportés dont 98 % étaient attribuables à *Legionella pneumophila* du séro groupe 1^a.

1.3 Réglementation au Québec

Un nouveau règlement traitant des tours de refroidissement et de la bactérie *Legionella* est entré en vigueur au Québec en juillet 2014. Ce règlement fait partie du Code de sécurité inclus dans la Loi sur le bâtiment de la Régie du bâtiment du Québec (RBQ). Il impose un suivi de l'eau des tours de refroidissement (tableau 1). Une tour de refroidissement ne doit pas contenir des concentrations en *Legionella pneumophila* considérées comme représentant un risque pour la population (Gouvernement du Québec, 2014) et par le fait même pour les travailleurs.

^a Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2012 / Données / Légionellose / Infections respiratoires / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil 2014.

Tableau 1 : Mesures à prendre en fonction de la concentration en *Legionella pneumophila*
(tiré du Programme d'entretien - Régie du bâtiment du Québec, 2014).

Niveau d'action	Résultat d'analyse	Mesures à prendre
Normal	Moins de 10 000 UFC/l	Maintenir le traitement et le programme d'entretien.
Seuil d'intervention	Entre 10 000 et 1 000 000 UFC/l	- Identifier les causes de l'augmentation de la concentration en <i>Legionella pneumophila</i>. - Vérifier l'efficacité des mesures correctives.
Seuil de risque sanitaire	1 000 000 UFC/l ou plus	- Mettre en place des mesures qui élimineront toute dispersion de l'eau par aérosol. - Appliquer immédiatement la procédure de décontamination. - Identifier les causes du dépassement avec le ou les membres d'un ordre professionnel qui ont élaboré le programme d'entretien. - Appliquer des mesures correctives. - Vérifier l'efficacité des mesures correctives. - Effectuer un nouveau prélèvement conforme et l'acheminer au laboratoire certifié pour une nouvelle analyse de la concentration en <i>Legionella pneumophila</i> (2 à 7 jours plus tard)

1.4 Incidence en milieu de travail

Il est difficile d'estimer le nombre et le type de travailleurs les plus à risque de contracter une légionellose, puisque même dans la population en général, la fréquence réelle de la maladie est mal connue. La légionellose est une maladie largement sous-déclarée en raison, entre autres, des tests diagnostiques utilisés et des traitements antibiotiques à large spectre qui sont administrés sans avoir recours à la caractérisation de la bactérie responsable de la pneumonie^{11,22,23}. Selon le Canadian Center for Occupational Health and Safety, les travailleurs les plus à risque sont ceux qui travaillent dans les édifices hermétiques et ceux qui font l'entretien des tours de refroidissement²⁴. Bien que les tours de refroidissement des édifices soient les plus ciblées, des cas de légionellose ont également été rapportés chez des travailleurs utilisant des circuits de refroidissement à l'eau dans l'industrie des plastiques et de la métallurgie ainsi que chez ceux utilisant des jets d'eau à haute pression⁴.

À l'été 2012, une importante éclosion de légionellose a eu lieu dans la ville de Québec. Cent quatre-vingt-un cas ont été déclarés dont 73 % hospitalisés et 13 finalement décédés²⁵. Une tour de refroidissement a été identifiée comme étant la source d'eau responsable de cette éclosion.

Lors de l'investigation et à la suite de l'enquête épidémiologique du directeur de la santé publique, un constat a pu être fait : dans plus de la moitié des tours testées, il a été possible de

détecter de la *Legionella spp* et dans sept de celles-ci, les concentrations atteignaient des niveaux jugés comme étant une menace pour la santé publique ²⁵. Dix recommandations ont été émises par le directeur de santé publique à la suite de l'éclosion de 2012. La recommandation 10-a se lit comme suit :

- l'identification rapide des sources d'une éclosion à partir de prélèvements et d'analyses par cultures, q-PCR ou toutes autres méthodes à développer selon leur sensibilité et leur spécificité particulière.

1.5 Méthodes d'analyse

1.5.1 Culture bactérienne

Actuellement, la majorité des méthodes standards de détection de la *Legionella* se font par culture sur des milieux gélosés ^{17,26-29}. Les méthodes d'analyse par croissance ont plusieurs limitations ³¹⁻³⁴. Elles sont laborieuses et demandent des périodes d'incubation pouvant atteindre 7 à 10 jours ^{31,35}. La capacité de déceler la bactérie *Legionella* par les méthodes par culture sur des échantillons d'eau est faible; ces méthodes peuvent ne permettre d'identifier que 10 % des cellules, principalement si l'échantillon contient d'autres microorganismes compétiteurs ^{5,36}. Avec un temps de génération estimé entre 4 et 6 heures, la détection de la *Legionella* devient impossible lorsque les milieux de culture sont surpeuplés par d'autres genres bactériens ayant des temps de génération aussi faibles que 20 minutes et empêchant la croissance des *Legionella* ³⁷⁻³⁹. L'utilisation de biocides et d'autres produits d'entretien dans les tours de refroidissement augmente les difficultés pour l'obtention d'une bonne croissance de cellules viables de *Legionella* sur les milieux gélosés ⁴⁰. En plus, il faut souligner la possibilité que les *Legionella* présentes dans l'échantillon d'eau puissent être viables, mais non cultivables ^{5,31,39-41}. La bactérie viable mais non cultivable possède une activité métabolique très faible couplée à une incapacité de réaliser sa division cellulaire. Dans cet état, aucune croissance sur gélose ne se produit, d'où l'appellation de non cultivable. L'incapacité de croissance de la bactérie disparaît si celle-ci est ressuscitée par des conditions favorables. Dans ce cas, son métabolisme se réactive et sa division cellulaire recommence ⁴². La bactérie retrouve sa capacité de croissance sur gélose. Une seconde limitation à la croissance sur gélose est rencontrée lorsque les bactéries *Legionella* pénètrent les cellules d'amibe, elles ne sont alors plus cultivables bien qu'elles soient toujours viables et qu'elles puissent être éventuellement relarguées dans l'eau ^{4,37,40}. Ces limitations produisent une sous-estimation des concentrations réelles de *Legionella* dans les eaux analysées lorsque la méthode par culture est utilisée ⁴³. Des méthodes plus rapides, plus spécifiques et ayant moins de problèmes d'interférence doivent donc être développées.

1.5.2 Biologie moléculaire par PCR

La technologie de la polymérase en chaîne (PCR) a vu le jour dans les années 1980 à la suite des travaux de Kary Mullis sur l'enzyme de la polymérase ^{44,45}. Cette technologie, qui a complètement révolutionné les études biologiques, lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993. La PCR est incontournable dans les études de biologie moléculaire ⁴⁵⁻⁴⁶. Il s'agit d'une méthodologie sensible pour l'amplification et la détection à partir des séquences d'acides nucléiques ⁴⁷. Son usage est étendu à de nombreuses applications, dont l'analyse spécifique d'acides nucléiques dans un échantillon donné tel que les échantillons d'eau pour l'analyse de la

*Legionella*⁴⁷. Les méthodes utilisant la PCR peuvent pallier certains problèmes, entre autres, les délais associés aux méthodes par culture ainsi que ceux reliés à la sensibilité des méthodes^{5,39,48}. Puisque l'approche classique de la PCR permet de déterminer la présence d'ADN dans l'échantillon, elle favorise également la détection des bactéries dites non cultivables et non viables^{35,43}.

Dans la PCR, l'amplification de l'ADN se fait à l'aide de deux courts oligonucléotides dont la séquence d'acides nucléiques est complémentaire aux extrémités de la séquence d'ADN que l'on veut amplifier. Ces fragments d'oligonucléotides se nomment amorces moléculaires et servent à ancrer l'enzyme de polymérase sur l'ADN afin de lui permettre d'amorcer la transcription de l'ADN pour en fabriquer une copie (figure 1).

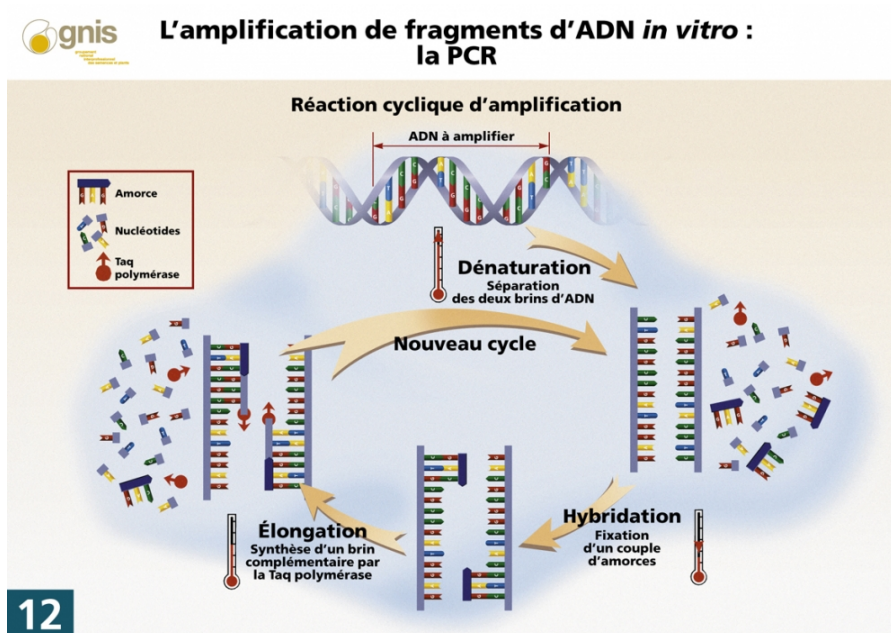


Figure 1 : La réaction cyclique de la méthode PCR.
Tirée du site « Gnis Pédagogie^b »

Puisque les deux brins d'ADN sont copiés simultanément à chacun des cycles et que chaque copie est utilisée comme matrice dans les cycles subséquents, le nombre de copies d'ADN augmente de façon exponentielle durant l'amplification des brins d'ADN. Une analyse PCR peut compter une quarantaine de cycles. Ceci permet d'obtenir en quelques minutes des milliers voire des millions de copies d'ADN à partir d'une seule.

^b <http://www.gnis-pedagogie.org/index.php?spec=mediatheque&lg=fr&numrub=31&numcateg=&numsscateg=&typeMedia=photos&numfamille=11&numpage=138>

1.5.3 La PCR en temps réel (q-PCR)

La technique de la PCR évolue rapidement et plusieurs applications sont maintenant disponibles. La seconde avancée importante a eu lieu dans les années 1990 avec l'arrivée de la PCR quantitative en temps réel ou la q-PCR^{45,49,50}. Cette approche a des applications dans des domaines variés, dont les plus importants se retrouvent en microbiologie clinique, alimentaire et agro-alimentaire ainsi qu'en oncologie⁴⁶. La q-PCR est une méthode ayant démontré plusieurs qualités et avantages. Outre sa rapidité, elle est spécifique, sensible et reproductible, et ne nécessite de surcroît, contrairement à la PCR classique, aucune manipulation post-amplification ce qui réduit considérablement les risques de contamination par les amplicons présents à des milliers de copies à la fin des cycles d'amplification^{45-47,49,50}.

Dans la méthode de la q-PCR, la détection de l'ADN cible se fait dans un thermocycleur muni d'un fluoromètre. La détection de la fluorescence s'effectue concurremment à l'amplification de l'ADN, soit à l'aide d'un agent qui se fixe de façon spécifique sur les doubles brins d'ADN (SYBR® green, Life Technologie inc, USA) ou à l'aide d'une sonde de détection fluorogénique qui s'hybride de manière spécifique sur le fragment d'ADN^{49,50}. Dans cette technique, la fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification et l'augmentation du nombre de copies d'ADN présent dans l'échantillon se traduit par une augmentation de la fluorescence dans la réaction. Une courbe de forme sigmoïde (figure 2) représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles permet de suivre en temps réel l'augmentation du nombre de brins d'ADN dans la solution.

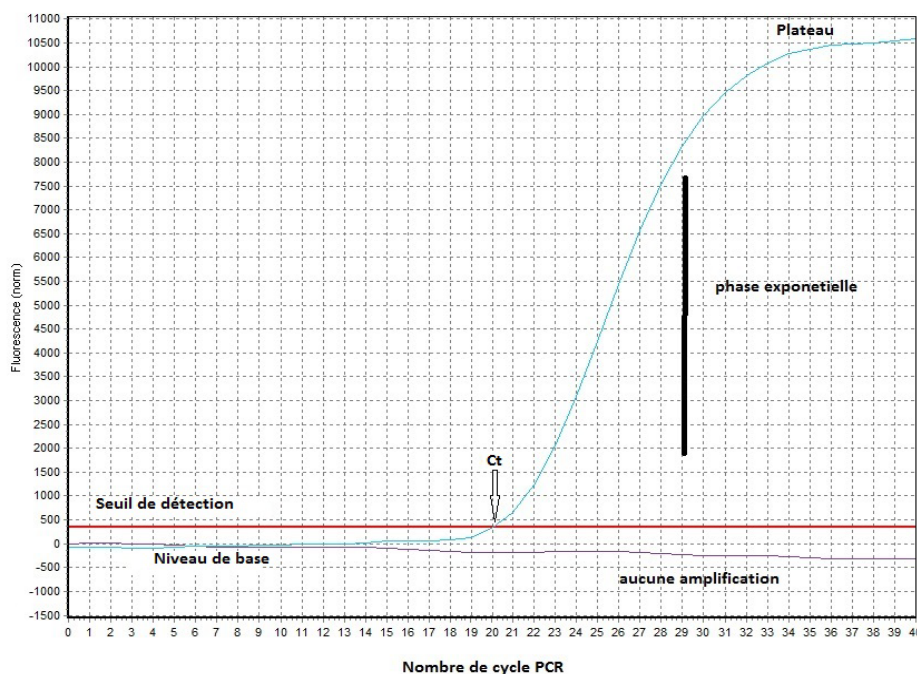


Figure 2 : Courbe de la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles de la PCR. Représentation des courbes pour un contrôle positif et un contrôle négatif. Le Ct pour la courbe positive est identifié par une flèche.

Lors des premiers cycles d'amplification, la fluorescence est faible et seul un niveau de base est détectable par le fluoromètre. Puis survient une augmentation importante de la fluorescence, consécutive à l'accroissement exponentiel des fragments d'ADN dans l'échantillon. Lorsque la fluorescence est significativement différente du niveau de base, un seuil de détection est déterminé. Il est utilisé pour fixer le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour produire un niveau de fluorescence distinct du niveau de base. Le nombre de cycles obtenus de cette façon se nomme Ct (cycle threshold). Le Ct est utilisé dans l'analyse des échantillons pour la détection et la quantification⁵⁰.

La quantification d'un inconnu se fait à l'aide d'une courbe standard construite à l'aide du Ct en fonction de la concentration connue d'ADN pour chacun des points de la courbe standard⁵⁰. La valeur des Ct est inversement proportionnelle aux logarithmes des concentrations d'ADN dans l'échantillon. L'efficacité d'amplification de la réaction, qui est utilisée pour estimer la qualité de la réaction, est obtenue à partir de la droite de régression de la courbe standard. De plus, l'équation de cette droite permet de quantifier l'ADN présent dans les échantillons inconnus (figure 3).

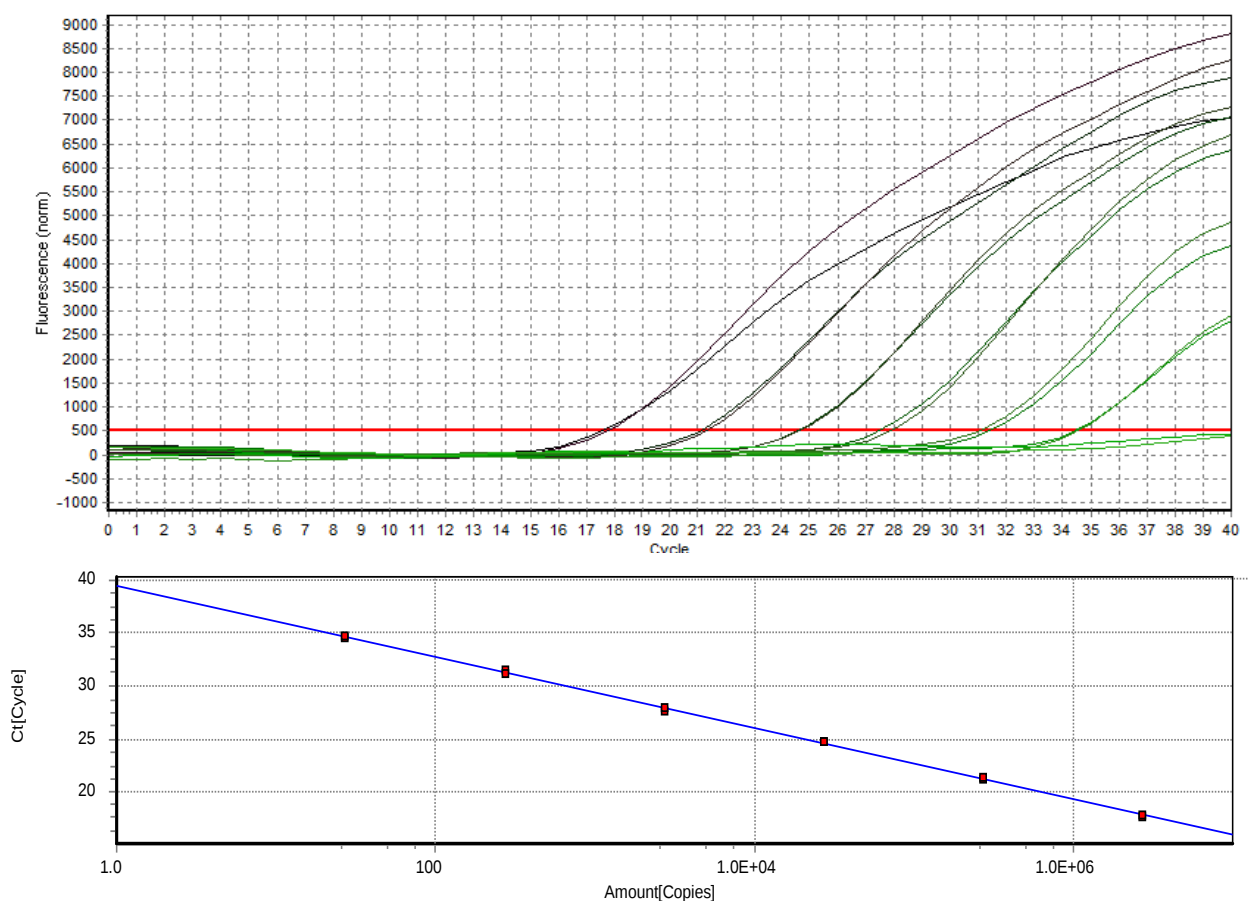


Figure 3 : Construction d'une courbe standard pour le système PT69-PT70: LpneuFL. Nombre de cycles (Ct) en fonction de la concentration d'ADN (ng/μl).

1.5.4 La PCR pour les cellules viables ou la v-PCR

Pour certaines applications, la capacité de la PCR à détecter les organismes non viables peut être un inconvénient; c'est le cas pour la détection de la *Legionella* dans l'eau des tours. Dans plusieurs études de microbiologie, l'aptitude à faire la distinction entre les cellules viables et non viables est indispensable. En effet, lorsque l'intérêt médical pour un microorganisme relève de son caractère infectieux, l'évaluation du risque doit se limiter aux cellules ayant la capacité de se multiplier à l'intérieur de l'organisme hôte. Rubi et ses collaborateurs ont utilisé pour la première fois, en 2005, un agent intercalant d'ADN afin de discriminer les cellules viables lors de l'amplification de l'ADN par la PCR⁵¹. Des agents intercalants avaient déjà été utilisés dans d'autres techniques d'analyse afin de discriminer entre les cellules viables et non viables^{52,53}, mais ce sont Rubi et ses collaborateurs qui ont démontré que ces agents pouvaient également être utilisés efficacement dans la méthode de la PCR.

Les agents intercalants s'insèrent uniquement dans l'ADN double brin des cellules dont la membrane cellulaire n'est plus intacte. Par la suite, les molécules d'intercalant sont fixées de façon irréversible par des liens covalents lors d'une exposition à une puissante lumière de 650 W. Dans l'approche de la v-PCR⁵¹, la présence de l'intercalant fixé uniquement sur l'ADN des cellules n'ayant pas leur intégrité membranaire empêche l'amplification de leur ADN. Cette technique se nomme la v-PCR (viability PCR). Bien que certains critiquent le lien entre une membrane perméable ou intègre et le caractère cultivable d'une cellule, cette technique est de plus en plus utilisée pour effectuer la discrimination entre cellules viables/non viables ou cultivables/non cultivables^{43,53-61}.

1.5.5 La PCR et la *Legionella*

Les bactéries ciblées dans la présente étude sont les *Legionella*. La spécificité des systèmes de détection est dépendante des amorces et des sondes moléculaires utilisées. Plusieurs systèmes qui ont fait l'objet d'une publication permettent la détection de *Legionella* en fonction du genre (*Legionella spp*)^{48,62,63}, de l'espèce (*Legionella pneumophila*)^{34,36,63-65} et même, plus récemment, du séroroupe (*Legionella pneumophila serogroupe 1*)^{18,35,63}.

Les premiers systèmes de détection pour la *Legionella* produisaient des résultats qualitatifs de type présence/absence à l'aide d'une détection par l'approche de la PCR traditionnelle⁶⁶⁻⁶⁸. Les systèmes de détection ayant fait l'objet d'une publication plus récemment permettent la quantification à l'aide de la q-PCR soit en utilisant l'approche usuelle de la q-PCR^{5,18,39,62-65} ou en utilisant l'approche de la v-PCR^{69,70}.

Ces systèmes de détection peuvent amplifier différents gènes ou régions du génome de la *Legionella*. Certains d'entre eux ciblent les gènes codant pour l'ARNr (ribosomique), plus particulièrement des séquences retrouvées dans les sous-unités des gènes du 5S et du 16S. Ces séquences des gènes ribosomiques sont hautement conservées et, conséquemment, sont couramment utilisées pour les études phylogéniques⁷¹ et pour la détection des microorganismes en fonction du genre^{5,14,34,62,66,72}. D'autres chercheurs utilisent la région interne non codant comprise entre les gènes du 23S et du 5S pour sélectionner des séquences spécifiques permettant une détection selon genre ou l'espèce⁷³. Les systèmes de détection peuvent également être conçus pour le dépistage à partir de gènes spécifiques comme le Macrophage Infectivity

Potentiator (*mip*),^{34,63–65,72}, le small stable RNA (*ssrA*)^{63,74} ou plus récemment, à l'aide des séquences des gènes du complexe LPS codant pour les lipopolysaccharides tels que le *lpp0831*, le *wzm* ou le *wzt*^{18,63}.

La détection par la PCR a été réalisée dans différents échantillons cliniques provenant des voies respiratoires, mais aussi dans le sérum ou l'urine de patients atteints de légionellose^{48,62,68}. D'autres chercheurs ont fait des essais de détection et de quantification sur des échantillons environnementaux provenant soit des tours de refroidissement, des systèmes de chauffage d'eau ou des systèmes d'aqueduc municipaux^{5,39,64,67,75}. Palmer a comparé la méthode de la PCR avec celles par culture ou antigéniques sur des échantillons d'eau et l'a trouvée plus performante⁷⁵. Devos a obtenu une réponse positive pour 70 % des échantillons analysés avec la méthode de la PCR, mais n'a obtenu que 41 % de résultats avec la méthode de culture⁵. Morio rapporte quant à lui le manque de corrélation entre la méthode par culture et celle utilisant la PCR. Il considère la PCR seulement à titre de méthode complémentaire⁶⁴. Delgado-Viscogliosi a démontré que l'utilisation de la v-PCR était possible pour les analyses de *Legionella spp* dans des échantillons d'eau⁷⁶.

La présente étude a permis de tester différentes amorces et sondes moléculaires afin de trouver les meilleurs agencements amorce/sonde pour créer des systèmes de détection mieux adaptés aux analyses de *Legionella* pour les échantillons d'eau reçus par le laboratoire de microbiologie de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). Les marqueurs moléculaires testés proviennent tous de la littérature scientifique. Trois systèmes permettant d'établir des niveaux de spécificité différents ont été retenus, soit un pour la détection selon le genre pour les *Legionella spp* qui permet de dépister toutes les bactéries indépendamment de l'espèce, un autre selon l'espèce pour la détection particulière des *L. pneumophila* et un troisième très spécifique avec une détection se limitant aux *L. pneumophila* du sérotype 1. Les trois niveaux de spécificité permettront une analyse complète des échantillons d'eau reçus. Toutes les étapes de traitement de l'échantillon ont été optimisées afin d'atteindre des limites de détection acceptables et certaines avenues ont été explorées dans le but de limiter les problèmes d'inhibition de la PCR rencontrés sur des échantillons de tours de refroidissement. Différentes méthodes d'extraction de l'ADN ont été testées afin d'évaluer leur performance tant sur le plan de la quantité de l'ADN extrait que de la qualité de celui-ci. De plus, l'approche de la v-PCR a été mise en place afin de connaître la fraction viable et non viable des cellules de *Legionella spp* présentes dans les échantillons.

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Cette étude avait pour objectif de développer une méthode indépendante de la culture microbienne sur milieux gélosés pour analyser la bactérie *Legionella pneumophila* dans les échantillons d'eau provenant de tours de refroidissement et de systèmes d'eau chaude.

Plus spécifiquement, la recherche visait la mise au point et la validation d'une méthode de biologie moléculaire utilisant la q-PCR et l'approche de la v-PCR pour détecter la bactérie *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'eau.

3. MÉTHODOLOGIE

3.1 Évaluation des systèmes de détection

3.1.1 Diversité des souches bactériennes disponibles

Lors de la validation d'un système de détection de biologie moléculaire utilisant la méthode de la PCR, il est nécessaire de disposer d'une grande diversité d'ADN provenant de genres et d'espèces bactériennes variés. Cet ADN est employé pour faire la démonstration de la sélectivité et de la spécificité des systèmes moléculaires testés.

Le laboratoire de l'IRSST possède une collection de plus de 400 souches bactériennes dans sa microbiothèque. Ces souches sont conservées dans le glycérol (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) à une température de -70 °C. En supplément à cette collection, plusieurs souches diverses de *Legionella* ont été acquises de l'American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) afin de combler les lacunes de la microbiothèque de l'IRSST au regard des espèces moins courantes du genre *Legionella*.

3.1.2 Extraction de l'ADN des souches bactériennes

Pour extraire l'ADN génomique des bactéries de la banque de l'IRSST, chaque souche a préalablement été inoculée en culture pure sur le milieu gélosé approprié. La gélose au trypticase soya (Oxoid, Ontario, Canada) est utilisée pour la majorité des bactéries alors que le Buffered Charcoal Yeast Extract avec cystéine (BCYE, Oxoid, Ontario, Canada) est utilisé spécifiquement pour les bactéries du genre *Legionella*. Après inoculation, les milieux ont été incubés à 25 °C ou 37 °C pour une période variant de 1 à 8 jours selon le genre bactérien. Lorsque la croissance observée a été jugée suffisante, le milieu de culture est gratté et les cellules bactériennes sont récupérées dans 2 ml d'eau stérile sans ADN (Fisher Scientific, New Jersey, USA). La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée à 17 000 g durant cinq minutes pour former le culot cellulaire qui a été employé pour extraire l'ADN génomique de la bactérie.

Les extractions d'ADN ont été effectuées à l'aide de deux trousseaux d'extraction, soit le Ultraclean® microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories inc., CA, USA) ou le ZR-fungal/bacterial DNA kit (Zymo Research Corporation, CA, USA). Les protocoles fournis par les manufacturiers ont été suivis pour constituer les extraits d'ADN de la banque.

Les extraits d'ADN ont été dosés à l'aide du BioPhotometer (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) puis dilués à une concentration de 0,5 ng/µl. L'ADN concentré a été conservé au congélateur à -20 °C et les extraits dilués sont conservés par aliquote de 500 µl à 4 °C. Les extraits d'ADN bactériens dilués ont été utilisés pour évaluer la sélectivité et la spécificité de tous les systèmes de détection moléculaire testés. La qualité des extraits d'ADN a été préalablement évaluée en calculant le rapport de la densité optique obtenu à 260 nm sur celle à 280 nm. Un rapport se rapprochant de 2 indique une bonne pureté d'ADN. Les extraits d'ADN génomique de la collection ont ensuite été amplifiés à l'aide d'amorces universelles en utilisant la technologie du SYBR® Green® (Life Technologies, Ontario, Canada). L'amplification d'un fragment de gène bactérien codant pour le 16S a permis de démontrer que la qualité de l'ADN respecte les besoins de la PCR. Les six amorces qui ont été évaluées pour cette étape se retrouvent au tableau 2.

Tableau 2 : Amorces universelles testées pour vérifier l'amplification du gène codant pour l'unité 16S des bactéries de la banque de l'IRSST.

Amorce	Séquence	Tm ⁽⁷⁷⁾ (T°)	Référence
8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	52	78
63F	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	54	79
517F	GCC AGC AGC CGC GGT AA	54	80
1387R	GGG CGG WGT GTA CAA GGC	54	79
1390R (1406R)	ACG GGC GGT GTG TRC AA-	49	
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	47	81

Les amorces conservées pour l'amplification de l'ADN de la banque ont été la 517F publiée par Nossa (2010) et la 1387R publiée par Marchesi (1998). L'amplification de l'ADN a été faite à l'aide de l'appareil Mastercycle RealPlex2 (Eppendorf, Ontario, Canada). Le programme d'amplification qui a été utilisé débute par une dénaturation de 15 minutes à 95 °C suivi de 40 cycles de 15 secondes à 94 °C, 30 secondes à 62,5 °C et 30 secondes à 72 °C. Le programme a été complété par une courbe de dénaturation thermique débutant à une température de 60 °C et pour laquelle la température a été réduite de 1 °C à toutes les 30 secondes. Le volume d'ADN dans chaque réaction a été de 2 µl pour un volume de réaction final de 25 µl. La concentration des amorces qui a été utilisée est de 12,5 mM.

3.1.3 Vérification de la spécificité des amorces d'amplification

Les différentes amorces testées avec ou sans sonde moléculaire spécifique de type Taqman® sont présentées au tableau 3.

Des essais par gradients de température ont été effectués sur quelques paires d'amorces afin d'identifier les températures d'appariement qui doivent être utilisées avec chaque paire. La température d'appariement a un impact sur la sélectivité et la spécificité des systèmes et doit être choisie avec diligence.

La solution mère, aussi appelée le master mix, est constituée de 12,5 µl de SYBR® green PCR master mix (Life technologies, Ontario, Canada), 9,5 µl d'eau stérile sans ADN (Fisher Scientific, NJ, USA) et de 0,5 µl de chacune des amorces à 25 mM (Primer Design Ltd, Southampton, UK) par réaction PCR. Ensuite, 2 µl d'ADN sont ajoutés par puits de réaction. Le programme d'amplification est initié par l'activation de l'enzyme de la polymérase à 95 °C pour une période de 15 minutes, suivi des 40 cycles qui vont débiter par une dénaturation de 15 secondes à 94 °C, suivi de 30 secondes à température variable pour l'appariement (tableau 3 pour l'étendue des températures testées pour chaque amorce). Chaque cycle se termine alors par une élongation de 30 secondes à 72 °C et une courbe de fusion est réalisée à la fin des 40 cycles.

L'ADN des souches ATCC 33152, ATCC 35304, ATCC 33462 et ATCC 35299 a été utilisé pour cette première étape d'évaluation. Ce test de gradient fait uniquement sur les amorces n'a été effectué que sur les premiers systèmes de détection. Par la suite, les tests de gradient et de sélectivité ont été pratiqués sur les systèmes incluant les amorces et les sondes moléculaires ensemble afin de ne pas doubler les manipulations inutilement.

Tableau 3 : Paires d'amorces testées pour utilisation dans un système de détection de la *Legionella* par amplification PCR.

Amorce	Température de désappariement, T _m (°C)	Étendue du gradient (°C)	Gène ciblé et spécificité	Longueur du fragment (pb)	Référence
L-mip-R1548	50,7	45-55 et 54-64	<i>mip / Legionella pneumophila</i>		82
L-mip-L920	44,2				
<i>mip</i> F1	60,9	50-60	<i>mip / Legionella spp</i>		14
<i>mip</i> R2	51,8				
<i>mip</i> F2	49,8	50-60	<i>mip / Legionella spp</i>		14
<i>mip</i> P R2	51,8				
LP-mip-PT69	55,1	51-60	<i>mip / Legionella pneumophila</i>	186	83
LP-mip-PT70	54,5				
JFP	51,4	51-60	16S ARNr / <i>Legionella spp</i>	386	39,84
JRP	53,4				
PAN-leg-R	50,0	NA	<i>ssrA / Legionella spp</i>	230	74
PAN-leg-F	46,0				
P66	52,0	NA	<i>wzt / Legionella pneumophila sg1</i>	75	18
P65	55,0				
LpF	43,0	NA	<i>mip / Legionella pneumophila</i>	193	85
LpR	56,0				
JamF	48,0	NA	16S ARNr <i>Legionella spp</i>	67	85
JamR	54,0				

À la suite du test de gradient, une température optimale d'appariement a été choisie et celle-ci a été utilisée dans la programmation des analyses PCR. Pour la vérification de la spécificité et de la sélectivité de chaque paire d'amorces, le programme d'amplification était initié par l'activation de l'enzyme de la polymérase à 95 °C pour une période de 15 minutes, suivie des 40

cycles qui débutaient par une dénaturation de 15 secondes à 94 °C, suivi de 30 secondes à 57 °C pour le couple JFP/JRP (figure 4) et à 53 °C pour le couple LP-*mip*-PT69 et LP-*mip*-PT70. Enfin, chaque cycle se terminait par une élongation de 30 secondes à 72 °C et une courbe de dénaturation.

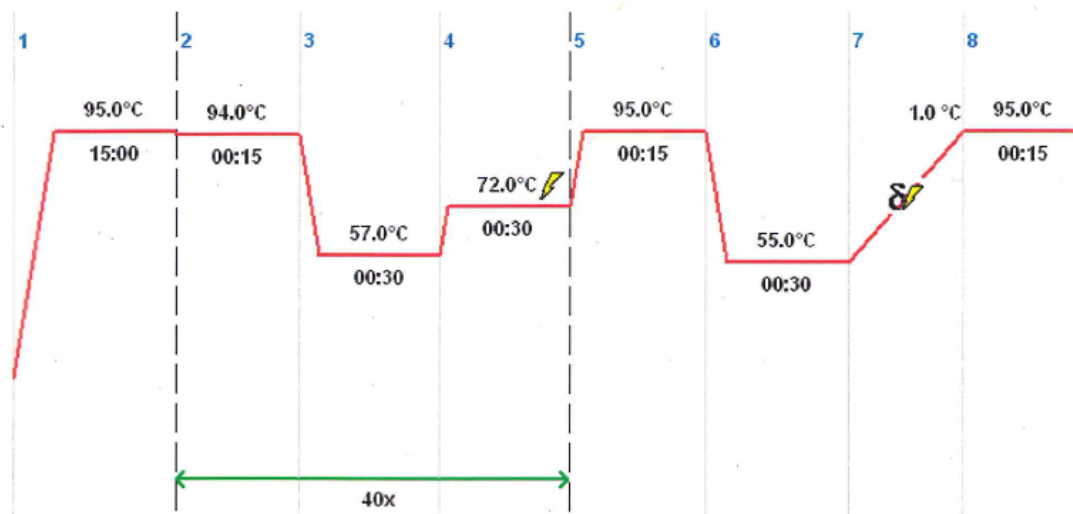


Figure 4 : Programme d'amplification utilisé pour la réalisation des essais de spécificité et de sélectivité effectués sur les amorces JFP/JRP.

La spécificité des couples d'amorces a été vérifiée sur 40 souches de *L. pneumophila*, 17 souches de *Legionella spp*, 109 souches provenant de genres bactériens des règnes Firmicutes et Protéobactéries autres que *Legionella* et deux souches de moisissures. Dans chaque plaque, la souche *Legionella pneumophila* ATCC 33152 a été utilisée à titre de contrôle positif alors que l'eau stérile sans ADN a servi de contrôle négatif.

3.1.4 Vérification et optimisation des systèmes avec sondes de détection

Par suite des résultats de sélectivité et de spécificité effectués sur les amorces, et afin d'augmenter la sélectivité des systèmes de détection de *Legionella*, des sondes moléculaires de détection ont été ajoutées aux amorces d'amplification, et ce, dans le but de former des systèmes de détection plus sélectifs. Les mêmes étapes ont été suivies tant pour vérifier les systèmes amorces/sonde que pour les essais faits uniquement sur les amorces. En revanche, la technologie non spécifique de détection de la PCR en temps réel du SYBR® green a été remplacée par la détection en temps réel à l'aide de sondes moléculaires de type TaqMan® (IDT-Integrated DNA technologies inc., Ontario, Canada) (tableau 4). Les sondes ont été marquées lors de leur synthèse par le fluorophore, 6-carboxyfluorescein (FAM™) à l'extrémité 5' et le quencher Iowa black à leur extrémité 3' alors que le ZEN™ quencher au centre de la molécule a servi à les stabiliser.

La première étape des programmes d'amplification pour les tests par gradient sur les systèmes amorces/sonde consiste à procéder à l'activation de l'enzyme de la polymérase à 95 °C pour une période de 15 minutes, suivie des 40 cycles d'amplification, tout d'abord, la dénaturation d'une

durée de 15 secondes à 94 °C, suivie de 30 secondes à température variable ciblée selon les températures de dénaturation des amorces et des sondes de chaque système (tableau 4). Chaque cycle se termine alors par une élongation de 30 secondes à 72 °C. La solution mère est constituée de 14,85 µl d'eau sans ADN (Fisher Scientific, NJ, USA), de 0,2 µl de polymérase à 5 U/µl (Qiagen, Ontario, Canada), de 3,75 µl de tampon 10X (Qiagen, Ontario, Canada), de 0,5 µl de dNTP 10 mM (Qiagen, Ontario, Canada), de 0,5 µl pour chaque amorce à 25 µM (IDT-Integrated DNA technologies inc., Ontario, Canada) et de 0,7 µl de sonde à 12,5 µM (IDT-Integrated DNA technologies inc., Ontario, Canada). À ce mélange, s'ajoute ensuite 2 µl d'ADN par puits de réaction.

Tableau 4 : Sonde de type TaqMan® avec les amorces spécifiques.

Sondes	Amorces	Gènes / Spécificité	Gradient de température (°C)	Référence
LpneuFL	PT69-PT70	<i>mip</i> / <i>Legionella pneumophila</i>	52-62	39
LpneuLC	PT69-PT70	<i>mip</i> / <i>Legionella pneumophila</i>	52-62	39
Leg-FL	JFP/JRP	16S ARNr / <i>Legionella spp</i>	56-65	39
Leg-LC	JFP/JRP	16S ARNr / <i>Legionella spp</i>	56-65	39
Leg 705	JFP/JRP	16S ARNr / <i>Legionella spp</i>	49-55	86
PAN leg-P	PAN-F et PAN leg R ou PAN leg R1	<i>ssrA</i> - / <i>Legionella spp</i>	48-58	74
Sg1-PB	P66 et P65	<i>Legionella pneumophila</i> sérogruppe1	54-62	18
LpT	LpF et LpR	<i>mip</i> / <i>Legionella pneumophila</i>	49-58	85
JamT	JamF et Jam R	16S ARNr <i>Legionella spp</i>	49-58	85

À la suite des résultats obtenus lors des tests de gradient, les essais de spécificité et de sélectivité ont été poursuivis sur 6 des 10 systèmes amorces/sonde. Les souches employées pour ces essais se retrouvent à l'annexe A. La préparation de la solution mère pour ces tests est identique à celle utilisée pour les tests par gradient opérés sur les systèmes amorces/sonde. Seule la température d'appariement a été modifiée dans les programmes d'amplification selon les résultats obtenus à l'aide des tests par gradient. La Figure 5 représente le programme d'amplification qui est utilisé pour l'analyse de spécificité du système JFP/JRP: LegLC. Les systèmes LpF-LpR- LpT et JamF-JamR-JamT n'amplifiaient pas ce qui était attendu et ont été abandonnés pour la suite des étapes.

À la suite des tests de spécificité, des ajustements concernant les concentrations de la sonde Taqman® et du MgCl₂ dans la préparation de la solution mère de la PCR (Master mix) ont été effectués pour optimiser chaque système indépendamment. Les concentrations testées ont varié entre 1,5 et 4 mM pour le MgCl₂ et entre 0,15 et 0,3 µM pour les sondes de détection.

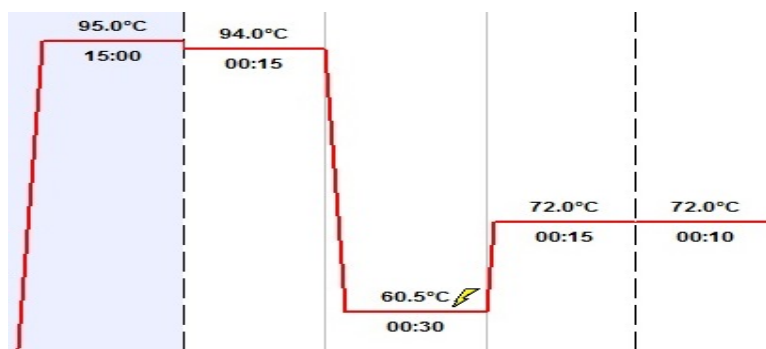


Figure 5 : Programme d'amplification utilisé pour la réalisation des essais de spécificité et de sélectivité effectués sur le système JFP/JRP: LegLC.

L'évaluation de la limite de détection de chaque système a été réalisée à l'aide d'une dilution sériée (1/10) de l'ADN de la souche *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Les dix dilutions ont été effectuées dans un tampon Tris-EDTA 1X solution for molecular biology (acide éthylène diamine tétra-acétique, Fisher Scientific, NJ, USA). À la suite d'une estimation de la limite de détection par épuisement, dix préparations de l'ADN de la souche ATCC 33152 à $6,8 \times 10^{-6}$ ng/ml ont été effectuées et analysées pour obtenir les limites de détection et de quantification. La répétabilité a été mesurée par l'analyse durant la même journée des quatre concentrations : $1,6 \times 10^6$, $1,6 \times 10^4$, 160 et 16 UG/µl, répétée six fois. La reproductibilité a été calculée à l'aide des mêmes concentrations analysées durant six jours différents, à partir de l'intervalle de confiance à 95 % des coefficients de variation obtenus pour chaque concentration.

3.2 PCR viable (v-PCR)

Deux produits rapportés dans la littérature scientifique ont été testés pour la réalisation de la v-PCR, soit l'EMA (éthidium monoazide) et le PMA (propidium monoazide). Les essais ont été faits sur 500 µl de Concentrat des suspensions bactériennes obtenues de culture pure.

Les deux produits (EMA et PMA) ont été utilisés à trois concentrations différentes : 50, 100 et 150 µM. Les suspensions bactériennes additionnées de l'agent de blocage ont été placées dans l'obscurité pour une période de cinq minutes. L'exposition à l'obscurité permet à l'agent de blocage de pénétrer à l'intérieur des membranes cellulaires non intactes et de s'incorporer au double brin d'ADN (dsDNA). Les suspensions ont ensuite été exposées à une source lumineuse pour des périodes variant de 2 à 15 minutes afin de permettre la fixation permanente de l'agent de blocage aux dsDNA. Deux sources lumineuses ont été utilisées pour cette étape. Tout d'abord, une lampe de cinéma de 650 Watts. Lors de ces essais, les suspensions de cellules ont été conservées sur glace et agitées occasionnellement pour éviter une surchauffe des suspensions. En raison de la variabilité importante observée au niveau du marquage et afin d'optimiser le processus, un appareil PhAST blue (GeniUL, Barcelone, Espagne) fabriqué spécifiquement pour

améliorer cette application de la v-PCR a également été utilisé. Pour ces essais, il n'est plus nécessaire de conserver sur glace puisqu'il n'y a pas de dégagement de chaleur avec la lampe DEL de l'appareil. Après l'extraction de l'ADN, l'amplification a été réalisée avec les amorces PT69 et PT70 et la détection avec la sonde LpneuFL.

3.2.1 Effet des agents de blocage sur le caractère cultivable des *Legionella spp*

La capacité de croître des cellules de *Legionella pneumophila* a été vérifiée après une exposition aux deux agents de blocage testés. Les bouillons de culture ont été inoculés avec des cellules de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 et incubés à 37 °C pour une période de 18 heures dans un incubateur avec agitation orbitale à 150 rpm (Forma Scientific, Ontario, Canada). La concentration finale du bouillon a été évaluée à 1×10^7 UFC/ml par une prise de la densité optique à 620 nm. Des aliquotes de 500 µl de ce bouillon ont été effectués afin de tester l'ensemble des combinaisons de traitement sur une même culture. Chaque aliquote de 500 µl a subi une combinaison variée de traitements différents (tableau 5) permettant d'évaluer les impacts que ceux-ci peuvent avoir sur la croissance de *Legionella pneumophila*. Le but étant de ne pas provoquer une sous-évaluation de la viabilité des *Legionella* dans les échantillons terrain par l'utilisation d'un protocole de blocage d'amplification toxique pour ces cellules.

Tableau 5 : Combinaisons des traitements pour le blocage d'amplification de l'ADN de *Legionella pneumophila*.

Durée d'exposition (min.)	PMA			EMA		
	50 µM	100 µM	150 µM	50 µM	100 µM	150 µM
2	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X

Après le traitement avec le PMA et l'EMA, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 17 000 G durant 15 minutes pour former un culot cellulaire. Par la suite, les culots ont été re-suspendus dans 500 µl d'eau stérile sans ADN. Des dilutions sériées allant de 10^{-1} à 10^{-6} de ces suspensions bactériennes ont été effectuées dans de l'eau stérile et 100 µl de chaque dilution ont été étalés sur des géloses de BCYE avec cystéine (Oxoid, Ontario, Canada). Les géloses inoculées ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère contenant 2,5 à 5 % de CO₂ pour une période de 10 jours. Les concentrations résiduelles de *Legionella pneumophila* cultivables après traitement ont été calculées par dénombrement au stéréo-microscope des colonies de *Legionella pneumophila* sur le milieu gélosé. Ce test avait pour but de vérifier si les cellules exposées aux PMA ou aux EMA conservaient leur caractère cultivable après traitement; il s'agissait donc de contrôler la toxicité des agents de blocage sur les cellules.

3.2.2 Performance du PMA

En conséquence des résultats obtenus lors des essais de toxicité des agents de blocage, seul le PMA a été conservé pour les expériences effectuées avec la méthode de la v-PCR. En plus de ne pas être toxique pour les cellules viables, le PMA doit démontrer une bonne performance pour le blocage de l'amplification des cellules non cultivables. Cette expérience a été réalisée sur des suspensions mélangées contenant des proportions variables de cellules cultivables et non cultivables. Les proportions testées ont été de 0, 0,1, 1, 10 et 100 % de cellules cultivables dans la suspension; l'autre fraction étant constituée du bouillon de cellules non cultivables. Les bouillons de culture ont été inoculés de cellules de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 et incubés à 37 °C pour une période de 18 heures dans un incubateur avec agitation orbitale à 150 rpm (Forma Scientific, Ontario, Canada). La concentration finale du bouillon a été évaluée à 1×10^7 UFC/ml par une prise de la densité optique (DO) à 620 nm. Les suspensions de *Legionella pneumophila* non cultivables ont été obtenues par un traitement à la chaleur de la suspension dans un bain-marie (VWR, Montréal, Canada) maintenu à 90 ± 1 °C pour une période minimum de 30 minutes. Les suspensions bactériennes ont été étalées sur des milieux BCYE avec cystéine pour confirmer les concentrations résiduelles de cellules cultivables.

3.3 Préparation du concentrat de l'échantillon

L'analyse par la PCR se fait sur des échantillons de très faibles volumes (2-5 µl). Tous les échantillons ont été concentrés afin d'atteindre une limite de détection adéquate au dépistage des *Legionella* dans les eaux des tours de refroidissement et les eaux de consommation, tels les systèmes d'eau chaude. La concentration de l'échantillon a été effectuée par filtration ou par centrifugation. La comparaison des différentes approches de concentration a été exécutée sur deux types d'eau de tours de refroidissement, soit une eau considérée propre provenant de tours d'édifice à bureaux et une eau sale contenant une quantité importante de particules provenant de tours utilisées lors de procédés industriels. Plusieurs échantillons de chaque type d'eau ont été combinés afin d'obtenir un volume suffisant de chaque préparation afin de procéder aux comparaisons des méthodes de concentration. Des ajouts dosés de cellules bactériennes de *Legionella pneumophila* ont été effectués aux mêmes concentrations dans les préparations cultivables et non cultivables.

3.3.1 Par filtration

La technique par filtration a été préconisée pour la majorité des échantillons puisque quelques auteurs ont rapporté qu'elle produisait, pour la préparation des concentrats, un volume de récupération supérieure à celui obtenu par la méthode par centrifugation.

Jusqu'à 500 ml d'eaux préparées ont été filtrés sur une ou plusieurs membranes d'ester de cellulose ayant une porosité de 0,45 µm et un diamètre de 47 mm (Millipore, MA, USA). Plus d'une membrane ont parfois été utilisées pour des échantillons qui provoquaient le colmatage de la membrane.

Les cellules bactériennes récoltées sur le filtre ont été récupérées à l'aide de trois techniques différentes : soit les membranes ont été grattées avec un râtelier à cellules (Fisher Scientific, NJ, USA) et récupérées dans 3 à 5 ml d'eau stérile sans ADN (Fisher Scientific, NJ, USA), soit par un brassage à 2200 rpm à l'aide d'un maxi vortex DVX-2500 (VWR, Montréal, Canada) pour

une durée de 10 minutes en plaçant les membranes dans 5 ml d'eau stérile sans ADN (Fisher Scientific, NJ, USA), soit par utilisation du filtre entier dans le processus d'extraction de l'ADN. La suspension cellulaire ainsi obtenue s'appelle le concentrat de l'échantillon qui a été utilisé tel quel pour faire les extractions de l'ADN.

3.3.2 Par centrifugation

La présence de matières insolubles en suspension dans l'eau de certains échantillons provenant des tours de refroidissement de procédés industriels a rendu la filtration pénible, voire impossible. Pour ces échantillons seulement, la filtration a été remplacée par une méthode de concentration par centrifugation. La centrifugation de 50 ml d'échantillon a été effectuée à 7 000 G dans une centrifugeuse Thermo Scientific, modèle Sorvail Legend MACH 1,6 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) pour une durée de 15 minutes. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans 1 à 2 ml d'eau d'échantillon et/ou d'eau stérile sans ADN (Fisher Scientific, NJ, USA). La suspension cellulaire ainsi obtenue est le concentrat de l'échantillon. Celui-ci a été utilisé tel quel pour effectuer l'extraction de l'ADN avec la méthode q-PCR ou après le traitement avec le PMA pour la v-PCR.

3.4 Extraction de l'ADN du concentrat d'échantillon

L'extraction de l'ADN peut se faire selon plusieurs protocoles. Certains d'entre eux peuvent être développés étape par étape par le laboratoire. Ils sont plus flexibles que les protocoles vendus en trousse, mais également plus laborieux. Les méthodes en trousse ont l'avantage d'être validées par des compagnies spécialisées en biologie moléculaire. Elles sont faciles d'utilisation et plusieurs trousse sont adaptées au type d'échantillon à analyser. Pour cette étude, plusieurs trousse ont été évaluées afin d'obtenir de l'ADN de qualité pour l'amplification et la détection par la PCR.

- AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit⁸⁷ (Corning Incorporated, Jiangsu Chine)
- UltraClean Microbial DNA Isolation Kit⁹³ (MoBio Laboratories inc. 2010) (MoBio Laboratories, Inc., CA, USA)
- ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research inc. 2009) (Zymo Research, CA, USA)
- DNeasy Plant Mini Kit⁹⁰ (Qiagen, Ontario, Canada)
- QiAmp DNA Mini Kit⁹¹ (Qiagen, Ontario, Canada)
- FastDNA Spin Kit (MP Biomedicals, CA, USA)

Les protocoles fournis par les manufacturiers ont été suivis pour évaluer l'étape de l'extraction de l'ADN des concentrats d'échantillon. Les dosages de l'ADN, les rapports 260/280 et la qualité de l'amplification ont été vérifiés afin de sélectionner la trousse d'extraction produisant les meilleurs extraits d'ADN pour les besoins des analyses de la *Legionella* dans l'eau. La variabilité des résultats obtenus lorsque plusieurs extractions sont réalisées sur un même échantillon a été évaluée.

3.5 Purification de l'ADN

Afin d'améliorer la qualité et la performance de l'amplification d'ADN pour certains échantillons, des trousse de purification d'ADN ont été testées. Ces trousse permettent d'enlever certaines impuretés présentes dans les extraits d'ADN. Cette purification a été effectuée dans le but de réduire les problèmes d'inhibition de l'amplification. Deux trousse de purification ont été testées durant cette étude, soit :

- QIAquick PCR Purification Kit ⁹², (Qiagen, Ontario, Canada);
- Ultraclean® PCR Clean-Up Kit samples (MoBio Laboratories inc. 2013) (MoBio Laboratories, Inc., CA, USA).

3.6 Contrôles de la méthode PCR

Plusieurs contrôles ont été incorporés au protocole analytique de la méthode de détection des *Legionella* par la PCR, ceci afin de renforcer la robustesse du résultat. Il est important de limiter les résultats faux positifs ainsi que les faux négatifs lors des analyses. Les différents contrôles permettent d'identifier certains problèmes lors de l'analyse et de contrôler la qualité lors de la production des résultats.

3.6.1 Contrôle négatif

3.6.1.1 Extraction

Pour chaque série d'analyses, un blanc d'extraction (blc-ext) a été incorporé à la séquence d'échantillons extraits. Ce « blc-ext » ne contient pas d'ADN. Il a été extrait et analysé en suivant le même protocole que celui utilisé pour les échantillons. La présence d'amplification dans ce blanc d'extraction confirme la contamination des extraits d'ADN et implique le rejet des résultats d'analyse. Une nouvelle extraction doit alors être effectuée, si possible.

3.6.1.2 Amplification

Pour chaque plaque de 96 puits, un contrôle négatif d'amplification (blc-amp) est réalisé. Le puits du « blc-amp » contient seulement le master-mix auquel aucun ADN n'a été ajouté. Une amplification de ce puits confirme la contamination de l'analyse et demande une reprise de l'amplification PCR si le contrôle d'extraction est satisfaisant.

3.6.2 Contrôle positif

3.6.2.1 Amplification avec souche

Pour chaque plaque de 96 puits, un contrôle positif d'amplification (CTRL+) est effectué. Le puits du CTRL+ contient le *master mix* auquel ont été ajouté 2 µl de l'ADN dilué 1/1000 de la souche ATCC 33152 dosée à 0,5 ng/µl. Un résultat positif doit être produit pour ce contrôle.

3.6.2.2 Amplification avec contrôle interne (IPC)

Un contrôle interne d'amplification (IPC) a été incorporé au *master mix*. L'IPC permet de différencier un résultat faussement négatif, relié à une inhibition d'amplification d'un vrai

résultat négatif. Le Applied Biosystem® TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Regents (Life Technologies, Ontario, Canada) marqué par le fluorophore VIC® a été utilisé pour tous les essais. Le VIC® a été choisi comme fluorophore puisque ses spectres d'excitation et d'émission (538 nm et 554 nm, respectivement) n'interfèrent pas avec ceux du FAM™ (494 nm et 518 nm, respectivement) qui est utilisé par les sondes spécifiques TaqMan® de nos systèmes de détection.

3.6.2.3 Ajout dosé

Un second contrôle de l'inhibition d'amplification a été effectué par des ajouts dosés d'ADN de la souche ATCC 33152 dans un puits distinct pour chaque échantillon. La récupération de l'ajout dosé doit se situer entre 50 et 200 % sinon une interférence est suspectée et le résultat ne peut être fourni pour cet échantillon.

3.7 Comparaison avec la méthode cultivable

3.7.1 Échantillons provenant d'essais de performance

Au total, 24 échantillons provenant des essais de performance du CDC (Centre for Diseases Control) ont été analysés afin de comparer les méthodes PCR et celle par culture sur gélose. Les essais ont été réalisés du mois d'avril 2013 au mois de février 2014. Contrairement aux échantillons terrains, le CDC fournit une valeur cible pour ces échantillons et il est possible de comparer les résultats obtenus aux résultats attendus.

3.7.2 Échantillons terrains

Afin de comparer les résultats obtenus pour l'analyse de *Legionella pneumophila* par la q-PCR et la v-PCR aux résultats obtenus par la méthode de culture, 59 échantillons terrains ont été analysés par les différentes méthodes. En raison de la présence d'inhibition au niveau de l'amplification ou en raison d'une récupération insuffisante de l'ajout dosé, six échantillons pour l'analyse par la q-PCR et neuf échantillons par la v-PCR ont dû être retirés de cette analyse.

3.8 Contrôle de l'inhibition

L'ajout d'albumine de sérum bovin (20mg/ml) (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA) à une concentration de 0,1 % par réaction PCR est reconnu comme moyen efficace de contrôle pour certains problèmes d'inhibition³⁵. Afin de vérifier l'effet de l'albumine sur les échantillons d'eau provenant de terrains, des analyses ont été réalisées en parallèle sur des extraits d'ADN avec et sans ajout d'albumine.

3.9 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel NCSS version 9.0.13⁹⁴. Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée afin de déterminer si des différences significatives étaient observables entre les traitements utilisés pour la production du concentrat. Par la suite, le test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis a été utilisé pour identifier les traitements de production du concentrat fournissant les meilleurs résultats.

Des analyses de régression ont été effectuées afin de démontrer l'existence de relations entre les différentes méthodes analytiques, soit la méthode par culture, la méthode de la q-PCR et la méthode de la v-PCR, et ce, pour les deux systèmes. L'analyse de corrélation de Pearson a également été réalisée afin de déterminer la fiabilité de l'estimation entre les résultats obtenus par la q-PCR, ceux de la v-PCR et ceux de la culture.

Les assumptions nécessaires à l'application des tests statistiques ont été évaluées préalablement au traitement des données. La distribution a été vérifiée par les tests d'Agostino et confirmée par l'examen du graphique en boîte. La constance de la variance des résiduels et l'homoscédasticité de celles-ci ont été confirmées par l'observation du graphique des résiduels en fonction de la variable X du modèle évalué. La linéarité du modèle est confirmée par le test de F effectué sur la pente du modèle à l'aide de l'analyse de variance.

4. RÉSULTATS

4.1 Évaluation des systèmes de détection

4.1.1 Extraits d'ADN des souches bactériennes de la collection

Les dosages d'ADN contenu dans l'ensemble des extraits obtenus à partir des cultures bactériennes de la collection de l'IRSST se retrouvent à l'annexe B. Les concentrations obtenues ont varié entre 5 et 290 ng/μl, selon les souches bactériennes. Le rapport de la densité optique A_{260}/A_{280} est un indicateur de la pureté des extraits d'ADN. Les ratios obtenus de tous les extraits d'ADN se situent entre 1,1 et 2,3, avec une moyenne à 1,8; ce ratio moyen est près de la valeur cible. Des rapports en dessous des niveaux souhaités ont été obtenus pour moins de 5 % des extraits. Avant d'utiliser les extraits d'ADN des souches pour les étapes de vérification et la validation des systèmes de détection moléculaire de la *Legionella*, tous les extraits ont été amplifiés à l'aide d'amorces dites universelles afin de confirmer la qualité de l'ADN pour leur utilisation par la méthode de la q-PCR. Afin d'uniformiser les quantités d'ADN présentes lors de ces essais, la concentration d'ADN de chacun des extraits bactériens a été dosée puis diluée à une concentration finale d'utilisation de 0,5 ng/μl. Au total, 279 souches provenant de 46 genres bactériens ont été extraites et amplifiées avant d'être utilisées pour les différentes étapes de la validation des systèmes de détection et de quantification. De ce nombre, l'ADN de 12 espèces différentes de *Legionella* a été extrait. Sur les six amorces universelles qui ont été testées, seule la paire 517F⁸⁰ et 1387R⁷⁹ a démontré des résultats satisfaisants pour l'amplification non spécifique de notre collection. La figure 6 présente les courbes du signal d'amplification en fonction du nombre de cycles de la q-PCR. L'ensemble des courbes d'amplification des souches de la banque démontre une bonne qualité de l'amplification par la réaction de la q-PCR.

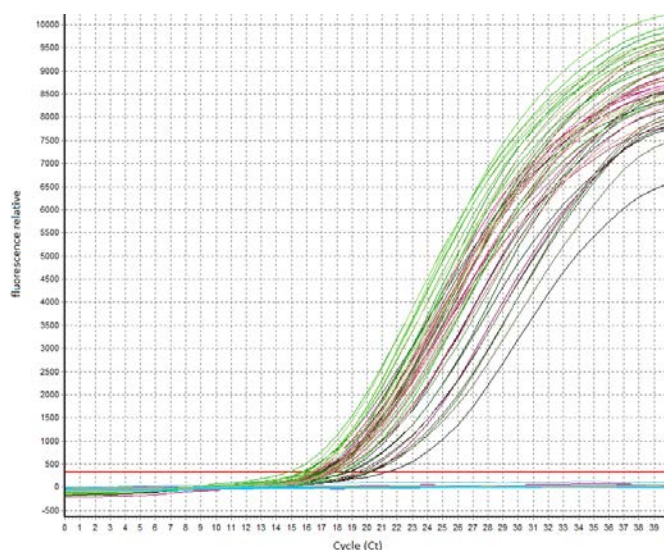


Figure 6 : Courbes d'amplification de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Amplification des extraits d'ADN provenant de la banque avec les amorces 517F et 1387R (gène codant pour le 16S).

4.1.2 Vérification des amorces d'amplification spécifiques

4.1.2.1 Gradients de température

Plusieurs amorces ont été évaluées afin de déterminer celles qui produiraient les meilleures performances pour les systèmes de détection de la *Legionella*. La première étape de l'évaluation consiste à vérifier la qualité d'amplification obtenue à différentes températures d'appariement pour chaque paire d'amorces ciblée. Cette étape permet de déterminer la température optimale d'appariement pour chaque paire d'amorces et de décider si elles peuvent être utilisées avec les sondes spécifiques de détection. Les températures d'appariement des amorces et de la sonde de détection doivent être semblables.

Le Mastercycle Realplex2 permet de programmer les cycles d'amplification de façon à obtenir un gradient de température lors de l'étape de l'appariement de chacun des cycles. Une température différente est programmée pour chaque colonne de la plaque à 96 puits. Ceci permet de tester simultanément chacune des paires d'amorces à 12 températures différentes. Les paires d'amorces ayant fournies les meilleures amplifications ont été les couples LP-mip-PT69 et LP-mip-PT70 pour l'amplification spécifique de *Legionella pneumophila* et le couple JFP/JRP pour l'amplification au niveau du genre *Legionella*. Le couple LP-mip-PT69 et LP-mip-PT70 a bien performé aux températures d'appariement se situant entre 53 et 55 °C alors que JFP et JRP performaient mieux aux températures entre 55 et 59 °C.

4.1.2.2 Essais d'inclusion et d'exclusion des amorces spécifiques

Les tests de sélectivité et de spécificité ont été effectués en réalisant l'amplification de l'ADN d'un grand nombre de souches bactériennes. Le couple d'amorces JFP et JRP pour la détection des *Legionella spp* amplifie un fragment de 386 paires de base (pb) du gène 16S de l'ARNr, et le couple Lp-mip-PT69 et Lp-mip-PT70 qui est sélectif à *Legionella pneumophila* amplifie un fragment de 186 pb du gène codant pour le mip (Macrophage Infectivity Potentiator).

Pour le couple JFP/JRP, le nombre de cycles (Ct) nécessaire à la détection des *L pneumophila* a été inférieur à 18 alors que pour les autres espèces du genre *Legionella*, les Ct ont tous été inférieurs à 30 (figure 7). Les souches de *L parisiensis*, *L busanensis* et *L londoniensis* étant celles pour lesquelles les Ct les plus élevés ont été observés. Environ 30 % des souches bactériennes externes au genre *Legionella* ont pu être amplifiées par ce couple d'amorces. Les Ct les plus faibles ont été de 30 pour *Bacillus subtilis* et *Serratia marcesens*. La sélectivité du système doit être bonifiée par l'ajout d'une sonde moléculaire spécifique Taqman® pour la détection.

Pour le couple Lp-mip-PT69 et Lp-mip-PT70, le nombre de cycles (Ct) nécessaire à la détection des *L pneumophila* a été inférieur à 21 et il a été supérieur à 33 pour les autres espèces du genre *Legionella* et les souches hors du genre *Legionella* (figure 7). Environ 20 % des souches non *pneumophila* ont été amplifiées par ce couple d'amorces. Les souches non ciblées ayant les Ct les plus faibles sont *Serratia marcesens* et *Chryseobacterium gleum*. Encore une fois, la sélectivité du système doit être bonifiée par l'ajout d'une sonde moléculaire de type Taqman® qui est spécifique pour la détection de l'espèce.

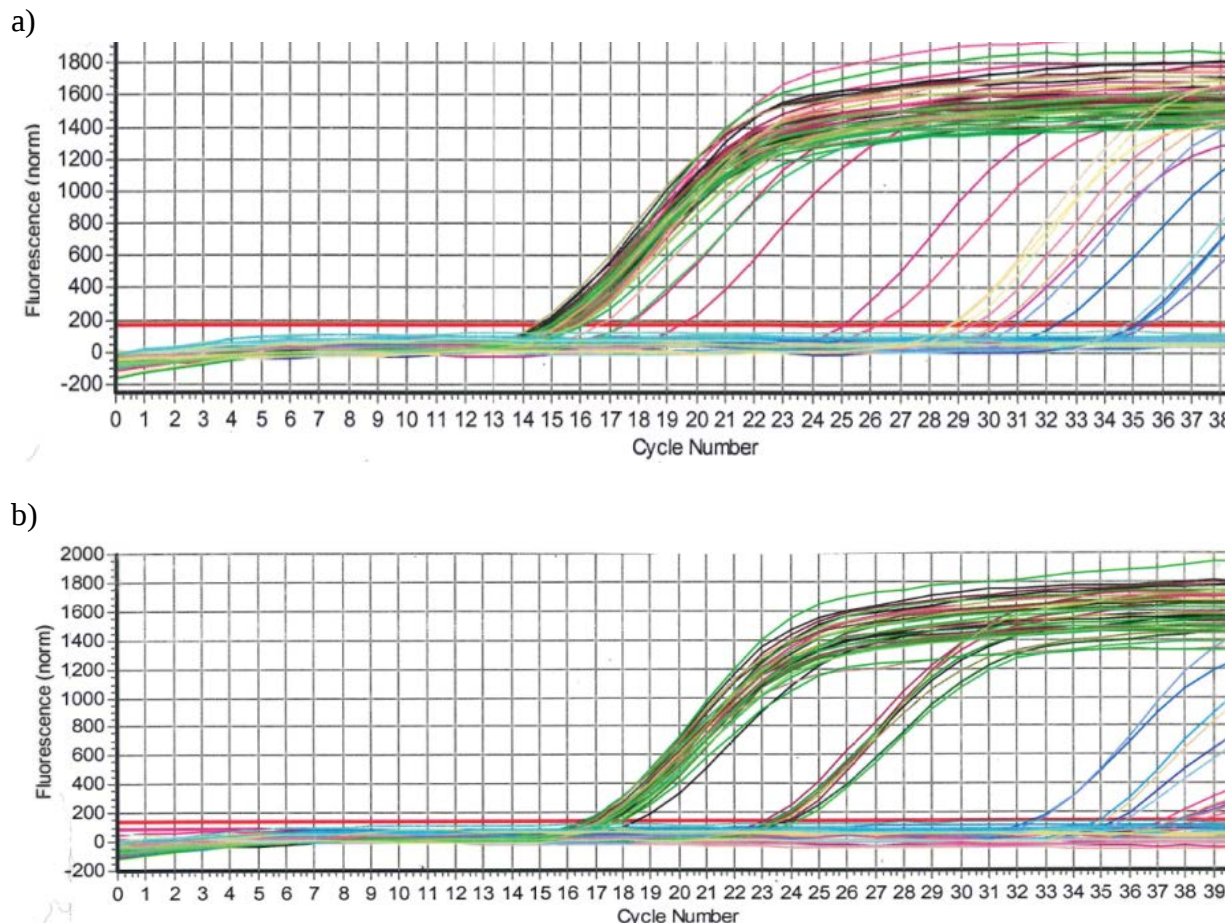


Figure 7 : Représentation des courbes d'amplification par q-PCR et SYBR® Green obtenues pour les deux paires d'amorces conservées lors des essais de spécificité : a) JFP/JRP et b) Lp-mip-PT69-Lp-mip-PT70.

4.1.3 Validation des systèmes amorces/sonde

Au total, six systèmes amorces/sonde ont été évalués afin de déterminer lesquels permettent les meilleures discriminations selon la spécificité recherchée : genre, espèce ou sérotype. Comme pour les évaluations effectuées lors des tests sur les paires d'amorces, la première étape consiste à vérifier par des gradients de température la qualité des signaux de fluorescence obtenue aux différentes températures. Cette étape permet de déterminer la température optimale qui doit être utilisée dans les programmes d'amplification de chaque système amorces/sonde :

- 60-61 °C pour PT69-PT70: LpneuFL et PT69-PT70: Lpneu LC;
- 62,5 °C pour JFP/JRP: Leg LC;
- 56-60 °C pour P66/P65: Sg1-PB;
- 49 °C pour PAN-F-PAN leg R₁: PAN leg-P et PAN-F-PAN leg R: PAN leg-P.

Les essais d'inclusion et d'exclusion ont été réalisés sur cinq des systèmes amorces/sonde à la température retenue pour chaque système.

4.1.3.1 PT69-PT70: LpneuFL (*Legionella pneumophila*)

La spécificité du système PT69-PT70: LpneuFL (LP-mip-PT69, LP-mip-PT70, LpneuFL) est excellente. Le système détecte les 130 souches de *Legionella pneumophila* testées (annexe A). Le nombre de cycles nécessaire à la détection (Ct) a varié entre 11 et 34 cycles selon les souches testées. De plus, 85 % des détections ont été obtenues avec des Ct inférieurs à 24. En ce qui a trait à la sélectivité, trois souches non identifiées comme étant des *Legionella pneumophila* ont été détectées par ce système. Deux de ces souches proviennent d'échantillons terrains pour lesquelles une identification de l'espèce n'a pas été possible. Ces résultats démontrent que ce marqueur a une spécificité de 100 % et une sélectivité de 97 % pour l'espèce *Legionella pneumophila*. Le résumé des tests de sélectivité se retrouve au tableau 6. L'optimisation du système PT69-PT70: LpneuFL a permis de fixer les concentrations de MgCl₂ à 2 mM et la concentration de la sonde de type TaqMan à 0,375 µM dans la réaction PCR.

Tableau 6 : Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur PT69-PT70: LpneuFL.

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

La limite de détection obtenue par l'analyse de 10 préparations d'ADN produite à la limite estimée à l'aide de dilutions par épuisement a été de 600 UG/L pour une détection positive dans 50 % des analyses, alors que la limite de quantification a été évaluée à 2 UG/µL pour une détection positive dans 100 % des essais. Pour ce système de détection spécifique à *Legionella pneumophila*, la répétabilité et la reproductibilité ont été calculées sur quatre concentrations différentes en effectuant six répétitions d'analyse complète de l'extraction à l'amplification. Une répétabilité de 3 % et une reproductibilité de 6 % ont été obtenues sur les logarithmes des concentrations. Les plus grandes variations ont été constatées avec les concentrations les plus faibles, soit la concentration de 16 UG/µl. Les coefficients de variation calculés sur les Ct obtenus entre les réplicats de trois amplifications d'un même extrait d'ADN ont été inférieurs à 1,2 % pour 25 extractions indépendantes. Les coefficients de variation globaux de la méthode, y inclus l'extraction et l'amplification qui ont été calculées sur les Ct et opérées sur une même solution, ont été inférieurs à 1,5 % pour des essais sur six solutions indépendantes.

4.1.3.2 PT69-PT70: LpneuLC (*Legionella pneumophila*)

La spécificité du système PT69-PT70: LpneuLC (LP-mip-PT69, LP-mip-PT70, LpneuLC) est également excellente. Ce système détecte l'ensemble des souches de *Legionella pneumophila* testées (annexe A).

Le nombre de cycles nécessaire pour leur détection (Ct) a varié entre 21 et 33. En matière de sélectivité, une seule souche non *Legionella pneumophila* a été détectée sur les 47 souches testées.

Les limites de détection et de quantification obtenues par l'analyse des sept préparations d'ADN à la limite de détection estimée a été de 1 UG/µl pour une détection positive dans 100 % des essais. Pour ce système, la répétabilité a été calculée à 16 % et la reproductibilité à 23 %. En plus de démontrer une répétabilité plus faible, l'intensité de la fluorescence observée a été moindre pour ce système lorsque comparée au système PT69-PT70: LpneuFL, et pour cette raison, les évaluations n'ont pas été poursuivies. Une nouvelle synthèse de la sonde devrait être demandée avant de poursuivre les tests.

4.1.3.3 JFP/JRP: LegLC (*Legionella spp*)

La spécificité du système JFP/JRP: LegLC (JFP, JRP, LegLC) est très bonne pour les bactéries du genre *Legionella* (tableau 7). Ce système détecte l'ensemble des 177 souches de *Legionella spp* testées (annexe A). Les Ct ont varié de 10 à 36 selon la souche testée. Sur le plan de la sélectivité, une seule des 112 souches n'appartenant pas au genre *Legionella* a été détectée par ce système. Il s'agit d'une souche de *Fluoribacter gormanii*, qui appartenait jusqu'à très récemment au genre *Legionella*. Ces résultats démontrent que ce marqueur a une spécificité de 100 % et une sélectivité de 99 % pour le genre *Legionella*.

Tableau 7 : Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur JFP/JRP: LegLC.

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

L'optimisation du système a permis de déterminer que, pour une concentration de la sonde LegLC de 0,3 µM, la concentration optimale du MgCl₂ est de 2 mM par réaction. La limite de détection pour ce système est de 450 UG/L avec une détection positive dans 60 % des essais. Les coefficients de variation calculés sur les Ct entre trois amplifications d'un même extrait ont été inférieurs à 1,9 % pour des essais effectués sur 18 extractions indépendantes alors que les coefficients de variation globaux calculés sur les Ct de trois extractions/amplifications opérées sur une même solution ont été inférieurs à 1,3 % pour des essais réalisés sur six solutions. La répétabilité est de 5 % et la reproductibilité analytiques de 6 %.

4.1.3.4 PAN-F-PAN-leg-R: PAN leg-P (*Legionella spp*)

La spécificité du système PAN-F-PANleg-R: PAN leg-P est très bonne pour les bactéries du genre *Legionella*. Ce système détecte 142 des 143 souches de *Legionella spp* testées (annexe A). Les Ct ont varié de 26 à 35 selon la souche testée. Sur le plan de la sélectivité, une seule des 112 souches n'appartenant pas au genre *Legionella* a été détectée par ce système. Il s'agit également de la souche *Fluoribacter gormanii* qui a été détectée par le système JFP/JRP: LegLC. Ces résultats démontrent que ce marqueur a une spécificité de 99 % et une sélectivité de 99 % pour le

genre *Legionella*. Les Ct nécessaires à la détection ayant été généralement supérieurs avec ce système que ceux requis par le JFP/JRP: LegLC, son évaluation ne s'est pas poursuivie. Cependant, ceci ne signifie pas qu'il ne serait pas utilisable après quelques étapes d'optimisation.

4.1.3.5 P66/P65: Sg1 (*Legionella pneumophila* séroroupe 1)

La spécificité de ce système a été réalisée sur plus de 200 souches, dont 20 de *Legionella pneumophila* du séroroupe 1. Une seule souche terrain, qui avait été caractérisée par le laboratoire comme étant du séroroupe 1, n'a pas été détectée par ce système, ce qui représente un taux de faux négatif de 5 %, si la caractérisation par le laboratoire est considérée être la bonne. En matière de sélectivité, trois souches n'appartenant pas au séroroupe 1 ont pu être détectées par le système P66/P65: Sg1, toutes de souches terrains caractérisées par le test d'agglutination au latex au laboratoire (Oxoid, Ontario, Canada). Ces résultats pourraient représenter un taux de faux positif pour le séroroupe 1 de 1,4 %. Aucune des 18 souches provenant de 13 autres espèces *Legionella* n'a été détectée par ce système (tableau 8).

Tableau 8 : Résultats des tests de sélectivité et de spécificité du marqueur P66/P65: Sg1.

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

Les Ct obtenus pour les détections positives ont varié de 20 à 24. Les courbes d'amplification obtenues à l'aide de ce système sont représentées à la figure 8 à titre d'exemple de résultats des tests de sélectivité et spécificité.

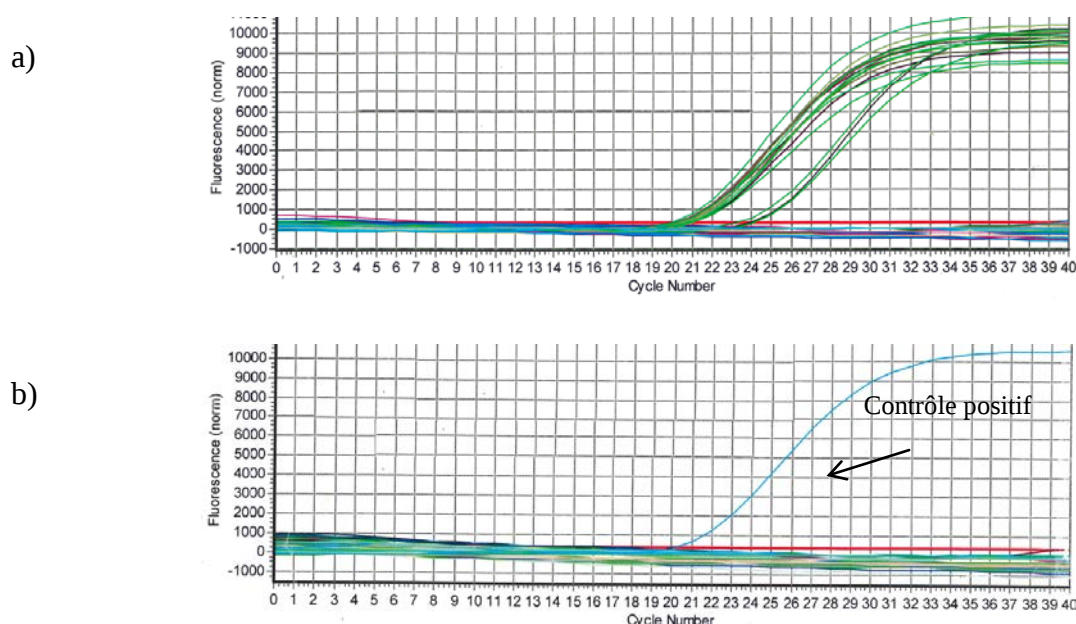


Figure 8 : Exemple représentant les courbes d'amplification par q-PCR et la détection Taqman® obtenues pour les essais de spécificité et de sélectivité effectués avec le système P66/P65 : LegSg1 : a) Spécificité, b) Sélectivité.

La limite de détection pour ce système est de 190 UG/l avec une détection positive dans 60 % des essais. La répétabilité de ce système est de 3 % et la reproductibilité est de 8 %.

4.2 PCR viable (v-PCR)

4.2.1 Effet des agents de blocage sur la capacité de culture résiduelle des *Legionella pneumophila*

L'analyse de la capacité de croissance résiduelle de *Legionella pneumophila*, après exposition aux deux agents de blocage évalués, a permis de démontrer que le EMA avait un effet très nocif sur les cellules de *Legionella*. En effet, aucune croissance résiduelle n'a été obtenue lors des essais avec ce produit. Par contre, bien que les essais avec le PMA démontrent une certaine diminution de la concentration de cellules cultivables dans le bouillon, les effets nocifs sont bien inférieurs. Le PMA sera le seul produit utilisé pour l'optimisation des tests de différenciation viable/non viable par PCR.

4.2.2 Performance du PMA

Les différents essais effectués avec le PMA ont permis d'établir que les conditions optimales d'utilisation sont obtenues pour les concentrations de 50 ou 100 μ M et une durée d'exposition de 10 minutes avec une lampe de projection de 600 Watts (Smith-Victor corporation, IL, USA) et une exposition de quatre minutes avec le système de photo-activation PhAST blue (GenIUL, Barcelone, Espagne). La figure 9 représente les résultats de la v-PCR obtenus lors d'essais effectués sur des suspensions bactériennes contenant différents niveaux de cellules non viables et

viables. Ces résultats démontrent que le PMA bloque de façon efficace l'amplification des cellules non viables présentes dans le bouillon de culture. Une diminution proportionnelle des concentrations (UG/ μ l) est observable avec chaque pourcentage de cellules non viables additionné dans le bouillon de cellules viables.

Il faut toutefois souligner que la suspension a tout de même produit, avec 0 % de cellule cultivable, une légère amplification. Ce fait démontre que le PMA n'a pas une efficacité absolue de blocage pour l'amplification de l'ADN des cellules non cultivables et qu'une certaine proportion de l'amplification doit être attribuée aux cellules non viables mais amplifiables.

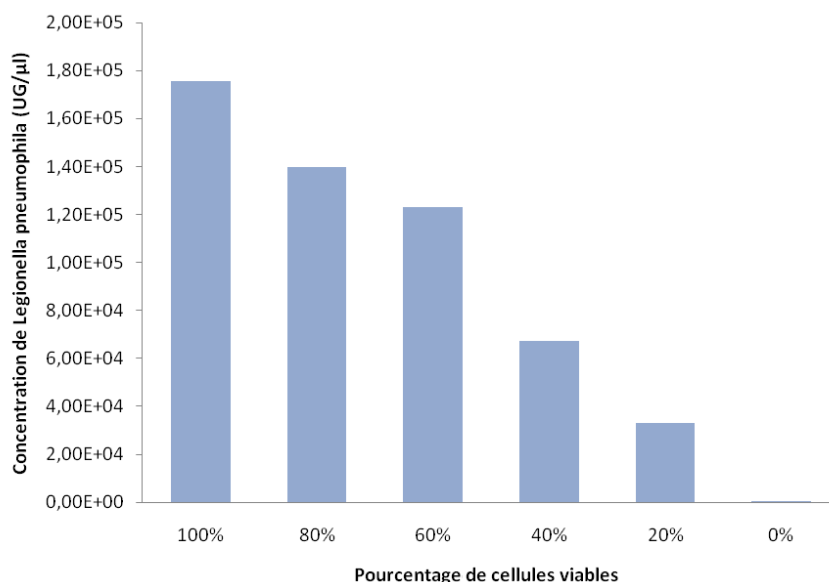


Figure 9 : Concentrations (UG/ μ l) de *Legionella pneumophila* détectées par l'approche de la v-PCR avec les amorces PT69-PT70 dans des bouillons de culture ayant des proportions variables de cellules cultivables et non cultivables. Concentration initiale de 10^7 UFC/ml. La durée du traitement est de 10 minutes et la concentration de PMA est de 100 μ M.

4.3 Préparation du concentrat de l'échantillon

Trois méthodes différentes (filtration, grattage, centrifugation) ont été testées pour la préparation du concentrat de l'échantillon. L'analyse de la distribution des données a été effectuée avec le test de Kolmogorov-Smirnov à la suite d'une transformation logarithmique de celles-ci. Ce test ne permet pas de rejeter la distribution normale des concentrations mesurées lors des essais pour préparer le concentrat et pour extraire les cellules bactériennes. L'analyse de variance permet de confirmer la présence d'une différence significative entre les traitements de préparation du concentrat testés ainsi qu'entre les types d'eau analysés lorsque les extractions sont faites avec la trousse FastDNA Spin Kit (Figure 10). Le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer permet de démontrer que le traitement par filtration fournit des concentrations significativement plus élevées ($F=32,42$; $p<0,000001$), et ce, peu importe le type d'eau analysé. Dans ce traitement, le filtre entier est incorporé au processus d'extraction de l'ADN et la séparation du

concentrat nécessaire pour appliquer la technique de la v-PCR n'est pas possible. De plus, une différence en ce qui a trait aux concentrations mesurées est observable selon les types d'eau analysés ($F=27,14$; $p=0,000016$).

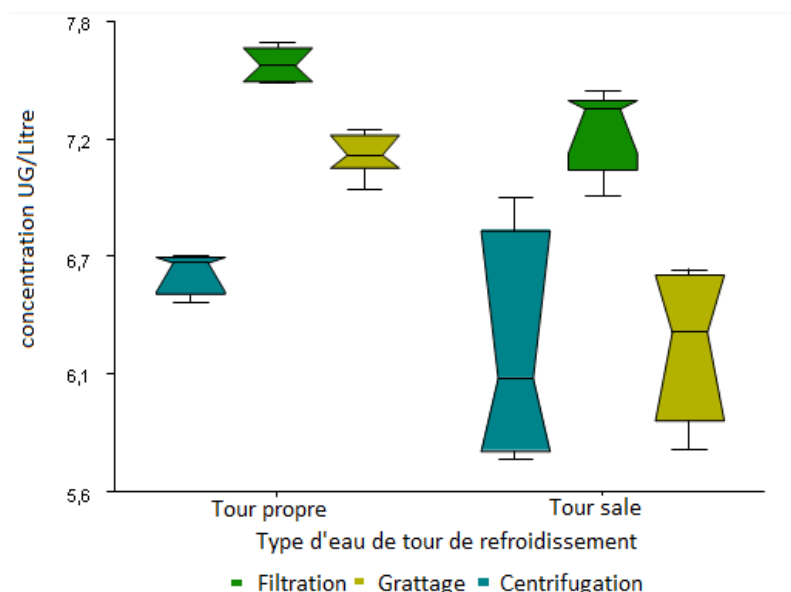


Figure 10 : Graphique en boîte représentant les concentrations de *Legionella pneumophila* obtenues pour chaque traitement appliqué de concentration/extraction des cellules bactériennes de l'échantillon. Résultats obtenus par l'analyse avec le système PT69-PT70: LpneuFL. Essais réalisés sur des eaux provenant de tours de refroidissement dites propres et sales selon la charge de la matière en suspension dans l'eau. Trousse d'extraction utilisée Fast DNA.

Suite au choix de la trousse ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ pour l'extraction de l'ADN, un deuxième essai a été effectué pour confirmer la méthode de préparation du concentrat. Lors de cet essai, les deux méthodes par filtrations ont été testées. L'analyse de variance ne permet pas de démontrer une différence entre les deux méthodes ($F=0,6$; $p=0,46$). Les concentrations obtenues par chaque méthode sont représentées à l'aide du graphique en boîte à la Figure 11. Sur ce graphique il est possible de constater une variabilité au niveau des résultats.

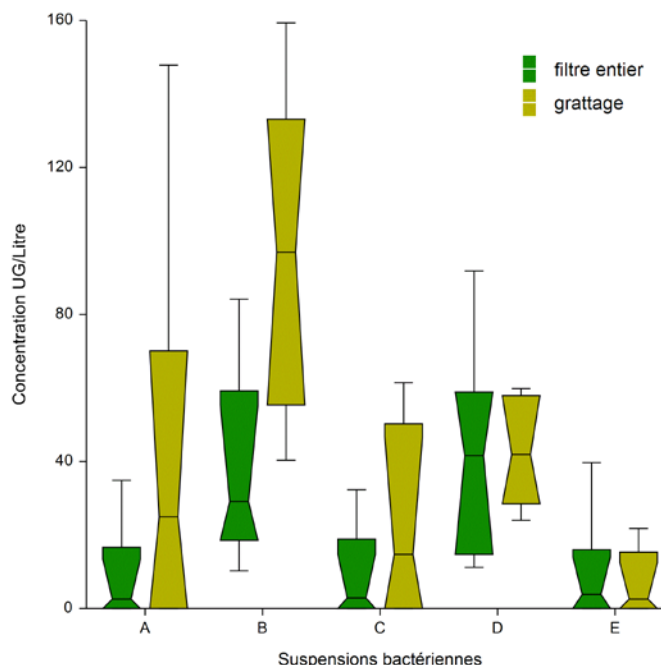
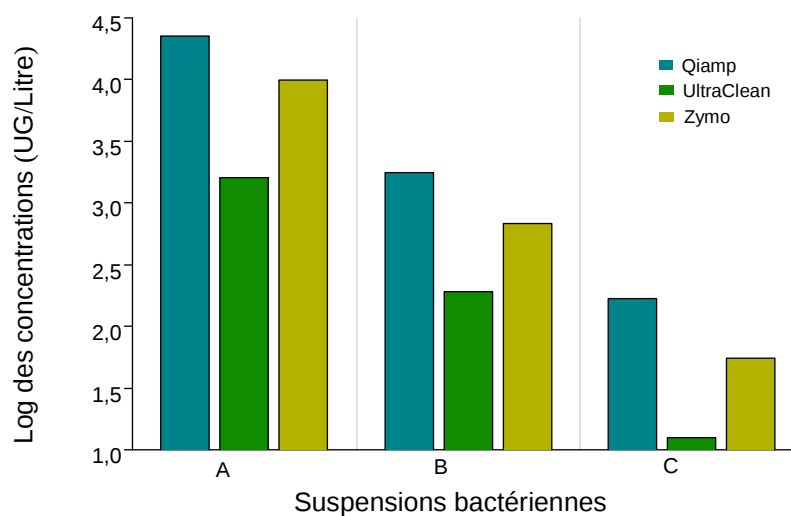


Figure 11 : Graphique en boîte représentant les concentrations de *Legionella pneumophila* obtenues pour chaque traitement de concentration/extraction des cellules bactériennes de l'échantillon appliqué. Résultats obtenus par l'analyse avec le système PT69-PT70: LpneuFL. Essais réalisés sur des suspensions bactériennes préparées à partir d'eau de tours dites propres. Trousse d'extraction utilisée ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™.

4.4 Extraction de l'ADN contenu dans le concentrat d'échantillon

À la suite de l'obtention du concentrat de l'échantillon, l'extraction de l'ADN des cellules bactériennes récupérées a été effectuée. Plusieurs méthodes ont été évaluées pour optimiser cette étape de l'analyse : des méthodes d'extraction maison ainsi que des méthodes fournies par des compagnies sous forme de trousse (kit). Les méthodes maison se sont rapidement avérées trop laborieuses, plus variables et moins efficaces. Les essais de comparaison ont permis d'observer que l'efficacité d'extraction et la capacité d'amplification selon les trousse d'extraction étaient très variables. La figure 12 présente un aperçu des résultats de nombreux essais effectués pour évaluer les trousse d'extraction. Les graphiques de cette figure permettent de constater que pour une même suspension et une même amplification, les concentrations obtenues sont différentes selon les trousse utilisées. Les trousse QIAamp DNA Mini Kit, FastDNA Spin Kit et ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep produisent les meilleurs résultats. La combinaison de la préparation du concentrat par grattage et de l'extraction de l'ADN par la trousse de ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep produit un protocole de manipulation simple qui est approprié pour l'implantation d'une analyse de routine.

a)



b)

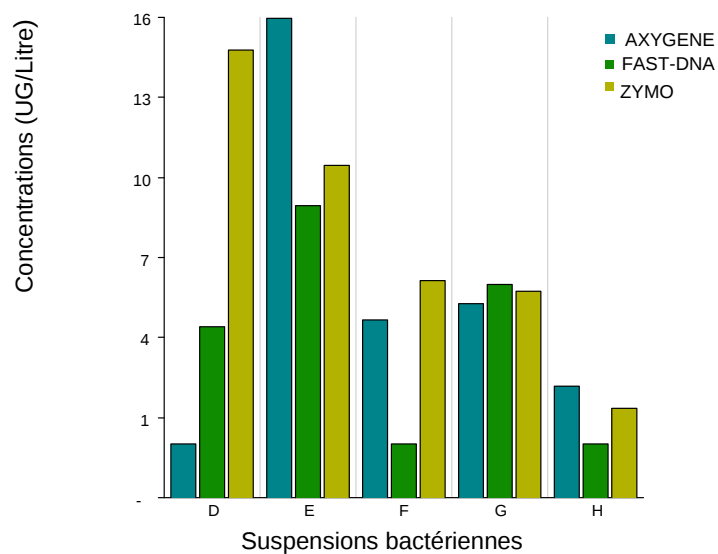


Figure 12 : Comparaison des concentrations de *Legionella pneumophila* obtenues par l'amplification avec le système PT69-PT70: LpneuFL pour différentes méthodes d'extraction (A-H : Suspensions de Legionella).

- a) QiAmp DNA Mini Kit, UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit et ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™;
- b) FastDNA Spin Kit, ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ et Axygen® AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit.

4.5 Purification de l'ADN

La qualité de l'ADN utilisé a une influence sur la qualité des amplifications obtenues. Deux méthodes de purification de l'ADN ont été testées (QIAquick PCR Purification Kit, Ultraclean® PCR Clean-Up Kit samples) afin d'évaluer si de meilleurs résultats pouvaient être obtenus à la suite d'une purification. Les deux méthodes ont produit des concentrations beaucoup plus faibles d'ADN et n'ont pas été retenues pour la suite des essais.

4.6 Contrôles de la méthode PCR

La sensibilité de l'analyse avec la méthode PCR pour la détection de *Legionella* demande l'incorporation de plusieurs contrôles au processus analytique. Ceux-ci ont été évalués, et ce, dans le but de renforcer la confiance au regard des résultats produits. Les contrôles négatifs d'extraction et l'amplification sont incorporés pour chaque série d'analyses.

4.6.1 Contrôles positifs

Un contrôle positif constitué de l'extrait de l'ADN de la souche ATCC 33152 est inclus dans chacune des plaques afin de contrôler la capacité d'amplification et d'éviter les faux négatifs reliés à un problème général d'amplification de la plaque. Aucun résultat n'a été produit lorsque le contrôle positif de la plaque était négatif.

En plus de ce contrôle positif de la plaque, un contrôle interne d'amplification (IPC) est inclus dans la solution et permet de faire la distinction entre un vrai résultat négatif et un faux négatif relié à un problème d'inhibition de la réaction PCR. Le tableau 9 présente les différents résultats et interprétations possibles avec l'IPC. Le contrôle IPC a été évalué avec plusieurs solutions PCR et tous les résultats obtenus étaient satisfaisants. L'IPC ne provoque pas d'effet négatif sur l'amplification des systèmes de détection qui ont été utilisés pour l'analyse des *Legionella spp.*

Tableau 9 : Condensé des résultats attribuables à un contrôle interne d'amplification (IPC).

Échantillon \ IPC	Négatif	Positif
Négatif	Aucun résultat ne peut être émis	Positif si les autres contrôles sont satisfaisants
Positif	Négatif si les autres contrôles sont satisfaisants	Positif si les autres contrôles sont satisfaisants

Pour chaque échantillon, un ajout dosé a également été effectué dans un puits distinct contenant l'ADN de l'échantillon. S'il n'y a pas d'inhibition de la réaction PCR, la concentration mesurée en *Legionella* dans ce puits doit correspondre à la concentration de *Legionella* dans l'échantillon additionnée à celle de *Legionella* utilisée dans l'ajout dosé. Une récupération variant entre 50 et

200 % est jugée acceptable pour ce contrôle. Certains problèmes ont été rencontrés avec ce contrôle d'ajout dosé. En effet, une charge trop importante en ADN peut provoquer un problème d'inhibition de la réaction PCR. Il faut donc interpréter avec précaution lorsque les concentrations en *Legionella* sont élevées. Les pourcentages de récupération de certains échantillons très chargés n'ont pu satisfaire les critères d'acceptation de l'analyse. La dilution de l'échantillon a été effectuée pour certains d'entre eux afin de contrôler l'inhibition observée. La fixation de la ligne de base à 350 de fluorescence a également amélioré le pourcentage de récupération des ajouts dosés.

4.7 Essais du contrôle de l'inhibition par l'albumine

La comparaison des concentrations mesurées avec et sans albumine (figure 13) permet de démontrer que l'albumine a un effet favorable sur le contrôle de l'inhibition pour certains échantillons lorsque le système PT69-PT70: LpneuFL est utilisé. Les concentrations obtenues lorsque l'albumine est ajoutée à la solution mère de la PCR peuvent être jusqu'à 90 % plus grandes que lorsque l'albumine n'est pas utilisée. La *Legionella spp* a pu être quantifiée dans un échantillon alors que sans albumine rien n'était détecté initialement. La performance de l'albumine a toutefois été variable selon l'eau analysée ou le système de détection. L'ajout de l'albumine peut être une solution si aucun autre contrôle n'est efficace.

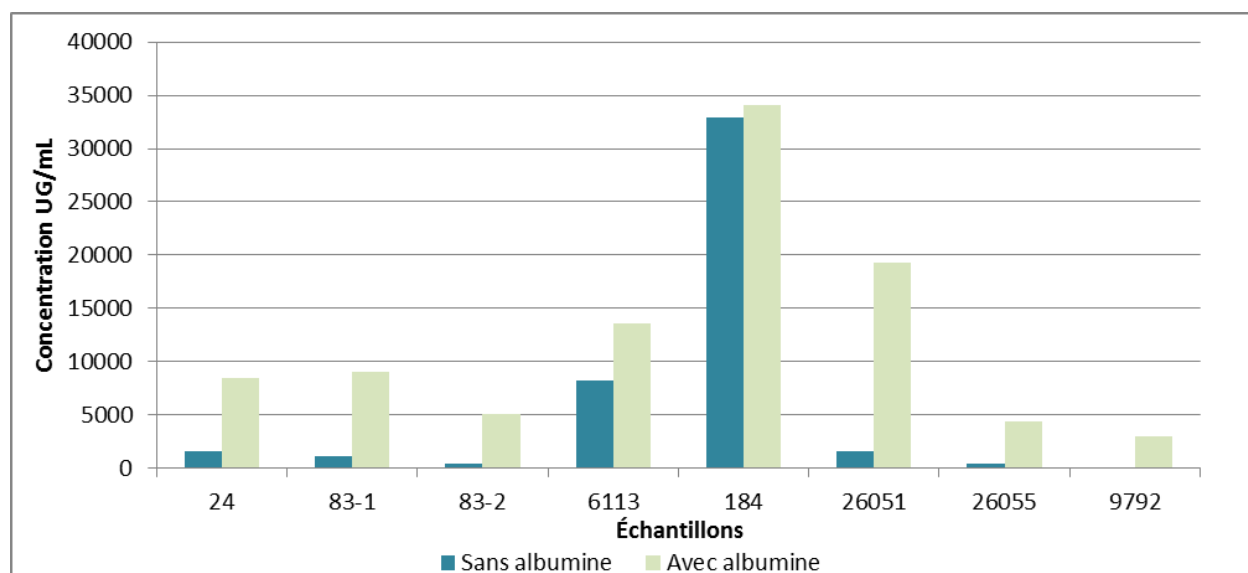


Figure 13 : Comparaison des concentrations de *Legionella pneumophila* mesurées dans des échantillons terrains avec et sans albumine ajoutée à la réaction PCR.

4.7.1 Critères de la réaction PCR et des extraits d'ADN

L'efficacité de la réaction PCR doit être entre 75 et 125 %. Elle est calculée automatiquement par le logiciel du Realplex version 2.5.2 (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à partir des résultats. En plus de l'efficacité de la réaction PCR, la pente de la droite de la courbe standard est également observée et doit être entre -2,985 et -4,115.

Lors de l'extraction des échantillons, certains contaminants ne peuvent être éliminés totalement de la suspension d'ADN. Un dosage de l'ADN à l'aide du BioPhotometer (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) peut être effectué afin de détecter la présence de certains contaminants et de prévenir ou comprendre certains problèmes lors de l'amplification. La présence de protéines est suspectée lorsque le ratio 260 nm/280 nm est faible, alors que la présence de sel, de solvant ou de produit organique est plutôt traduite par un faible ratio 260 nm/230 nm. Tous ces critères doivent être évalués pour assurer la fiabilité des résultats et documenter les interférences probables de la réaction PCR.

4.8 Comparaison résultats : PCR par rapport à culture

4.8.1 Échantillons provenant d'essais de performance

Les résultats présence/absence obtenus de 24 échantillons provenant d'essais de performance envoyés par le CDC sont présentés au tableau 10.

Tableau 10 : Résultats obtenus par les méthodes de culture sur gélose et par la méthode de la q-PCR comparativement à ceux attendus par la CDC. Résultats non quantitatifs, présentés sous forme de présence/absence.

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

La méthode par la q-PCR a produit un seul résultat faux positif pour la détection de *Legionella pneumophila* et deux résultats faux négatifs pour la détection des *Legionella spp* alors que la méthode par culture a produit 11 résultats faux négatifs pour *Legionella pneumophila*. La méthode par culture a engendré plus de 40 % de résultats faux négatifs pour les comparaisons réalisées sur les essais de performance de la CDC. Les bactéries dans ces échantillons sont sous forme lyophilisées.

La figure 14 illustre les droites de tendance obtenues des échantillons produits par les analyses des essais de performances du CDC. Lorsque les résultats sont analysés de façon quantitative, aucune corrélation ne peut être démontrée entre les résultats par q-PCR et ceux par culture. Un coefficient de seulement 0,37 est obtenu lorsque les deux méthodes sont comparées sur ces échantillons. Par contre, une corrélation de 0,72 est obtenue entre les concentrations qui sont attendues par la CDC pour leurs essais et les concentrations obtenues par la méthode de la q-PCR. Ceci est une bonne corrélation et les résultats par PCR se rapprochent beaucoup plus des résultats attendus par le CDC que de ceux obtenus par la méthode de culture.

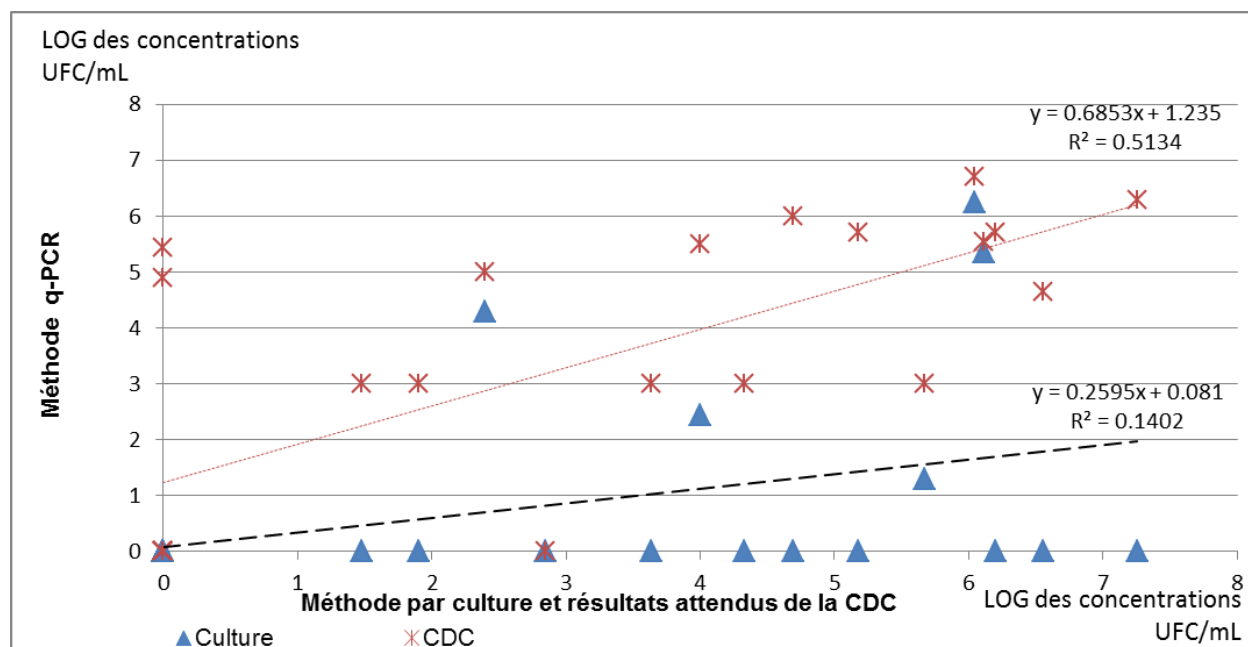


Figure 14 : Droites de tendance et coefficients de corrélation entre les résultats obtenus par la méthode q-PCR et ceux obtenus par la méthode par culture ainsi que les résultats attendus de la CDC.

4.8.2 Échantillons terrains

Cinquante-neuf échantillons terrains ont été analysés par les méthodes de culture, de la q-PCR et de la v-PCR pour la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* et *Legionella spp.* Une comparaison qualitative des résultats obtenus par les différentes méthodes permet de constater une excellente concordance entre les méthodes. Le tableau 11 présente le résumé des concordances calculées pour la q-PCR et la v-PCR avec les deux systèmes de détection testés. Il est à souligner que 100 % des échantillons pour lesquels un résultat positif a été obtenu par la méthode de culture ont également été positifs pour la détection des *Legionella spp* par la q-PCR et 82,6 % par la v-PCR. Par contre, les résultats par la q-PCR sont parfois positifs tandis qu'ils seront négatifs par culture.

Tableau 11 : Résultats obtenus sur des échantillons provenant du terrain par les méthodes de culture et de PCR pour les systèmes de détection LegLC et LpneuFL. Comparaisons de type présence/absence.

<i>Legionella spp</i>		PCR JFP/JRP: LegLC				
Culture	q-PCR			v-PCR		
	Positive	Négative	DT	Positive	Négative	DT
Positive (46)	46 (100%)	0		38 (82,6%)	6 (13%)	2 (4,3%)
Négative (13)	8 (61,5%)	5 (38,5%)		5 (38,5%)	7 (15,2%)	1 (2,2%)
Total	59 (100%)			56 (95%)		

<i>Legionella pneumophila</i>		PCR PT69-PT70: LpneuFL				
Culture	q-PCR			v-PCR		
	Positive	Négative	DT	Positive	Négative	DT
Positive (43)	39 (90,7%)	2 (4,6%)	2 (4,6%)	26 (60%)	13 (30%)	4 (10%)
Négative (15)	3(20%)	9(60%)	3 (20%)	0	10 (66,7%)	5 (33,3%)
Total	53 (91%)			51 (88%)		

DT: difficulté technique empêchant l'analyse

Les résultats inférieurs à la limite de détection analytique ont été remplacés par une valeur équivalente à la limite de détection divisée par la racine carrée de 2. Les régressions permettent d'apprécier les modèles de prédiction entre les trois méthodes, ainsi que d'évaluer les relations. Les graphiques des figures 15 et 16 représentent les régressions obtenues entre les méthodes PCR (q-PCR et v-PCR) et la méthode par culture pour les systèmes LpneuFL et LegLC. L'analyse de corrélation montre l'existence d'une relation linéaire modérée entre les logarithmes des concentrations obtenues par la méthode de culture et celles obtenues par les méthodes PCR, lorsque les analyses sont effectuées à l'aide du système LpneuFL. Les coefficients de corrélation de Pearson calculés entre la méthode de culture et les méthodes de q-PCR et v-PCR sont respectivement de 0,71 et 0,60 pour ce système. Pour le système de détection JFP/JRP: LegLC pour les *Legionella sp*, les coefficients de corrélation sont beaucoup moins élevés. Ils sont de seulement 0,35 pour la q-PCR et de 0,17 pour la v-PCR.

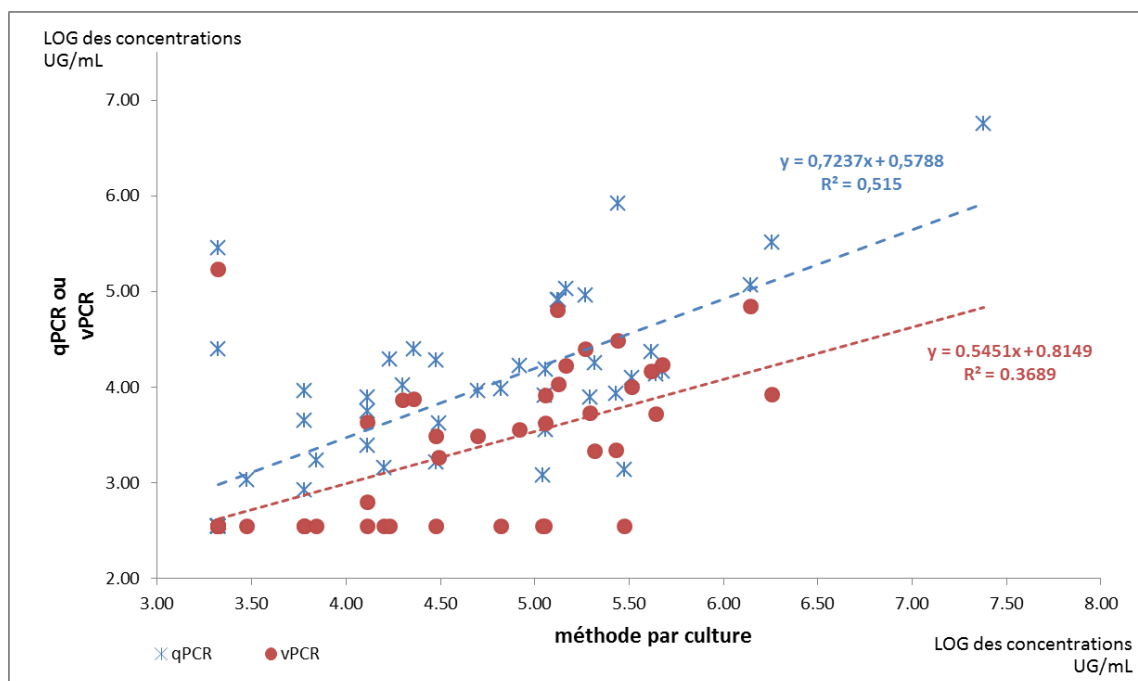


Figure 15 : Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par la méthode de culture et ceux obtenus par les méthodes de q-PCR et v-PCR pour le système PT69-PT70: LpneuFL.

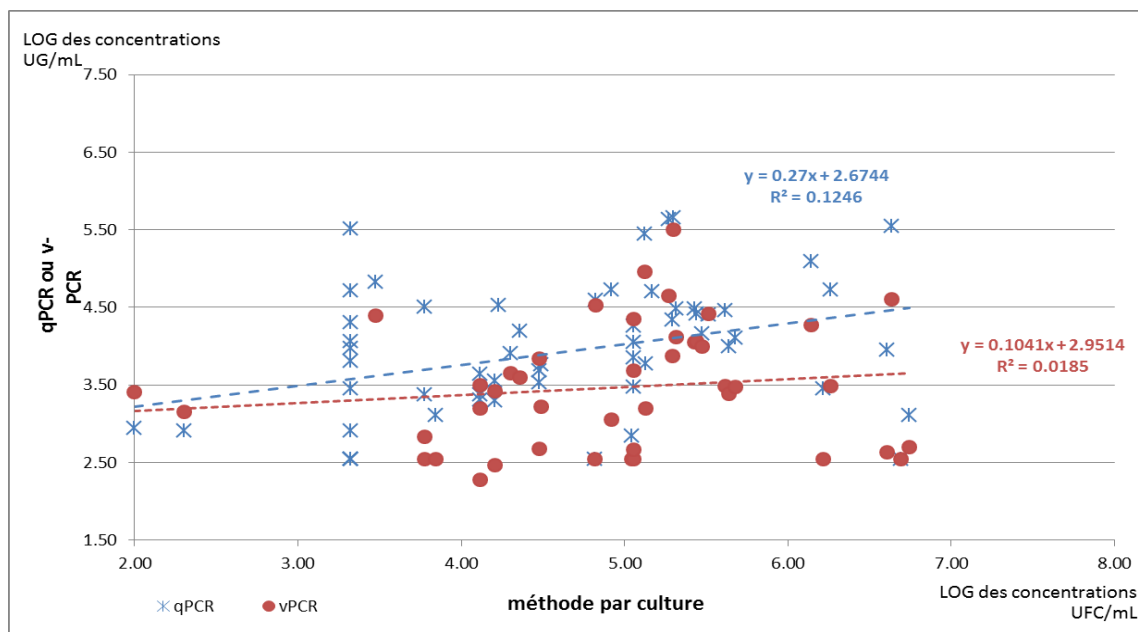


Figure 16 : Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par la méthode de culture et ceux obtenus par les méthodes de q-PCR et v-PCR pour le système JFP/JRP: LegLC.

Ces coefficients s'illustrent bien par la dispersion des données et par les éclipses de probabilité présentées à la figure 17. L'analyse de corrélation de Spearman a également été effectuée afin de déterminer la capacité de prédiction entre les résultats de la q-PCR et ceux de la v-PCR.

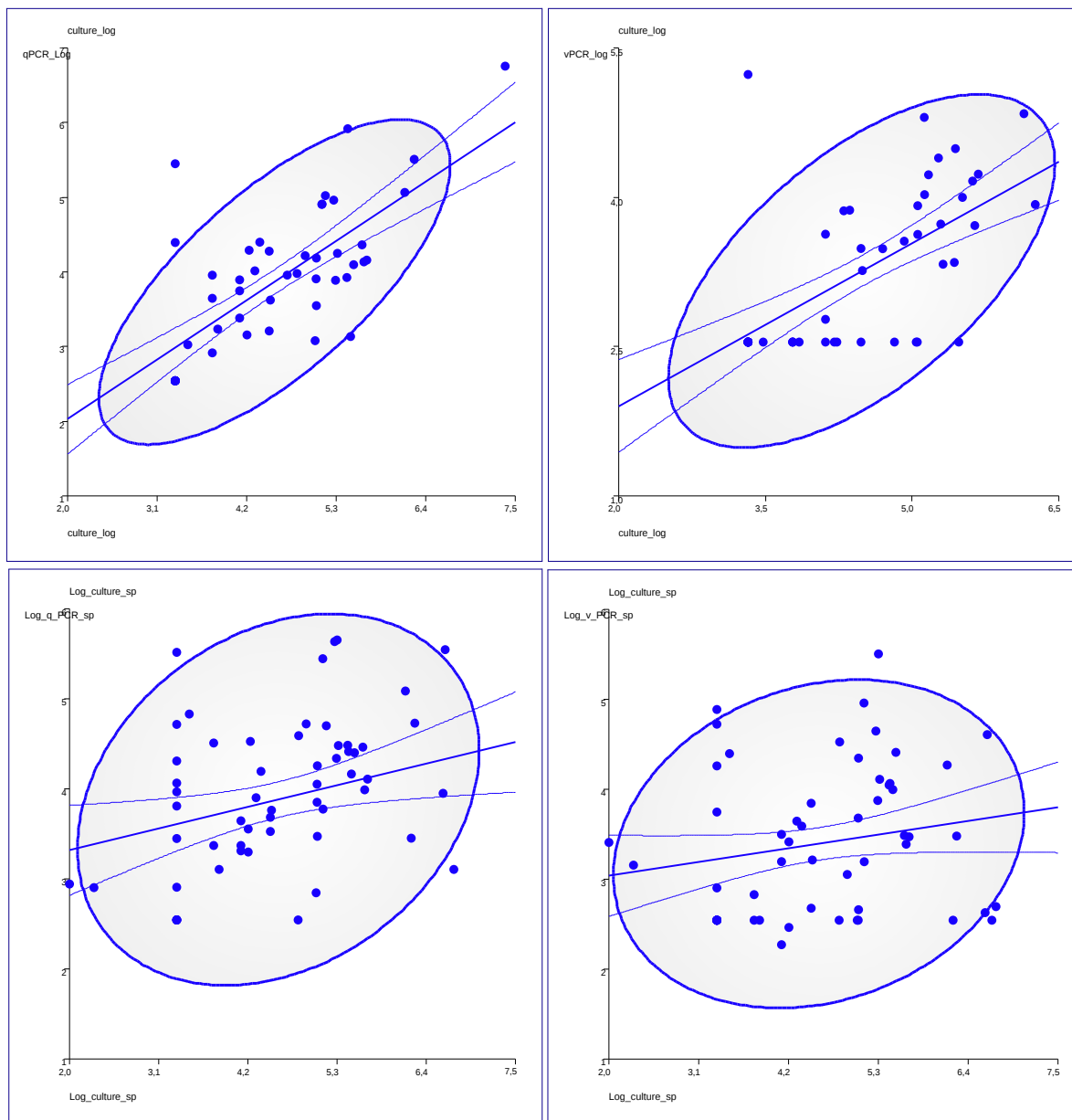


Figure 17 : Représentation graphique des éclipses de probabilité obtenues pour les méthodes de PCR en fonction de la méthode par culture pour les systèmes LpneuFl et Leg LC. Haut: LpneuFl; bas: Leg LC; gauche q-PCR et droite v-PCR.

Les figures 18 et 19 représentent les droites de tendance entre les deux méthodes PCR. Une bonne corrélation est obtenue entre les deux méthodes PCR lorsque l'analyse est effectuée avec le système JFP/JRP: LegLC, et PT69-PT70: LpneuFL, ces corrélations sont de 0,82 et 0,78, respectivement.

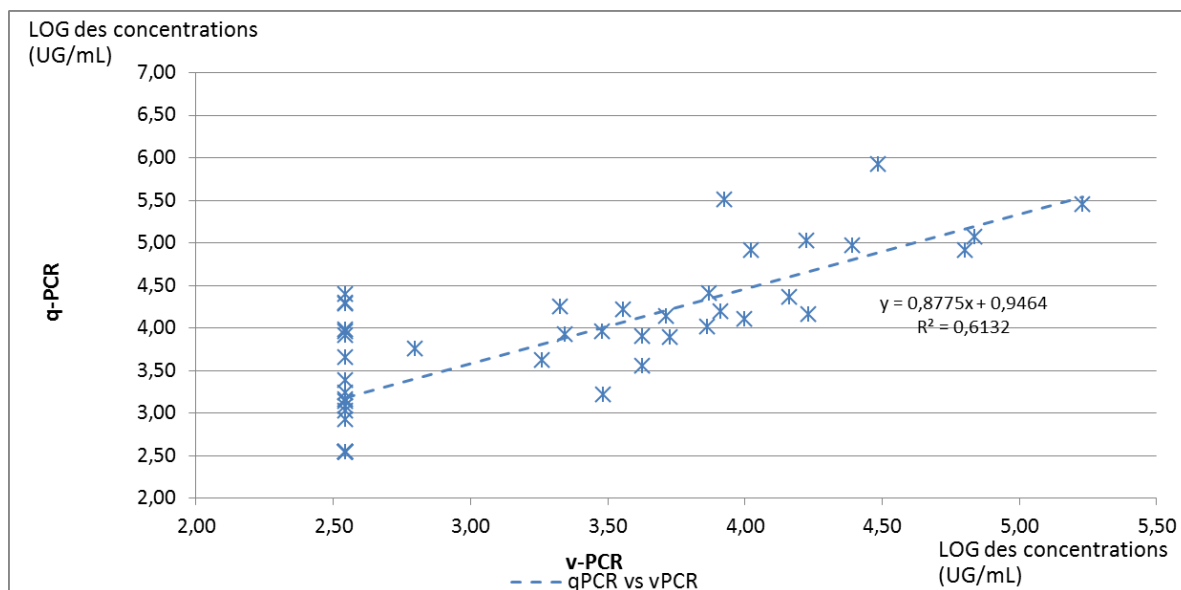


Figure 18 : Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par méthodes de q-PCR et de v-PCR pour le système PT69-PT70: LpneuFL.

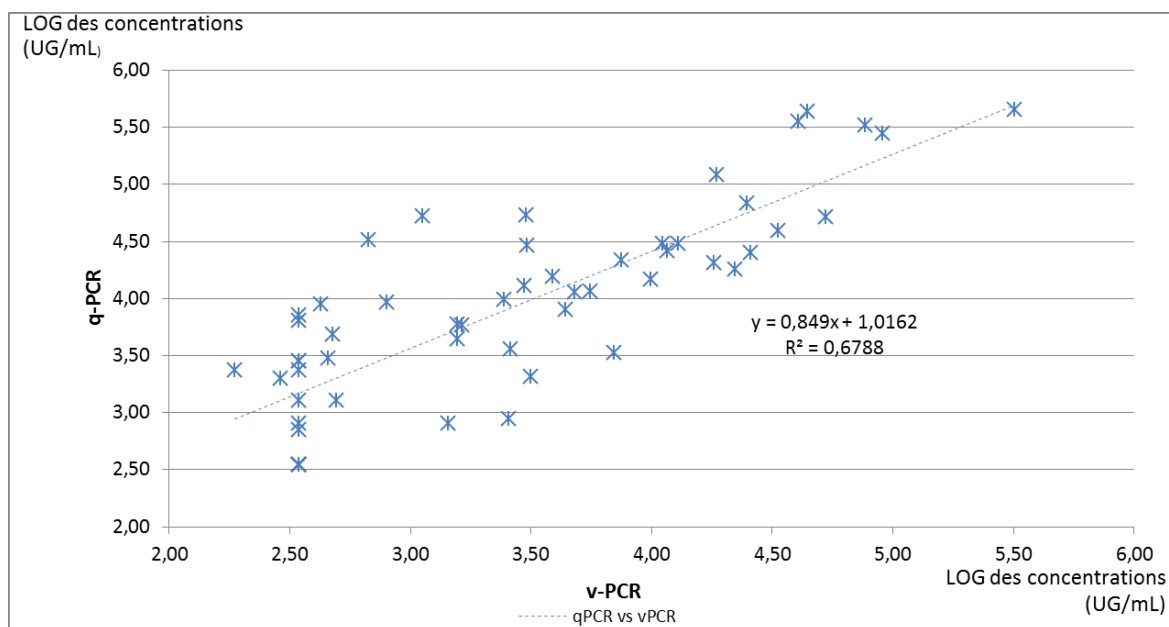


Figure 19 : Droites de tendance et coefficients de corrélation calculés pour les résultats obtenus par méthodes de q-PCR et de v-PCR pour le système JFP/JRP: LegLC.

L'analyse de variance démontre la présence d'une différence significative entre les trois méthodes analytiques (tableau 12). Contrairement à toutes attentes, tel que le démontre l'analyse de comparaison multiple de Tukey-Kramer utilisée pour comparer les concentrations obtenues de chaque méthode (tableau 13), la méthode par culture produit des concentrations supérieures aux deux méthodes PCR. Les concentrations mesurées par les trois méthodes et les deux systèmes sont représentés à la Figure 20.

Tableau 12 : Analyse de variance effectuée sur les trois méthodes d'analyse (culture, q-PCR, v-PCR) pour les systèmes JFP/JRP: LegLC, et PT69-PT70: LpneuFL.

Variables	Degré de liberté	Somme des carrées	Moyenne des carrés	F-Ratio	Niveau de probabilité	Puissance**
Méthodes (A)	2	196,9989	98,49947	31,22	0,000000*	1
Systèmes (B)	1	18,63156	18,63156	5,91	0,015624*	0,678381
AB	2	5,244978	2,622489	0,83	0,436396	0,192143
S	329	1037,894	3,154692			
Total (Adjusté)	334	1257,651				
Total	335					

**Alpha=0,05

Tableau 13 : Analyse de comparaison multiple de Tukey-Kramer effectuée sur les trois méthodes d'analyse. Méthode de culture comparée aux méthodes q-PCR et v-PCR pour les systèmes JFP/JRP: LegLC et PT69-PT70: LpneuFL.

	Méthode de référence	Méthodes comparées	
	Culture	q-PCR	v-PCR
Effectif (n)	115	112	108
Moyenne	3,720887	3,09141	1,865614
Différence des moyennes		0,6294765	1,855273
Niveau de probabilité (p)		0,02184	0

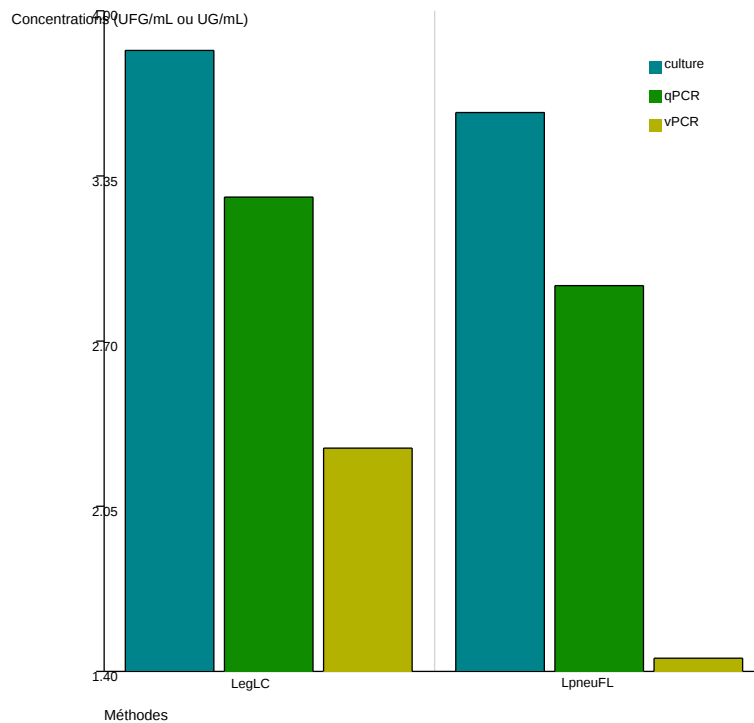


Figure 20 : Histogramme représentant les concentrations obtenues par les trois méthodes pour les systèmes JFP/JRP: LegLC, et PT69-PT70: LpneuFL.

5. DISCUSSION

5.1 Évaluation des systèmes de détection

5.1.1 Dosage de l'ADN des souches bactériennes de la collection

Le développement de systèmes de détection moléculaire nécessite l'utilisation de plusieurs extraits d'ADN afin de pouvoir démontrer adéquatement la spécificité des systèmes, d'optimiser les paramètres d'amplification de la PCR et d'établir les critères de performance. Les extraits d'acides nucléiques dégradés ou contaminés peuvent conduire à des résultats incohérents et peu fiables. De plus, un extrait d'ADN constitué majoritairement de petits fragments devient problématique pour l'amplification par la PCR. Selon Michalik, la capacité d'amplification d'un long fragment d'ADN est un bon précurseur d'une bonne qualité d'ADN pour les analyses par la PCR⁹⁵. Tous les extraits utilisés pour la validation des systèmes dans cette étude ont démontré leur capacité à produire des amplicons d'environ 850 paires de base en plus d'avoir démontré une pureté d'ADN acceptable lorsqu'évaluée à l'aide du rapport de densité optique 260/280 nm.

5.1.2 Vérification des amorces

L'étude de la spécificité et de la sélectivité des amorces utilisées dans les systèmes de détection *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* démontre une bonne concordance avec les résultats d'études précédemment réalisées par d'autres chercheurs^{5,39,68,83,84}. Tel que Jonas et Wellinghaussen l'ont démontré dans leur étude, toutes les souches de *Legionella spp* testées dans la présente étude ont pu être amplifiées par les amorces JFP/JRP. Par contre, contrairement à ces chercheurs, nos résultats démontrent une amplification tardive pour quelques souches qui ne sont pas du genre *Legionella*. Les amorces LP-mip-PT69 et LP-mip-PT70 ont été obtenues d'un brevet qui a expiré en 2003⁸³. Lors du dépôt de ce brevet en 1999, seulement 15 souches de *Legionella pneumophila* et 30 souches de *Legionella* n'appartenant pas à l'espèce *pneumophila* avaient été utilisées pour démontrer la spécificité et la sélectivité du couple d'amorces. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Macioszek et Martinez au regard de la spécificité. Toutefois, sur le plan de la sélectivité, 20 % des souches *Legionella* n'appartenant pas à l'espèce *pneumophila* ont pu être amplifiées par ce couple d'amorces. Les essais de sélectivité des études récentes sur les deux couples d'amorces ont été effectués sur un nombre limité de souches; ceci peut expliquer en partie les différences observées en matière de sélectivité dans cette étude. Les températures d'appariement utilisées dans les programmes PCR peuvent également être responsables de cette différence. Afin de pallier ce léger manque de sélectivité, des sondes moléculaires de type Taqman® (LegLC et LpneuFL) ont été ajoutées aux systèmes de détection dans cette étude.

5.1.3 Validation des systèmes amorces/sonde

Les vérifications exhaustives effectuées sur les trois systèmes amorces/sonde sélectionnés ont démontré une excellente spécificité, soit 100 % pour les systèmes PT69-PT70: LpneuFL et JFP/JRP: LegLC et 95 % pour le système P66/P65: Sg1. De plus, la sélectivité des trois systèmes a démontré être supérieure à 97 %. Peu d'études rapportent des validations aussi exhaustives de système de détection par la PCR. Plusieurs chercheurs évaluent la spécificité des marqueurs

moléculaires principalement de façon théorique à l'aide d'alignement de séquences publiés dans les bases de données et limitent les validations pratiques à 20 ou 30 souches. Les validations de spécificités des systèmes ont été effectuées, dans la présente étude, à l'aide de plus de 200 souches bactériennes. Ceci a permis la sélection des trois systèmes les plus performants pour l'analyse de la *Legionella* dans les échantillons d'eau. Un premier système détecte l'ensemble des espèces du genre *Legionella*, un second est spécifique pour l'espèce *Legionella pneumophila* et le troisième est très spécifique pour les *Legionella pneumophila* appartenant au séro groupe 1¹⁸.

5.2 PCR viable (v-PCR)

Les essais de v-PCR effectués pour bloquer l'amplification des cellules « mortes » ou ayant leur membrane cellulaire compromise ont permis de démontrer que le PMA produit moins d'effets toxiques que l'EMA sur la capacité de croissance post-exposition des cellules de *Legionella pneumophila*. Contrairement aux résultats de Chang⁹⁶, qui a démontré que l'EMA était plus efficace à faible concentration que le PMA pour la v-PCR et que des économies pouvaient être réalisées en raison des quantités réduites de produit requises, les essais réalisés dans cette étude, sur la capacité de croissance des cellules après exposition aux EMA et PMA, ont clairement démontrés que l'EMA avait un effet toxique important sur les cellules de *Legionella* ce qui empêche totalement leur croissance après exposition, et ce, même aux concentrations les plus faibles (50 µM) utilisées par Chang et collaborateurs. Basée sur ces résultats de croissance post-exposition, de la *Legionella*, l'utilisation de l'EMA doit être évitée avec cette bactérie. Une étude de Nkuipou-Kenfack et collaborateurs sur l'optimisation des paramètres de réalisation de la v-PCR, publiée en 2013, a démontré que l'EMA devrait être utilisé à faible température (4 °C) afin de réduire les problèmes de pénétration à l'intérieur des cellules cultivables donc de toxicité⁶¹. Leurs résultats soutiennent bien ceux obtenus dans notre étude. Dans leur étude, ils recommandent d'utiliser le PMA à des températures plus élevées soit à 40 °C. L'incubation durant notre étude ayant été effectuée à la température de la pièce, une incubation à 40 °C pourrait avoir un effet bénéfique et devrait être évaluée lors de la validation finale de la méthode.

Les essais de v-PCR effectués sur des suspensions de *Legionella* préparées au laboratoire ont démontré une réduction des concentrations proportionnelle aux réductions des pourcentages de cellules cultivables dans la suspension préparée au laboratoire. Une très légère amplification est observable sur la suspension constituée à 100 % de cellules mortes. Le PMA n'atteint pas une efficacité absolue du blocage de l'amplification. Dans la technique de la v-PCR, un équilibre entre le blocage obtenu et la toxicité du produit sur les cellules viables est recherché. Les auteurs considèrent qu'une faible amplification des cellules mortes avec un risque négligeable de surestimation de la flore cultivable est préférable à une sous-estimation de celle-ci par la mort des cellules cultivables liée à la toxicité du PMA.

Des résultats équivalents ont été obtenus pour les systèmes de détection de *Legionella spp* et *Legionella pneumophila*. Aucun essai de v-PCR n'a été réalisé sur le système de détection de la *Legionella pneumophila* séro groupe 1 en raison de la longueur très courte des amplicons obtenue dans ce système. Ce système de détection produit des amplicons de seulement 75 paires de base. Selon l'étude de Contreras et coll., la v-PCR est influencée par la longueur des amplicons et les performances de marquage sont grandement réduites pour les petits amplicons⁹⁷. Afin de réduire les coûts d'analyse et en considérant que le v-PCR est un indicateur de la flore cultivable, un seul

système de détection aurait avantage à être utilisé pour la v-PCR. Les résultats de la fraction viable pourraient être rapportés en pourcentage pour chaque échantillon. Selon les résultats de Contreras et coll., et les résultats de la présente étude, le système de détection JFP/JRP: LegLC pour les *Legionella spp* serait un choix avisé puisqu'il produit l'amplicon le plus long. Afin de réduire la variabilité de la v-PCR, un appareil muni d'une lampe DEL a été utilisé pour le marquage de la v-PCR. Ce remplacement a permis une uniformisation du marquage avec le PMA. Cette lumière réduit les problèmes de surchauffe de l'échantillon et permet une exposition plus homogène entre les différents échantillons. Les résultats ont démontré qu'avec cette lumière DEL, un temps d'exposition de quatre minutes est suffisant pour permettre la réaction irréversible entre l'intercalant (PMA) et l'ADN. Un temps d'exposition allant jusqu'à 10 minutes avec une concentration de PMA de 100 μM n'ont pas entraîné une observation marquée de la toxicité sur les cellules de *Legionella*.

5.3 Préparation du concentrat de l'échantillon

Les différents essais effectués pour la préparation du concentrat ont permis de constater l'importance de cette étape. Tous les tests démontrent que cette étape a un impact tant au regard des résultats que sur le temps d'analyse nécessaire et qu'elle ne doit pas être négligée. La filtration et l'extraction de l'ADN effectuées directement à partir du filtre produisent les résultats avec les concentrations les plus élevées, peu importe le type d'eau analysée. Toutefois, selon les résultats de Slimani et coll., la v-PCR réalisée directement sur le filtre ne produit pas de bons résultats sur les échantillons ayant une biomasse importante et doit être limitée aux échantillons considérés « propres » ayant une biomasse faible⁷⁰. Selon nos résultats et l'évaluation du temps nécessaire pour le traitement des échantillons ayant une biomasse élevée, la concentration par centrifugation est l'approche qui devrait être préconisée. La filtration de certains échantillons contenant une biomasse importante est tout simplement impossible. Les échantillons ayant une biomasse élevée se retrouvent principalement dans les tours de refroidissement des milieux industriels. D'ailleurs, des problèmes analytiques sont rencontrés lors des analyses par culture pour ces échantillons. Les analyses par q-PCR et v-PCR sont une avenue intéressante pour ce type de tour de refroidissement, même si des difficultés analytiques peuvent être parfois rencontrées.

5.4 Extraction de l'ADN de l'échantillon

Afin d'optimiser l'extraction de l'ADN, cinq troussees commerciales ont été testées. Quelques articles rapportent des comparaisons effectuées sur des troussees d'extraction commerciales pour différents substrats et microorganismes^{98,99}. L'efficacité des troussees peut être variable selon les analyses effectuées, en fonction des substrats qui doivent être extraits, selon l'ensemble de la flore présente et aussi selon le microorganisme recherché. Certains procédés d'extraction brisent l'ADN en petits fragments qui sont alors difficilement amplifiables par la PCR. D'autres procédures ne produisent pas de l'ADN suffisamment pur et des problèmes d'inhibition de la réaction PCR peuvent alors être rencontrés. Enfin, d'autres troussees n'ont pas un rendement suffisant et reproductible pour permettre une quantification par la q-PCR. Dans cette étude, les troussees ont été comparées à l'aide des résultats obtenus par le système de détection de *Legionella pneumophila*. Une grande variabilité au regard des résultats a été observée entre les troussees. Le FastDNA Spin Kit de MP Biomedicals, le QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen et le ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep de Zymo ont fourni de bons résultats pour les échantillons

d'eau des tours de refroidissement. Le FastDNA spin kit est celui qui démontre les meilleures performances avec la méthode de la q-PCR lorsque l'extraction se fait directement sur le filtre. Par contre, pour la méthode d'extraction par grattage, le ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep de Zymo permet à plusieurs reprises d'atteindre des concentrations plus élevées. Bien qu'une plus grande variation ait aussi été observée, les auteurs estiment qu'un affinement de la méthode aidera à contrôler cette variation. Bien que la littérature scientifique rapporte que l'extraction automatisée produit de meilleurs résultats d'extraction, les trousse d'extraction manuelle permettent la réalisation des analyses avec des niveaux de répétabilité inférieurs à 20 % et des coûts raisonnables^{98,100}. Le choix d'une méthode d'extraction automatisée est limité par la disponibilité de l'équipement, mais celui d'une méthode d'extraction manuelle ne peut être effectué sans validation de sa performance. Plusieurs compagnies produisent une variété de trousse d'extraction et nous avons constaté que ces trousse n'avaient pas du tout le même niveau de performance. Toute modification de la méthode d'extraction doit être vérifiée et validée afin de s'assurer de sa performance avec la q-PCR.

5.5 Les contrôles de la méthode PCR

Il est reconnu que la réaction PCR est sensible aux problèmes d'interférence et d'inhibition¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Le contrôle de l'inhibition est un des grands défis méthodologiques des analyses de biologie moléculaire. Lors d'un dosage par la q-PCR, il est indispensable d'utiliser différents moyens de contrôle tant en ce qui a trait à une contamination possible lors de l'extraction de l'ADN et de la préparation de la plaque PCR que pour la vérification de la présence d'inhibiteurs dans la réaction PCR. Les effets d'inhibition vont varier selon le produit inhibiteur, les conditions d'amplification ou de l'ADN polymérase¹⁰². Certains inhibiteurs bloquent directement la lecture de la séquence alors que d'autres auront un effet sur l'activité enzymatique de l'ADN polymérase. L'évaluation de la présence d'inhibiteur a été effectuée par l'incorporation d'un contrôle interne d'amplification ainsi que par un ajout dosé dans chaque échantillon. Les critères d'acceptation pour chaque contrôle ont été implantés lors de l'étude. Le contrôle interne a principalement comme rôle de contrôler l'émission de résultats faux négatifs. Aucun résultat négatif ne peut être émis sans avoir démontré la capacité d'amplification du contrôle interne dans l'échantillon. Les ajouts dosés permettent l'évaluation de l'interférence et une récupération entre 50 et 200 % doit être obtenue avant l'émission de tout résultat.

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour contrôler les problèmes d'inhibition détectés dans un échantillon comme l'utilisation d'un système automatisé d'extraction par affinité magnétique, l'augmentation de la concentration de sel lors de l'extraction de l'ADN, la dilution de l'échantillon et par le fait même de l'inhibiteur, en autant que la limite de détection ne soit pas trop élevée, l'augmentation de la concentration de l'ADN polymérase ou l'utilisation de l'albumine dans la réaction¹⁰¹. Plusieurs échantillons provenant de tours de refroidissement industrielles ont démontré être affectés par les problèmes d'inhibition qui ne pouvaient être contrôlés par simple dilution de l'échantillon. L'effet de l'ajout d'albumine dans la réaction PCR pour certains échantillons a été effectué. Ces essais démontrent clairement que l'albumine est un ajout intéressant lors de la réalisation des analyses de *Legionella spp* dans les tours d'eau. Le contrôle d'une partie de l'inhibition a été démontré en observant l'augmentation des concentrations mesurées pour quelques échantillons.

5.6 Comparaison résultats : PCR par rapport à culture

Les comparaisons qualitatives des méthodes de culture et de la PCR effectuées dans cette étude confirment les résultats obtenus récemment par Gruas et coll.³⁴. La méthode par la PCR a détecté 100 % des échantillons qui ont été positifs par culture. En raison d'une plus grande sensibilité, la PCR a également détecté de la *Legionella spp* dans 60 % des échantillons qui ont été négatifs par culture pour la q-PCR et 20 % pour la v-PCR. Ce constat s'explique par le fait que la q-PCR détecte l'ensemble de l'ADN présent et n'est pas limité à la flore cultivable alors que la v-PCR permet de bloquer en partie l'amplification des bactéries n'ayant pas leur membrane intacte.

Dans cette étude, contrairement à plusieurs autres portant sur la comparaison quantitative des concentrations de *Legionella spp* ou *Legionella pneumophila* entre la méthode par culture et la PCR, une surestimation systématique des concentrations par la PCR n'a pas été observée^{34,39,72,105}. Les échantillons d'eau analysés dans cette étude proviennent principalement de tours de refroidissement utilisées dans les procédés industriels, tel que Palmer⁶⁷ l'avait rapporté dans son étude sur les eaux d'égout. Des inhibitions d'amplification ont été observées dans notre étude et malgré les efforts pour les contrôler, il est possible que ceci puisse expliquer en partie que les résultats quantitatifs de la PCR ne soient pas aussi élevés qu'attendu, comparativement aux résultats de culture, comme l'ont démontré d'autres chercheurs^{18,34,39,64,72}. Une autre différence importante de la présente étude concerne la méthode par culture. La méthode utilisée au laboratoire de l'IRSST utilise un milieu de croissance différent de celui utilisé dans les autres études. Au lieu d'utiliser le GVPC (Oxoid, Ontario, Canada), la méthode par croissance de l'IRSST utilise le milieu BMPA (Oxoid, Ontario, Canada) reconnu comme étant moins restreignant pour la croissance de la *Legionella*¹⁰⁶. Ceci peut améliorer la détection et produire une augmentation des concentrations rapportées par culture. La préparation du concentrat et l'extraction de l'ADN des échantillons d'eau provenant du milieu industriel n'est pas sans difficulté. Le colmatage lors de la filtration oblige l'utilisation de plusieurs filtres ou la centrifugation bien que cette méthode soit reconnue comme étant moins efficace¹⁰⁷. Ceci, additionné à la présence d'inhibiteurs dans ces eaux biologiquement et chimiquement chargées, peut expliquer les niveaux plus faibles mesurés par la méthode PCR dans notre étude³⁹. La différence de Ct qui a été observée lors de la validation entre les souches de *Legionella* pourrait partiellement expliquer le manque de corrélation qui existe entre les méthodes de PCR et de culture. L'équipe de recherche considère que la variation de Ct des souches peut avoir un impact sur la quantification d'un échantillon. Il faut rappeler que tous les échantillons positifs par la méthode de culture ont également été positifs lorsqu'analysés par la méthode de la PCR. C'est donc dire qu'aucun résultat faux négatif n'a été produit par la PCR.

Plusieurs chercheurs ont évalué la corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de culture et ceux obtenus par la méthode de la PCR dans différents types d'eau^{34,64,72,107,108}. Sauf pour celle de Wojcik-Fatla et collaborateurs, qui rapportent une corrélation significative entre les deux méthodes, toutes les autres études consultées confirment les résultats de la présente étude en ce qui a trait à la détection concernant le genre, c'est-à-dire que les corrélations sont faibles et variables. Cependant, dans cette étude, une bonne corrélation est obtenue entre les méthodes, lorsque le système spécifique au *Legionella pneumophila* est utilisé.

Par contre, aucune étude consultée n'a évaluée la corrélation entre la q-PCR et la v-PCR afin de démontrer si une approche pouvait prédire les résultats obtenus par la seconde. Les résultats obtenus démontrent que pour le système de détection au genre, une bonne corrélation est observée entre les deux méthodes PCR. Certains chercheurs ont rapporté que la longueur du fragment amplifié avait un impact sur la qualité du blocage de l'amplification et sur la v-PCR ⁶¹. Ce constat expliquerait possiblement le résultat de corrélation plus faible entre la q-PCR et la v-PCR lorsque celle-ci est effectuée sur le gène *mip*. La v-PCR devrait être utilisée pour le système JFP/JRP: LegLC afin d'estimer la proportion de la flore viable dans chaque échantillon, mais son utilisation sur les autres systèmes devrait être limitée en raison des amplicons trop courts et des problèmes de constance qui y sont reliés.

5.7 La portée

Les résultats de cette recherche permettent de mettre en place une méthode de détection et de quantification des *Legionella spp*, *Legionella pneumophila* et *Legionella pneumophila* du sérotype 1 par la q-PCR dans les échantillons d'eau. La méthode de détection par la PCR a démontré une très bonne spécificité pour les trois systèmes implantés. Cette approche de détection et de quantification par la PCR ne pourra pas, pour le moment, remplacer la méthode par culture qui est la seule reconnue dans le règlement. Elle permettra cependant, dans certaines situations critiques, d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement en plus de pouvoir produire des résultats d'analyse pour certains échantillons ayant une charge microbienne hétérotrophe élevée et ne pouvant être analysés par la méthode de culture comme c'est le cas actuellement pour certaines industries québécoises. L'ensemble des contrôles incorporés au processus analytique permet de renforcer la robustesse des résultats tant positifs que négatifs.

5.8 Les limites

L'analyse de certains échantillons contenant des inhibiteurs peut devenir complexe avec la méthode de la PCR. Bien que des moyens soient implantés dans le processus analytique pour contrôler ces problèmes d'inhibition, des optimisations restent à réaliser sur ce plan pour les eaux contenant des charges particulières importantes. De plus, des standardisations sur les limitations de quantification devront être implantées.

Une variabilité a été observée en ce qui a trait à la préparation du Concentrat ainsi que pour l'étape d'extraction de l'ADN. Ceci soulève l'aspect crucial de ces étapes et demande l'application d'une grande rigueur en matière de technique. Les systèmes automatisés d'extraction d'ADN sont reconnus pour produire de bons extraits d'ADN en plus de limiter les variations entre les extractions et de réduire le temps technique nécessaire aux analyses.

La méthode PCR n'est pas acceptée actuellement par le règlement de la Régie du bâtiment du Québec, mais des méthodes standards utilisant la PCR pour la détection de la *Legionella* sont de plus en plus standardisées internationalement ¹⁰⁹⁻¹¹¹ et devraient éventuellement être acceptées au Québec.

5.9 Applicabilité des résultats

Cette étude fournit les approches analytiques qui doivent être préconisées lors de l'analyse de la *Legionella* dans les eaux de procédés et de consommation (voir annexe C pour un sommaire de la démarche recommandée pour l'analyse de *Legionella* par PCR). Il fournit également les bases pour la rédaction de la méthode d'analyse ainsi que les différents contrôles nécessaires au suivi analytique et à la production de résultats de haute fiabilité.

6. CONCLUSION

Cette étude a permis de valider trois systèmes de détection et de quantification de la bactérie *Legionella* dans les échantillons d'eau. Les trois systèmes de détection sont très spécifiques. Un premier système (JFP/JRP: LegLC) détecte l'ensemble des espèces du genre *Legionella*, un second (PT69-PT70: LpneuFL) est spécifique pour l'espèce *Legionella pneumophila* et le troisième (P66/P65: Sg1) est très spécifique pour les *Legionella pneumophila* appartenant au séro groupe 1. Les systèmes pourront être utilisés pour confirmer une identification lorsque la méthode par culture est employée en plus de pouvoir être utilisés pour une analyse plus rapide et avec une meilleure spécificité des échantillons d'eau. La méthode de filtration pour la préparation du Concentrat doit être favorisée sauf pour les échantillons ayant une charge particulaire élevée et pour lesquels, en conséquence, la méthode par filtration est inapplicable. Dans ce cas, la méthode par centrifugation devra être utilisée. La qualité de l'extrait d'ADN est très importante pour la réalisation de la PCR. Un ADN de qualité produit de meilleures quantifications en raison d'un plus grand contrôle des inhibiteurs. Les trousseaux d'extraction ont démontré des résultats très variables entre elles. Cette étape du processus analytique doit être contrôlée et suivie afin de produire des extraits de qualité pour la PCR. Le dosage par spectrométrie est une façon de vérifier la qualité de l'ADN. La v-PCR n'a pas produit les résultats escomptés, mais il est tout de même recommandé de l'utiliser pour estimer la proportion de *Legionella spp* viables et non viables dans un échantillon. Les amplicons produits par les systèmes spécifiques à *Legionella pneumophila* et au séro groupe 1 démontrent qu'ils sont trop courts pour cette application de v-PCR.

Les analyses pour chaque échantillon devront comprendre la q-PCR, la v-PCR pour le système JFP/JRP: LegLC, alors que pour les deux autres systèmes (*Legionella pneumophila* et séro groupe 1), seule la q-PCR pourrait être effectuée. Tous les échantillons devraient être analysés avec l'incorporation de l'IPC. Le supplément d'albumine peut être utilisé pour contrôler l'inhibition. Pour chaque série d'analyses, il est nécessaire d'inclure un blanc et un contrôle positif. Les courbes standards doivent être réalisées pour chaque système de détection puisque le nombre de copies par cellules des gènes détectés n'est pas le même pour chaque système.

Malgré les limitations, si celles-ci sont connues et bien contrôlées, la méthode par PCR demeure très encourageante pour l'analyse de la *Legionella* dans les échantillons d'eau.

BIBLIOGRAPHIE

1. Spitalny, K.C. et coll. Pontiac fever associated with a whirlpool spa. *Am. J. Epidemiol.* **120**, 809–817 (1984).
2. Friedman, S., Spitalny, K., Barbaree, J., Faur, Y. et McKinney, R. Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower. *Am. J. Public Health* **77**, 568–572 (1987).
3. Fenstersheib, M.D. et coll. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *Lancet* **336**, 35–37 (1990).
4. Balty, L. et Bayeux-Dunlas, M.-C. INRS - Légionelles et milieu de travail. 173–199 (2004). Disponible en ligne à <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC%2098> [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
5. Devos, L., Clymans, K., Boon, N. et Verstraete, W. Evaluation of nested PCR assays for the detection of *Legionella pneumophila* in a wide range of aquatic samples. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 916–925 (2005).
6. Qin, T. et coll. Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 Strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2150–2157 (2014).
7. OSHA. OSHA Technical manual (OTM) - Section III: Chapter 7: Legionnaires' disease. (1999). Disponible en ligne à https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_iii/otm_iii_7.html [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
8. Fraser, D.W. et coll. Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1189–1197 (1977).
9. Glick, T.H. et coll. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.* **107**, 149–160 (1978).
10. Chartered Institution of Building Services Engineers. *Minimising the risk of Legionnaires' disease*. (Chartered Institution of Building Services Engineers, 1991).
11. Fields, B.S., Benson, R.F. et Besser, R.E. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 Years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 506–526 (2002).
12. Yu, V.L. et coll. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired Legionellosis: An international collaborative survey. *J. Infect. Dis.* **186**, 127–128 (2002).
13. Doleans, A. et coll. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 458–460 (2004).

14. Stolhaug, A. et Bergh, K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6394–6398 (2006).
15. Diederer, B.M.W. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* **56**, 1–12 (2008).
16. Den Boer, J.W. et coll. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002–2006. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 459–466 (2008).
17. ANSES. Méthodes de détection et de dénombrement de la *Legionella* dans l'eau. 144 (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2011). Disponible en ligne à http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/anses/2011_Legionella_anses.pdf [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
18. Mérault, N. et coll. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1708–1717 (2011).
19. Bilan des cas de légionellose survenus en France en 2012 / Données / Légionellose / Infections respiratoires / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil. Disponible en ligne à <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2012> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
20. Gouvernement du Québec. Dispositions relatives à l'entretien d'une installation de tour de refroidissement à l'eau [Internet]. Code de sécurité. Disponible en ligne à <http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=1&file=61543.pdf> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
21. Régie du bâtiment du Québec. Programme d'entretien. Disponible en ligne à <https://www.rbq.gouv.qc.ca/salle-de-presse/les-grands-dossiers/tours-de-refroidissement-a-leau/programme-dentretien.html#c11498> [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
22. Reimer, A.R., Au, S., Schindle, S. et Bernard, K.A. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**, 191–205 (2010).
23. Centers for Disease Control and Prevention-CDC. *Legionella: History and disease patterns - Legionnaires disease - CDC. Centers for Disease Control and Prevention* (2013). Disponible en ligne à <http://www.cdc.gov/legionella/about/history.html> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]

24. CCHST. Maladie du légionnaire : Réponses SST. *Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail* (2006). Disponible en ligne à <http://www.cchst.ca/oshanswers/diseases/legion.html> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
25. Desbiens, F., Goupil-Sormany, I. et Huot, C. *Éclosion de légionellose dans la ville de Québec, Québec, Canada, été 2012 rapport*. (Agence de la santé et des services sociaux de la Capitale-nationale, 2012). Disponible en ligne à <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/2242741> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
26. ISO. ISO 11731: Water quality, detection and enumeration of Legionella. (1998).
27. AFNOR. NF T 90-431- Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. (2003).
28. ISO. ISO 11731-2:2004 - Water quality - Detection and enumeration of Legionella -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. (2004).
29. Centers for Disease Control and Prevention-CDC. Legionella: Procedures manual for recovery from environment - Legionnaires disease - CDC. (2005). Disponible en ligne à <http://www.cdc.gov/legionella/specimen-collect-mgmt/procedures-manual.pdf> [Dernière consultation : 7 juillet 2015]
30. AFNOR. NF EN ISO 11731-2- Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* - Partie 2: Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries. (2008).
31. Hussong, D. et coll. Viable Legionella pneumophila not detectable by culture on agar media. *Nat. Biotechnol.* **5**, 947–950 (1987).
32. Steinert, M., Emödy, L., Amann, R. et Hacker, J. Resuscitation of viable but nonculturable Legionella pneumophila Philadelphia JR32 by Acanthamoeba castellanii. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2047–2053 (1997).
33. Alcaide et coll. Gestion du risque lié aux légionelles. (2001).
34. Grúas, C., Llambi, S. et Arruga, M. V. Detection of Legionella spp. and Legionella pneumophila in water samples of Spain by specific real-time PCR. *Arch. Microbiol.* **196**, 63–71 (2014).
35. Donohue, M.J. et coll. Widespread molecular detection of Legionella pneumophila serogroup 1 in cold water taps across the United States. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 3145–3152 (2014).
36. Ballard, A.L. et coll. Detection of Legionella pneumophila using a real-time PCR hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4215–4218 (2000).

37. Warren, W. J. et Miller, R.D. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 50–55 (1979).
38. Ristroph, J.D., Hedlund, K.W. et Gowda, S. Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J. Clin. Microbiol.* **13**, 115–119 (1981).
39. Wellinghausen, N., Frost, C. et Marre, R. Detection of *Legionella* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3985–3993 (2001).
40. Bej, A.K., Mahbubani, M.H. et Atlas, R.M. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 597–600 (1991).
41. Yamamoto, H., Hashimoto, Y. et Ezaki, T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**, 149–154 (1996).
42. Oliver, J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol. Seoul Korea* **43 Spec No**, 93–100 (2005).
43. Álvarez, G., González, M., Isabal, S., Blanc, V. et León, R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express* **3**, 1 (2013).
44. Mullis, K. et coll. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).
45. Bustin, S.A. *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*. (Cambridge University Press, 2009).
46. Leroy-Terquem, É. La PCR ou réaction en chaîne par polymérase, une révolution en biologie médicale. *Option/Bio* **19**, 9–13 (2008).
47. Tse, C. et Capeau, J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **61**, 279–293 (2003).
48. Helbig, J.H. et coll. Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 716–722 (1999).
49. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. et Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* **10**, 413–417 (1992).
50. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. et Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994 (1996).

51. Rudi, K., Moen, B., Drømtorp, S.M. et Holck, A.L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1018–1024 (2005).
52. Caron, G. N., Stephens, P. et Badley, R. A. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 988–998 (1998).
53. Hewitt, C. J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A. W. et McFarlane, C. M. Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 705–711 (1999).
54. Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H. et Rudi, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* **34**, 804–813 (2003).
55. Soejima, T. et coll. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* **51**, 763–775 (2007).
56. Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D. et Camper, A. K. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5111–5117 (2007).
57. Soejima, T. et coll. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2305–2313 (2008).
58. Nocker, A. et Camper, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol. Lett.* **291**, 137–142 (2009).
59. Nocker, A. et Richter-Heitmann, T. Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **13**, 59–65 (2010).
60. Fittipaldi, M., Codony, F., Adrados, B., Camper, A. K. et Morató, J. Viable real-time PCR in environmental samples: Can all data be interpreted directly? *Microb. Ecol.* **61**, 7–12 (2011).
61. Nkuiipou-Kenfack, E., Engel, H., Fakih, S. et Nocker, A. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *J. Microbiol. Methods* **93**, 20–24 (2013).
62. Rantakokko-Jalava, K. et Jalava, J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2904–2910 (2001).
63. Benitez, A. J. et Winchell, J. M. Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella* species, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 348–351 (2013).

64. Morio, F. et coll. Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: Utility for daily practice. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **211**, 403–411 (2008).
65. Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Creemers, B. et Ollevier, F. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *J. Microbiol. Methods* **68**, 137–144 (2007).
66. Mahbubani, M. H. et coll. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol. Cell. Probes* **4**, 175–187 (1990).
67. Palmer, C. J., Tsai, Y. L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C. et Sangermano, L. R. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3618–3624 (1993).
68. Cloud, J. L., Carroll, K. C., Pixton, P., Erali, M. et Hillyard, D. R. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1709–1712 (2000).
69. Yáñez, M. A. et coll. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods* **85**, 124–130 (2011).
70. Slimani, S. et coll. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J. Microbiol. Methods* **88**, 319–321 (2012).
71. Olsen, G. J. et Woese, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**, 113–123 (1993).
72. Joly, P. et coll. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: Data interpretation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2801–2808 (2006).
73. Herpers, B. L., de Jongh, B. M., van der Zwaluw, K. et van Hannen, E. J. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4815–4816 (2003).
74. Thurman, K. A., Warner, A. K., Cowart, K. C., Benitez, A. J. et Winchell, J. M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**, 1–9 (2011).
75. Palmer, C. J. et coll. Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 407–412 (1995).

76. Delgado-Viscogliosi, P., Solignac, L. et Delattre, J.-M. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* Cells in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3502–3512 (2009).
77. Promega. BioMath - Tm Calculations for Oligos. Outil-web. 2015 Promega Corporation.
78. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. et Bottger, E. C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 7843–7853 (1989).
79. Marchesi, J. R. et coll. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 795–799 (1998).
80. Nossa, C. W. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4135 (2010).
81. Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P. et Pace, N. R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 324–325 (1991).
82. Wullings, B. A. et van der Kooij, D. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 C. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 157–166 (2006).
83. Macioszek, J. A., Lin, B.-C. et Martinez, A. E. Sensitive diagnosis of specific serotypes in test samples by forming reaction mixture, amplifying, hybridizing and detecting hybrid as indication of microorganism. (1999).
84. Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. et Bhakdi, S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1247–1252 (1995).
85. Chen, N.-T. et Chang, C.-W. Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 623–634 (2010).
86. Manz, W. et coll. In situ identification of Legionellaceae using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* **141**, 29–39 (1995).
87. AXYgen Biosciences, inc. Instruction manual -AxyPrep Bacterial genomic DNA Miniprep Kit. (2010).
88. MoBio Laboratories inc. Instruction manual: UltraClean® Tissue et cells DNA isolation kit sample. (2010).

89. Zymo Research inc. Instruction manual-ZR Fungal-Bacterial DNA Kit Instructions. (2009).
90. Qiagen. DNeasy-Plant-Handbook--October-2012--EN. (2012).
91. Qiagen. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook-Sample et Assay Technology. version 3, (2012).
92. Qiagen. QIAquick® Spin Handbook. (2008).
93. MoBio Laboratories inc. Instruction manual - UltraClean®PCR Clean-Up Kit. (2013).
94. Hintze, J. *NCSS - NCSS Statistical Software*. (NCSS, 2013). Disponible en ligne à <http://www.ncss.com/software/ncss/ncss-documentation/> [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
95. Michalik, S. et Williams, C. Qualitative multiplex PCR assay for assessing DNA quality from FFPE tissues and other sources of damaged DNA. *Sigma-Aldrich*. Disponible en ligne à <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/life-science-innovations/qualitative-multiplex.html> [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
96. Chang, B. et coll. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 119–123 (2010).
97. Contreras, P. J., Urrutia, H., Sossa, K. et Nocker, A. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J. Microbiol. Methods* **87**, 89–95 (2011).
98. Wilson, D., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Warshawsky, I. et Procop, G. W. Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila* from respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5913–5916 (2004).
99. Santos, H. F. et coll. Comparison of different protocols for the extraction of microbial DNA from reef corals. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 517–527 (2012).
100. Lassailly, F. et coll. Comparison of a selection of rapid automated DNA and RNA extraction technologies for detection of somatic or constitutional gene abnormalities in cancer diagnosis. *Cell Preserv. Technol.* **5**, 2–15 (2007).
101. Schneider, S., Enkerli, J. et Widmer, F. A generally applicable assay for the quantification of inhibitory effects on PCR. *J. Microbiol. Methods* **78**, 351–353 (2009).
102. Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N. et Lehto, R. Assessing PCR Inhibition from humic substances. *Open Enzyme Inhib. J.* **3**, (2010).
103. Kern, M. et coll. Inhibition of *Legionella pneumophila* PCR in respiratory samples: A quantitative approach. *J. Microbiol. Methods* **79**, 189–193 (2009).

104. Gunawardana, M. et coll. Isolation of PCR quality microbial community DNA from heavily contaminated environments. *J. Microbiol. Methods* **102**, 1–7 (2014).
105. Yanez, M. A., Carrasco-Serrano, C., Barbera, V. M. et Catalan, V. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the *dotA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3433–3441 (2005).
106. Marchand, G. *Détection et identification des bactéries du genre Legionella*. Méthode analytique MA-370, IRSST, 19 pages (2013). Disponible en ligne à <http://www.irsst.qc.ca/publication-irsst-detection-et-identification-des-bacteries-du-genre-legionella-ma-370.html> [Dernière consultation : 7 juillet 2015].
107. Wójcik-Fatla, A., Stojek, N. M. et Dutkiewicz, J. Efficacy of the detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR. I. Standardization of methods. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* **19**, 289–293 (2012).
108. Guillemet, T. et coll. Assessment of real-time PCR for quantification of *Legionella* spp. in spa water. *Lett. Appl. Microbiol.* **51**, 639–644 (2010).
109. AFNOR. Protocole de validation pour les kits de détection et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR). (2006).
110. AFNOR. NF T90-471 - Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR). (2006).
111. ISO. ISO/TS 12869:2012 - Qualité de l'eau - Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR). (2012).

ANNEXE A : LISTE DES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES POUR LA VALIDATION DES SYSTÈMES DE DÉTECTION

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Fluoribacter gormanii		32,4		x	x	x	29,0	ATCC 33217	
Legionella anisa		30,4		x	x	x	29,0	ATCC 35290	
Legionella birminghamensis		29,4		x	x	x	35,2	ATCC 43702	
Legionella busanensis		24,1		x	x	x	33,3	BAA-518	
Legionella cherrii		24,4		x	x	x	28,2	ATCC 35252	
Legionella erythra		28,3		x	x	x	30,2	ATCC 35303	
Legionella jamestowniensis		24,0		x	x	x	34,9	ATCC 35298	
Legionella londioniensis		24,8		x	x	x	28,0	ATCC 49505	
Legionella longbeachae		10,8		x		x	28,4	S0970-90352819-5	
Legionella longbeachae		28,6		x	x	x	29,3	ATCC 33462	
Legionella oakridgensis		24,6		x	x	x	31,0	ATCC 33761	
Legionella parisiensis		29,6						8815-2 S1222	
Legionella parisiensis		24,2		x	x	x		S0829-90303097-2	
Legionella parisiensis		24,4		x	x	x	28,1	S0828-90303097-3	
Legionella parisiensis		20,7		35,8		x	27,8	S0947-90350450-3	
Legionella parisiensis		30,4		x	23,0	x	29,3	ATCC 35299	
Legionella pneumophila		24,6		23,1	23,5	20,7	27,6	S0822-90303091-3	1
Legionella pneumophila		26,6		22,9	23,2	21,0	28,3	S0892-90313676-1	1
Legionella pneumophila		25,7		23,2	23,4	21,1	27,7	S0894-90318846-1	1
Legionella pneumophila		26,3		23,0	22,8	21,0	27,3	S0894-90318846-1	1
Legionella pneumophila		19,8		21,1	22,1	24,0	32,2	S0904-90303110-2	1
Legionella pneumophila		20,6		20,6		23,4	31,6	S0947-90350450-2	1

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila						20,3	27,4	S0972-90350335-1	1
Legionella pneumophila		19,9		20,5				S0972-90350339-1	1
Legionella pneumophila						20,0	27,8	S0972-90350340-3	1
Legionella pneumophila						20,4	27,5	S0972-90350340-4	1
Legionella pneumophila		21,2		22,1				S0972-90350344-1	1
Legionella pneumophila		19,8		20,8				S0972-90350344-3	1
Legionella pneumophila		21,4		20,6				S0974 90350327-3	1
Legionella pneumophila						x	27,5	S0974 90350331-1	1
Legionella pneumophila						20,4	27,0	S0974 90350331-2	1
Legionella pneumophila		22,6		23,5				S0974 90350343-1	1
Legionella pneumophila		20,4		21,3				S0974 90350343-2	1
Legionella pneumophila		8,8		11,5		20,3	28,2	S0986 90350253-2	1
Legionella pneumophila								S0996 90366611-1	1
Legionella pneumophila								S0996 90366611-2	1
Legionella pneumophila		11,9		12,5		20,7	27,7	S1157-006-11-1	1
Legionella pneumophila		9,2		12,7		21,0	27,6	S1157-006-11-4	1
Legionella pneumophila		10,8		12,4		20,5	27,7	S1159-077-1-1	1
Legionella pneumophila		12,4		13,0		20,7	27,6	S1159-077-2-2	1
Legionella pneumophila		12,8		12,8		21,0	29,8	S1153-081-1-2	1
Legionella pneumophila		9,5		14,3		20,9	28,0	S1153-081-1-3	1
Legionella pneumophila		19,9						S1233-0159-3	1
Legionella pneumophila		19,5		20,2				S1237-3101-1	1

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		20,9						S1222-8819-1	1
Legionella pneumophila		23,5		22,6	23,1	20,9	28,3	ATCC 33153	1
Legionella pneumophila		26,7		24,1	22,9			ATCC 33152	1
Legionella pneumophila		26,3		24,4	23,9	20,5	27,8	ATCC 33152	1
Legionella pneumophila		24,8		23,2	23,4	x	27,9	ATCC 33154	2
Legionella pneumophila		36,3		22,4	22,6	x	28,0	S0813-90303054-1	2-14
Legionella pneumophila		19,6		24,8	32,5	36,8	28,5	S0822-90303091-1	2-14
Legionella pneumophila		19,8		24,6	31,8	x	27,6	S0822-90303091-2	2-14
Legionella pneumophila		23,9		23,1	23,3	x	28,4	S0847-90303115-1	2-14
Legionella pneumophila		25,4		23,9	23,6	x	28,2	S0851-90313645-1	2-14
Legionella pneumophila		24,1		23,2	23,3	x	27,6	S0851-90313646-1	2-14
Legionella pneumophila		26,0		22,8	23,1	x	27,5	S0851-90313649-1	2-14
Legionella pneumophila		28,3		21,8	22,9	x	28,0	S0851-90313653-1	2-14
Legionella pneumophila		29,1		23,4	22,8	x	28,7	S0851-90313654-1	2-14
Legionella pneumophila		28,2		23,8	23,1	x	27,8	S0851-90313655-1	2-14
Legionella pneumophila		20,0		24,6	31,8	x	28,9	S0852-90303184-1	2-14
Legionella pneumophila		25,8		22,7	22,4	x	27,5	S0852-90303185-2	2-14
Legionella pneumophila		26,8		22,3	22,5	x	28,3	S0867-90303078-1	2-14
Legionella pneumophila		19,7		24,5	31,8	x	28,0	S0867-90318770-1	2-14
Legionella pneumophila		19,9		24,6	32,9	x	27,9	S0892-90313673-4	2-14
Legionella pneumophila		20,2		24,9	31,8	x	28,0	S0892-90313678-2	2-14
Legionella pneumophila		28,2		23,3	24,3	38,8	27,7	S0892-90313685-1	2-14

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		19,9		24,4	32,8	x	28,0	S0894-90318844-1	2-14
Legionella pneumophila		25,4		22,0	x	x	27,6	S0894-90318844-3	2-14
Legionella pneumophila		19,9		20,5	22,1	x	32,0	S0904-90303107-1	2-14
Legionella pneumophila		19,9		24,6	30,9		31,6	S0904-90303110-5	2-14
Legionella pneumophila		20,3		20,6	22,1	x	32,3	S0904-90303111-3	2-14
Legionella pneumophila		19,6		20,8	22,4	x	33,1	S0904-90303113-4	2-14
Legionella pneumophila		20,0		20,9			27,9	S0918-90318816-1	2-14
Legionella pneumophila		19,7		21,3		x	28,5	S0926-90343090-1	2-14
Legionella pneumophila		19,8		20,5		x	35,6	S0926-90343100-1	2-14
Legionella pneumophila		19,8		20,9		x	27,8	S0932-90350378-1	2-14
Legionella pneumophila		20,1		20,8		x	27,6	S0932-90350380-1	2-14
Legionella pneumophila		19,7		21,0			28,1	S0932-90350380-3	2-14
Legionella pneumophila		20,3		21,1			28,2	S0932-90350384-1	2-14
Legionella pneumophila		19,8		20,8		x	28,0	S0932-90350384-2	2-14
Legionella pneumophila		20,1		20,9			28,6	S0932-90350386-1	2-14
Legionella pneumophila		20,4		21,2			28,2	S0933-90344675-4	2-14
Legionella pneumophila		20,3,		21,1		x	27,9	S0934-90350435-4	2-14
Legionella pneumophila		20,0		21,0			27,9	S0943-90350356-1	2-14
Legionella pneumophila		19,8		24,1			28,0	S0943-90350357-1	2-14
Legionella pneumophila		20,1		20,9		20,4	27,7	S0943-90350359-1	2-14
Legionella pneumophila		20,7		20,7		x	29,1	S0943-90350370-2	2-14
Legionella pneumophila		19,8		24,6		x	28,2	S0943-90350373-1	2-14

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		19,9		20,8		x	27,8	S0947-90350432-2	2-14
Legionella pneumophila		19,7		21,1			27,8	S0956-90313609-1	2-14
Legionella pneumophila		13,8		14,7		x	27,8	S0962-90352816-5	2-14
Legionella pneumophila						x	28,0	S0968-90350314-1	2-14
Legionella pneumophila		14,7		15,7		x	28,8	S0968-90350318-1	2-14
Legionella pneumophila						x	27,8	S0970-90352818-1	2-14
Legionella pneumophila		11,8		12,6		x	29,0	S0970-90352819-3	2-14
Legionella pneumophila		13,4		14,1		x	x	S0970-90352819-4	2-14
Legionella pneumophila						x	27,7	S097190350291-2	2-14
Legionella pneumophila		20,9		21,6				S0972-90350335-6	2-14
Legionella pneumophila						x	27,9	S0972-90350337-1	2-14
Legionella pneumophila						x	27,9	S0972-90350337-2	2-14
Legionella pneumophila		20,6		31,6				S0972-90350339-2	2-14
Legionella pneumophila		21,4		21,2				S0972-90350340-1	2-14
Legionella pneumophila						x	28,2	S0972-90350340-2	2-14
Legionella pneumophila		21,0		21,9				S0972-90350344-2	2-14
Legionella pneumophila		12,6		24,3		x	26,1	S0974 90350327-1	2-14
Legionella pneumophila		13,3		15,5		x	27,7	S0974 90350327-2	2-14
Legionella pneumophila						x	28,0	S0974 90350327-4	2-14
Legionella pneumophila		19,6		22,7		x	28,3	S0974 90350341-1	2-14
Legionella pneumophila		20,3		21,3				S0974 90350341-2	2-14
Legionella pneumophila		20,6		33,3				S0974 90350341-3	2-14

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		21,4		34,7				S0986 90350239-1	2-14
Legionella pneumophila		20,6		33,4				S0986 90350239-2	2-14
Legionella pneumophila		20,3		21,6				S0986 90350241-1	2-14
Legionella pneumophila						x	28,7	S0986 90350241-2	2-14
Legionella pneumophila						x	27,4	S0986 90350248-1	2-14
Legionella pneumophila		11,2		23,6		x	27,6	S0986 90350248-2	2-14
Legionella pneumophila						x	27,2	S0986 90350248-3	2-14
Legionella pneumophila						x	28,3	S0986 90350251-2	2-14
Legionella pneumophila		12,1		13,7		x	28,9	S0986 90350253-1	2-14
Legionella pneumophila		12,4		15,2		x	29,7	S0986 90350253-3	2-14
Legionella pneumophila		10,6		23,3		x	29,2	S1003 90350271-2	2-14
Legionella pneumophila		25,3		22,6	32,3	x	28,2	S0852-90303179-1	2-14
Legionella pneumophila		13,1		12,2		x	29,0	006-11-3 S1157	2-14
Legionella pneumophila		12,9		11,8		x	28,9	078-01-1 S1153	2-14
Legionella pneumophila		13,7		12,6		x	28,7	078-01-2 S1153	2-14
Legionella pneumophila		13,2		13,8		x	29,8	081-1-1 S1153	2-14
Legionella pneumophila		20,1		32,0				0155-3 S1245	2-14
Legionella pneumophila		19,5		32,2				S1245 0155-5	2-14
Legionella pneumophila		19,6		32,3				0156-2 S1242	2-14
Legionella pneumophila		19,5						0159-1 S1233	2-14
Legionella pneumophila		12,2		12,6		x		057-01-1 S1154	2-14
Legionella pneumophila		19,9		32,6				3117-1 S1251	2-14

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		19,6		31,9				3123-1 S1251	2-14
Legionella pneumophila		18,9						3151-8 S1265	2-14
Legionella pneumophila		20,5		20,8				8790-8 S1218	2-14
Legionella pneumophila		19,9		32,9				8834-1 S1240	2-14
Legionella pneumophila		19,6		33,1				8834-2 S1240	2-14
Legionella pneumophila		19,1		32,1				8834-3 S1240	2-14
Legionella pneumophila		19,8		33,1				8834-6 S1240	2-14
Legionella pneumophila		19,6		32,6				8834-7 S1240	2-14
Legionella pneumophila		21,1		33,9				8835-1 S1238	2-14
Legionella pneumophila		19,3		32,7				8835-5 S1238	2-14
Legionella pneumophila		19,5		31,8				8837-2 S1242	2-14
Legionella pneumophila		19,3		32,6				8838-1 S1240	2-14
Legionella pneumophila		19,7		34,2				8839-6 S1237	2-14
Legionella pneumophila		19,2		20,5				8841-3 S1238	2-14
Legionella pneumophila		19,9		20,5				8841-8 S1238	2-14
Legionella pneumophila		18,8						8842-1 S1231	2-14
Legionella pneumophila		20,6						8843-1 S1231	2-14
Legionella pneumophila		24,8		22,6	23,0	x	29,4	S0867-90318774-1	2-14
Legionella pneumophila		13,0		15,0		x	30,1	S1032 90386824-1	2-14
Legionella pneumophila		29,9		22,6	23,1	x	28,1	ATCC 33155	3
Legionella pneumophila		28,1		23,4	23,3	x	28,6	ATCC 700710	5
Legionella pneumophila		20,2		24,4	33,1	x	27,9	ATCC 33216	5

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella pneumophila		23,1		23,0	23,2	x	27,1	ATCC 33215	6
Legionella pneumophila		26,6		23,1	23,4	x	27,9	ATCC 33832	7
Legionella pneumophila		26,3		22,4	22,7	x	28,3	ATCC 35096	8
Legionella pneumophila		26,0		23,7	23,1	x	28,1	ATCC 35289	9
Legionella pneumophila		28,6		23,1	23,2	x	27,6	S0851-90313674-1	Inconnu
Legionella pneumophila		24,1		23,1	23,5	x	28,8	S0852-90303184-2	Inconnu
Legionella pneumophila		20,6		24,5	22,9	x	28,4	S0852-90303185-1	Inconnu
Legionella pneumophila		19,6		20,6	21,4	x	26,8	S0904-90303107-3	Inconnu
Legionella pneumophila		19,6		21,1	23,6	x	32,4	S0904-90303111-4	Inconnu
Legionella pneumophila		10,6		13,2		x		S1049 90366829-2	Inconnu
Legionella pneumophila		12,4		12,5		x	28,7	S1049 90366829-8	Inconnu
Legionella pneumophila		22,9		22,9	22,8	x	31,6	ATCC 33733	Inconnu
Legionella pneumophila		20,4		20,4				S0984 90350286-4	Inconnu
Legionella pneumophila						x	28,3	S0986 90350251-1	Inconnu
Legionella pneumophila		10,1		13,1		x	27,9	S1032 90386828-6	Inconnu
Legionella pneumophila		13,8		14,6			28,7	S1049 90366832-6	Inconnu
Legionella quinlivanii		28,6		x	x	x	33,0	BAA_538	
Legionella rubrilucens		25,7		x	x	x		ATCC 35304	
Legionella sainthelensi		25,7		x	x	x	28,7	ATCC 35248	
Legionella sp		22,8		x	x	x	27,8	90303054-2S0813	
Legionella sp.		22,9		x		x		S0970-90352818-2	
Legionella sp.		22,7		x		x	28,4	S0973 90350283-2	
Legionella sp.						x	28,2	S0973 90350283-4	

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Legionella sp.		23,6		x		x	26,1	S0973 90350284-1	
Legionella sp.		23,1		x		x	28,4	S0984 90350285-1	
Legionella sp.		24,8		x			28,7	S0984 90350286-1	
Legionella sp.		26,8		x		x	34,5	S0986 90350251-3	
Legionella sp.		20,7		x		x	30,0	S0996 90366618-3	
Legionella sp.		19,2		x		x	30,3	S1003 90350247-1	
Legionella sp.		9,7		x		x	29,1	S1010 90366797-6	
Legionella sp.		28,8		x		x	31,7	S1010 90366797-8	
Legionella sp.		21,3		36,0		x	29,1	S1017 90366809-1	
Legionella sp.		20,3		x		x	28,9	S1017 90366815-3	
Legionella sp.		20,3		23,1		x	29,0	S1017 90366825-2 T	
Legionella sp.		24,3		x		x	29,1	S1026 90366808-3	
Legionella sp.		12,1		x		x	30,7	S1032 90386824-2	
Legionella sp.		20,1		x			28,7	S1049 90366830-2	
Legionella sp.		22,9		x				S0973 90350283-1	
Legionella sp.		31,5		x				0718-5 S1235	
Legionella sp.		20,0						2803-1 S1235	
Legionella sp.		25,8						2805-1 S1235	
Legionella sp.		27,6						C40-6 S1246	
Legionella sp.		13,4		x			30,5	S1159-077-2-1	
Burkholderia cepacia		x		x	x			Empat 001B1-2010	
Myroides odoratus	x	x	x	x	x	x	x	Empat 001B3-2010	
Aeromonas hydrophila	x	x	x	x	x	x	x	Empat 001B2-2010	
Burkholderia cepacia	x	x	x	x	x	x	x	Empat 001B1-2010	
Proteus vulgaris	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 33420 003B3-2009	

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
<i>Serratia marcescens</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 14756 003B2-2009	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	x	x	37,6	x	x	x	x	Empat ATCC 12228 003B1-2009	
<i>Alcaligenes faecalis</i>		x		x	x			Empat NCTC 11953 002B3-2009	
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	32,7	x	34,5	x	x	x	x	Empat NCTC 8452 002B2-2009	
<i>Chryseobacterium gluem</i>	33,8	x	33,5	x	x	x	x	Empat NCTC 10797 002B1-2009	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		x		x	x			Empat NCIMB 10102 001B3-2009	
<i>Citrobacter freundii</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat NCTC 9750 001B2-2009	
<i>Listeria innocua</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat NCTC 11288 001B1-2009	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 8042 R03B3-2008	
<i>Bacillus subtilis</i>	36,4	x	x	x	x	x	x	Empat NCIMB 8054 R03B2-2008	
<i>Ralstonia pickettii</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 49129 R03B1-2008	
<i>Chrysobacterium indoltheticum</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 27950 003B3-2008	
<i>Pedobacter heparinus</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat NCIMB 9290 003B2-2008	
<i>Oerskovia turbata</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat NCIMB 10587 003B1-2008	
<i>Micrococcus luteus</i>	36,6	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 10240 002B3-2008	
<i>Aerococcus viridans</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 11563 002B2-2008	
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 29093 003B3-2007	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 8042 003B1-2007	
<i>Bacillus subtilis</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat 001B3-2008	
<i>Enterococcus faecalis</i>	37,1	x	x	x	x	x	x	Empat 001B2-2008	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat 001B1-2008	
<i>Morganella morganii</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 25930 R03B3-2007	
<i>Lactococcus lactis</i>	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 11454 R03B2-2007	

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Oligella urethralis	x	x	36,6	x	x	x	x	Empat ATCC 23216 002B2-2007	
Morganella morganii	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 25830 001B3-2007	
Brevundimonas diminuta		x		x	x			Empa tATCC 11568 R03B1-2007	
Nocardia brasiliensis		x		x	x			Empat ATCC 19296 002B1-2007	
Sphingobacter spiritivorum		x		x	x			Empat ATCC 33861 003B3-2006	
Pseudomonas aeruginosa		x		x	x			Empat ATCC 9027 002B1-2008	
Leclercia adecarboxylata	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 23216 001B2-2007	
Lactococcus lactis	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 11454 001B1-2007	
Budvicia aquatica	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 51341 003B2-2005	
Enterococcus saccharolyticus	x	x	37,4	x	x	x	x	Empat ATCC 43076 003B1-2005	
Listeria monocytogenes		x		x	x			Empat ATCC 15313 003B2-2006	
Edwardsiella tarda		x		x	x			Empat 003BATCC 15947 1-2006	
Aeromonas hydrophila	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 7966 002B2-2005	
Serratia liquefaciens	36,4	x	37,9	x	x	x	x	Empat ATCC 27592 002B1-2005	
Micrococcus luteus	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 10240 001B2-2005	
Candida albican	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 14053 Oxoid	
Bacillus cereus	37,2	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 13061 002B3-2004	
Kocuria rosea	x	x	x	x	x	x	x	EmpatATCC 186 002B2-2004	
Aerococcus viridans	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 11563 003B2-2003	
Corynebacterium minutissimum		x		x	x			Empat ATCC 23348 003B1-2003	
Rhodococcus equi	36,3	x	x	x	x	x	x	EmpatATCC 6939 003B1-2002	
Providencia stuartii	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 33672 001B3-2003	

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Stenotrophomonas maltophilia	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 13637 003B3-2002	
Serratia marcescens	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 14756001B3-2002	
Enterobacter aerogenes	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 13048 001B1-2002	
Escherichia coli		x		x	x			Empat ATCC 25922 001B2-2002	
Micrococcus luteus	x	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 533 003B3-2001	
Brevibacterium epidermidis	35,6	x	37,7	x	x	x	x	Empat 002B3-2001	
Aerococcus viridans	x	x	x	x	x	x	x	Empat 002B2-2001	
Pseudomonas stutzeri		x		x	x			Empat 002B1-2001	
Mycobacterium chelonae	32,4	x	x	x	x	x	x	Empat ATCC 35752 001B3-2001	
Pseudomonas oryzihabitans		x		x	x			Empat ATCC 43272 001B2-2001	
Pseudomonas alcalinogenes		x		x	x			Empat ATCC 14909 003B2-2000	
Staphylococcus epidermidis	x	x	34,9	x	x	x	x	Empat ATCC 14990 003B1-2000/B	
Enterobacter cloacae	34,6	x	35,6	x	x	x	x	Empat ATCC 13047 002B1-2000	
Bacillus subtilis		x		x	x			Empat ATCC 6633 002B3-2000	
Kocuria rosea	35,0	x	35,5	x	x	x	x	Empat ATCC 1186 002B2-2000	
Shigella sonnei	35,0	x	35,8	x	x	x	x	ATCC 25931 Difco	
Escherichia coli	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 25922 Difco	
Enterobacter cloacae	x	x	x	x	x	x	x	Inconnu	
Staphylococcus aureus	34,8	x	x	x	x	x	x	ATCC 25923 Difco	
Serratia marcescens	30,1	x	33,6	x	x	x	x	ATCC 8100 Difco	
Streptococcus faecalis	35	x	x	x	x	x	x	ATCC 19433 Difco	

Souche	SYSTÈME DE DÉTECTION							Provenance	Sérogroupe
	JFP/ JRP sans sonde	JFP/ JRP: LegLC	PT69- PT70 sans sonde	PT69- PT70: Lpneu FL	PT69- PT70: Lpneu LC	P66/P65: Sg1	PT69- PT70 pan- R1		
	Genre	Genre	Espèce	Espèce	Espèce	Séro groupe 1	Genre		
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct		
Kocuria varians	x	x	x	x	x	x	x	LSPQ 15306	
Bacillus circulans	37,5	x	37,9	x	x	x	x	LSPQ 61	
Bacillus cereus	37,4	x	x	x	x	x	x	LSPQ 2872	
Streptococcus sp.	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 19615 Difco	
Serratia marcescens	x	x	x	x	x	x	x	LSPQ 8100	
Enterobacter aerogenes	38,5	x	x	x	x	x	x	LSPQ 13048	
Enterobacter aerogenes	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 13048 Unipath	
Enterococcus faecalis	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 19433 Difco	
Salmonella sp.	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 14028 Difco	
Myroides odoratus	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 4651 Unipath	
Micrococcus luteus	35,8	x	x	x	x	x	x	ATCC 533 Unipath	
Bacillus subtilis	35,7	x	37,9	x	x	x	x	Empat 001B1-97	
Escherichia coli	x	x	x	x	x	x	x	ATCC 35218 Unipath	
Enterococcus faecalis	x	x	x	x	x	x	x	ATCC19433 Unipath	
Serratia marcescens	38,0	x	x	x	x	x	x	ATCC 8100 Unipath	
Pseudomonas stutzeri	x	x	x	x	x	x	x		
Pseudomonas oryzihabitans	x	x	x	x	x	x	x		
Acinetobacter lwoffii	x	x	x	x	x	x	x		

X : souches testées n'ayant pas produit d'amplification

ANNEXE B : DOSAGE ADN DES SOUCHES DE LA BANQUE ET RATIO DE LA DENSITÉ OPTIQUE MESURÉE À 260 NM ET 280 NM

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B441	<i>Legionella pneumophila</i>	178,9	1,80
IRSST B440	<i>Legionella pneumophila</i>	68,8	1,60
IRSST B439	<i>Legionella pneumophila</i>	162,1	1,60
IRSST B438	<i>Legionella pneumophila</i>	37,6	1,62
IRSST B437	<i>Legionella pneumophila</i>	187,6	1,78
IRSST B436	<i>Legionella pneumophila</i>	235,4	1,80
IRSST B435	<i>Legionella pneumophila</i>	135,3	1,76
IRSST B434	<i>Legionella pneumophila</i>	250,7	1,84
IRSST B433	<i>Legionella pneumophila</i>	161,8	1,73
IRSST B432	<i>Legionella pneumophila</i>	126,6	1,80
IRSST B431	<i>Legionella</i> sp.	106,9	1,74
IRSST B430	<i>Legionella pneumophila</i>	122,2	1,75
IRSST B415	<i>Legionella</i> sp.	23,6	1,64
IRSST B412	<i>Legionella</i> sp.	60,6	1,79
IRSST B410	<i>Legionella</i> sp.	118,5	1,74
IRSST B408	<i>Legionella</i> sp.	101,3	1,74
IRSST B392	<i>Legionella</i> sp.	108,0	1,69
IRSST B391	<i>Legionella</i> sp.	70,6	1,60
IRSST B390	<i>Legionella pneumophila</i>	39,5	1,60
IRSST B386	<i>Legionella</i> sp.	66,6	1,74
IRSST B364	<i>Legionella</i> sp.	187,4	1,82
IRSST B359	<i>Legionella</i> sp.	47,2	1,75
IRSST B351	<i>Legionella</i> sp.	31,9	1,68
IRSST B344	<i>Legionella</i> sp.	13,4	1,28
IRSST B343	<i>Legionella</i> sp.	175,8	1,80
IRSST B338	<i>Legionella pneumophila</i>	132,6	1,79
IRSST B337	<i>Legionella</i> sp.	71,9	1,61

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B335	<i>Legionella</i> sp.	32,5	1,71
IRSST B329	<i>Legionella pneumophila</i>	46,7	1,68
IRSST B328	<i>Legionella pneumophila</i>	245,6	1,71
IRSST B327	<i>Legionella pneumophila</i>	52,9	1,82
IRSST B326	<i>Legionella</i> sp.	50,6	1,70
IRSST B325	<i>Legionella pneumophila</i>	155,4	1,74
IRSST B324	<i>Legionella pneumophila</i>	187,3	1,60
IRSST B323	<i>Legionella pneumophila</i>	247,3	1,80
IRSST B322	<i>Legionella pneumophila</i>	102,7	1,67
IRSST B321	<i>Legionella pneumophila</i>	215,6	1,60
IRSST B320	<i>Legionella pneumophila</i>	95,1	1,60
IRSST B319	<i>Legionella pneumophila</i>	42,3	1,79
IRSST B318	<i>Legionella pneumophila</i>	43,3	1,82
IRSST B317	<i>Legionella pneumophila</i>	49,0	1,79
IRSST B316	<i>Legionella pneumophila</i>	40,2	1,81
IRSST B315	<i>Legionella</i> sp.	76,3	1,81
IRSST B314	<i>Legionella</i> sp.	170,5	1,70
IRSST B313	<i>Legionella pneumophila</i>	27,9	1,78
IRSST B312	<i>Legionella pneumophila</i>	38,9	1,56
IRSST B311	<i>Legionella pneumophila</i>	32,4	1,70
IRSST B310	<i>Legionella pneumophila</i>	19,4	
IRSST B309	<i>Legionella</i> sp.	44,9	
IRSST B308	<i>Legionella pneumophila</i>	265,4	
IRSST B307	<i>Legionella pneumophila</i>	82,5	
IRSST B306	<i>Legionella pneumophila</i>	178,6	
IRSST B305	<i>Legionella pneumophila</i>	34,5	
IRSST B304	<i>Legionella pneumophila</i>	32,3	

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B303	<i>Legionella pneumophila</i>	40,7	
IRSST B302	<i>Legionella</i> sp.	64,2	
IRSST B301	<i>Legionella</i> sp.	90,9	
IRSST B300	<i>Legionella</i> sp.	207,7	
IRSST B298	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i>	67,0	
IRSST B297	<i>Staphylococcus aureus</i>	121,3	
IRSST B296	<i>Escherichia coli</i>	291,3	
IRSST B295	<i>Legionella pneumophila</i>	135,9	
IRSST B294	<i>Legionella pneumophila</i>	142,9	
IRSST B293	<i>Legionella pneumophila</i>	91,8	
IRSST B292	<i>Legionella pneumophila</i>	34,1	
IRSST B291	<i>Legionella pneumophila</i>	34,5	
IRSST B289	<i>Legionella pneumophila</i>	247,7	
IRSST B288	<i>Legionella pneumophila</i>	32,0	
IRSST B287	<i>Legionella pneumophila</i>	29,0	
IRSST B285	<i>Legionella pneumophila</i>	31,5	
IRSST B284	<i>Legionella pneumophila</i>	31,0	
IRSST B283	<i>Legionella pneumophila</i>	97,0	
IRSST B282	<i>Legionella pneumophila</i>	112,3	
IRSST B281	<i>Legionella pneumophila</i>	263,1	
IRSST B280	<i>Legionella longbeachae</i>	171,0	
IRSST B279	<i>Legionella pneumophila</i>	117,3	
IRSST B278	<i>Legionella pneumophila</i>	69,1	
IRSST B277	<i>Legionella anisa</i>	218,3	
IRSST B276	<i>Legionella pneumophila</i>	28,8	
IRSST B275	<i>Legionella pneumophila</i>	42,5	
IRSST B274	<i>Legionella pneumophila</i>	149,3	

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B273	<i>Legionella pneumophila</i>	181,7	
IRSST B272	<i>Legionella pneumophila</i>	83,5	1,92
IRSST B271	<i>Legionella pneumophila</i>	96,5	1,87
IRSST B270	<i>Legionella pneumophila</i>	104,5	1,87
IRSST B269	<i>Legionella pneumophila</i>	102,5	1,91
IRSST B268	<i>Legionella pneumophila</i>	102,0	1,85
IRSST B267	<i>Legionella parisiensis</i>	84,0	1,86
IRSST B266	<i>Legionella pneumophila</i>	81,5	1,86
IRSST B265	<i>Legionella pneumophila</i>	104,0	1,87
IRSST B264	<i>Legionella pneumophila</i>	68,5	1,95
IRSST B263	<i>Legionella pneumophila</i>	60,0	1,90
IRSST B262	<i>Legionella pneumophila</i>	107,5	2,03
IRSST B261	<i>Legionella pneumophila</i>	74,5	1,93
IRSST B260	<i>Legionella pneumophila</i>	64,0	1,87
IRSST B259	<i>Legionella pneumophila</i>	76,0	1,93
IRSST B258	<i>Legionella pneumophila</i>	103,5	1,96
IRSST B257	<i>Legionella pneumophila</i>	124,5	1,76
IRSST B256	<i>Legionella pneumophila</i>	86,0	1,87
IRSST B255	<i>Legionella pneumophila</i>	124,5	
IRSST B254	<i>Legionella pneumophila</i>	90,5	
IRSST B253	<i>Legionella pneumophila</i>	84,0	
IRSST B252	<i>Micrococcus luteus</i>	77,5	1,85
IRSST B251	<i>Listeria innocua</i>	45,0	2,00
IRSST B250	<i>Alcaligenes faecalis</i>	129,0	1,83
IRSST B249	<i>Legionella pneumophila</i>	80,0	1,90
IRSST B248	<i>Legionella pneumophila</i>	70,6	1,85
IRSST B247	<i>Legionella pneumophila</i>	39,7	1,90

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B246	<i>Legionella pneumophila</i>	62,8	1,85
IRSST B245	<i>Legionella pneumophila</i>	76,8	
IRSST B244	<i>Legionella pneumophila</i>	48,0	
IRSST B243	<i>Legionella pneumophila</i>	74,3	
IRSST B242	<i>Legionella busanensis</i>	24,7	1,85
IRSST B241	<i>Myroides odoratus</i>	131,0	1,83
IRSST B240	<i>Aeromonas hydrophila</i>	19,0	1,85
IRSST B239	<i>Burkholderia cepacia</i>	58,6	1,85
IRSST B238	<i>Legionella pneumophila</i>	51,5	1,87
IRSST B237	<i>Legionella pneumophila</i>	46,0	1,80
IRSST B236	<i>Legionella parisiensis</i> ou <i>Fluoribacter gormanii</i>	46,3	1,84
IRSST B235	<i>Legionella pneumophila</i>	57,4	1,90
IRSST B234	<i>Legionella parisiensis</i>	29,0	1,83
IRSST B233	<i>Legionella parisiensis</i>	32,6	1,83
IRSST B232	<i>Legionella pneumophila</i>	47,3	1,79
IRSST B231	<i>Legionella pneumophila</i>	54,6	1,95
IRSST B230	<i>Legionella pneumophila</i>	56,3	1,84
IRSST B229	<i>Legionella pneumophila</i>	58,1	1,83
IRSST B228	<i>Legionella pneumophila</i>	62,1	1,92
IRSST B227	<i>Legionella pneumophila</i>	57,2	1,87
IRSST B226	<i>Legionella pneumophila</i>	55,2	1,89
IRSST B225	<i>Legionella pneumophila</i>	47,7	1,86
IRSST B224	<i>Legionella pneumophila</i>	60,4	1,88
IRSST B223	<i>Legionella pneumophila</i>	41,5	
IRSST B222	<i>Legionella pneumophila</i>	41,8	
IRSST B221	<i>Legionella pneumophila</i>	40,0	
IRSST B220	<i>Legionella pneumophila</i>	95,3	1,82

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B219	<i>Legionella pneumophila</i>	54,5	1,80
IRSST B217	<i>Legionella quinlivanii</i>	32,9	1,92
IRSST B215	<i>Legionella pneumophila</i>	73,8	1,94
IRSST B214	<i>Legionella pneumophila</i>	67,4	1,91
IRSST B213	<i>Legionella cherrii</i>	69,1	1,78
IRSST B212	<i>Legionella erythra</i>	23,0	1,72
IRSST B211	<i>Legionella birminghamensis</i>	38,2	
IRSST B210	<i>Legionella parisiensis</i>	55,0	1,96
IRSST B209	<i>Legionella anisa</i>	87,3	
IRSST B208	<i>Legionella jamestowniensis</i>	54,1	1,66
IRSST B207	<i>Legionella longbeachae</i>	35,4	
IRSST B206	<i>Legionella londioniensis</i>	41,8	1,82
IRSST B205	<i>Legionella pneumophila</i>	59,3	1,90
IRSST B203	<i>Legionella pneumophila</i>	58,2	1,89
IRSST B202	<i>Legionella sainthelensi</i>	43,7	1,92
IRSST B201	<i>Legionella pneumophila</i>	67,7	1,93
IRSST B200	<i>Legionella pneumophila</i>	67,8	1,90
IRSST B199	<i>Legionella pneumophila</i>	75,7	1,89
IRSST B198	<i>Legionella pneumophila</i>	62,9	1,91
IRSST B197	<i>Legionella rubrilucens</i>	50,5	1,83
IRSST B196	<i>Legionella oakridgensis</i>	65,1	1,62
IRSST B195	<i>Legionella pneumophila</i>	54,3	1,86
IRSST B194	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	58,3	1,87
IRSST B193	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	45,4	1,90
IRSST B192	<i>Legionella pneumophila</i>	36,1	1,74
IRSST B191	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	42,2	1,81
IRSST B190	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	33,3	1,83

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B189	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	26,5	1,81
IRSST B188	<i>Legionella pneumophila</i>	36,2	1,88
IRSST B187	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	28,3	2,04
IRSST B186	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	44,0	2,02
IRSST B185	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	33,6	
IRSST B184	<i>Legionella pneumophila</i> Sero inconnu	26,7	
IRSST B183	<i>Legionella pneumophila</i> Sero 2-14	37,1	
IRSST B182	<i>Proteus vulgaris</i>	31,0	1,74
IRSST B181	<i>Serratia marcescens</i>	9,9	1,83
IRSST B180	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23,2	1,82
IRSST B179	<i>Alcaligenes faecalis</i>	78,7	1,91
IRSST B178	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	24,4	1,82
IRSST B177	<i>Chryseobacterium glum</i>	39,9	1,75
IRSST B176	<i>Enterobacter aerogenes</i>	30,2	1,83
IRSST B175	<i>Citrobacter freundii</i>	29,1	1,82
IRSST B174	<i>Listeria innocua</i>	28,6	1,80
IRSST B173	<i>Pediococcus acidilactici</i>	13,8	1,80
IRSST B172	<i>Bacillus subtilis</i>	20,3	2,13
IRSST B171	<i>Ralstonia pickettii</i>	23,9	1,96
IRSST B170	<i>Chrysobacterium indoltheticum</i>	8,2	1,79
IRSST B169	<i>Pedobacter heparinus</i>	12,7	1,72
IRSST B168	<i>Oerskovia turbata</i>	25,1	1,85
IRSST B167	<i>Micrococcus luteus</i>	17,3	1,85
IRSST B166	<i>Aerococcus viridans</i>	8,3	1,70
IRSST B165	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53,7	1,96
IRSST B164	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	7,5	1,72
IRSST B163	<i>Pediococcus acidilactici</i>	15,7	2,28

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B162	Bacillus subtilis	27,4	1,84
IRSST B161	Enterococcus faecalis	34,5	1,88
IRSST B160	Staphylococcus saprophyticus	17,6	1,87
IRSST B159	Morganella morganii	7,6	1,49
IRSST B158	Lactococcus lactis	17,3	1,81
IRSST B157	Brevundimonas diminuta	43,4	1,29
IRSST B156	Nocardia brasiliensis	12,8	1,87
IRSST B155	Legionella pneumophila	56,9	1,89
IRSST B154	Fluoribacter bozemanii	37,2	1,90
IRSST B153	Legionella pneumophila	52,4	1,79
IRSST B152	Oligella urethralis	34,5	1,67
IRSST B151	Morganella morganii	9,3	1,78
IRSST B150	Leclercia adecarboxylata	31,7	1,92
IRSST B149	Lactococcus lactis	25,3	1,84
IRSST B148	Sphingobacter spiritivorum	48,1	1,88
IRSST B147	Listeria monocytogenes	19,7	1,79
IRSST B146	Edwardsiella tarda	13,8	1,91
IRSST B145	Budvicia aquatica	30,6	1,85
IRSST B144	Enterococcus saccharolyticus	8,9	2,08
IRSST B139	Aeromonas hydrophila	14,7	1,97
IRSST B138	Serratia liquefaciens	19,0	1,95
IRSST B137	Staphylococcus aureus	14,5	2,06
IRSST B136	Micrococcus luteus	14,1	1,79
IRSST B135	Candida Albican	8,9	1,32
IRSST B134	Bacillus cereus	5,9	1,63
IRSST B133	Kocuria rosea	10,5	1,74
IRSST B132	Klebsiella pneumoniae	14,7	1,76

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B130	<i>Aerococcus viridans</i>	35,5	1,85
IRSST B129	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	8,8	1,73
IRSST B128	<i>Rhodococcus equi</i>	11,4	1,50
IRSST B127	<i>Providencia stuartii</i>	14,6	1,81
IRSST B125	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11,6	1,78
IRSST B124	<i>Serratia marcescens</i>	28,7	1,73
IRSST B123	<i>Enterobacter aerogenes</i>	74,5	1,82
IRSST B122	<i>Escherichiacoli</i>	17,3	1,85
IRSST B121	<i>Micrococcus luteus</i>	22,1	1,71
IRSST B120	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	34,9	1,76
IRSST B119	<i>Aerococcus viridans</i>	10,6	1,79
IRSST B118	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	112,3	1,90
IRSST B117	<i>Mycobacterium chelonae</i>	9,4	1,74
IRSST B115	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	47,6	1,87
IRSST B112	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35,0	1,86
IRSST B111	<i>Pseudomonas alcalicogenes</i>	43,2	1,93
IRSST B110	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36,3	1,89
IRSST B108	<i>Enterobacter cloacae</i>	62,2	1,63
IRSST B107	<i>Bacillus subtilis</i>	9,5	1,80
IRSST B106	<i>Kocuria rosea</i>	28,5	1,97
IRSST B103	<i>Shigella sonnei</i>	19,6	1,87
IRSST B102	<i>Escherichia coli</i>	13,4	1,69
IRSST B101	<i>Enterobacter cloacae</i>	66,1	1,91
IRSST B100	<i>Staphylococcus aureus</i>	45,9	1,86
IRSST B99	<i>Serratia marcescens</i>	7,6	1,89
IRSST B98	<i>Streptococcus faecalis</i>	42,5	1,82
IRSST B97	<i>Citrobacter freundii</i>	63,1	1,91

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B95	Acinetobacter baumannii	44,6	1,76
IRSST B93	Enterobacter cloacae	81,2	1,85
IRSST B92	Klebsiella pneumonia subsp. Pneumonia	42,1	1,93
IRSST B90	Bacillus cereus	35,1	1,84
IRSST B89	Proteus mirabilis	24,8	1,77
IRSST B88	Pseudomonas putida	132,3	1,86
IRSST B87	Shigella flexneri	37,1	1,87
IRSST B86	Escherichia coli	57,1	1,88
IRSST B84	Escherichia coli	80,8	1,87
IRSST B83	Bacillus megaterium	18,8	1,78
IRSST B82	Bacillus subtilis	40,9	1,87
IRSST B80	Proteus mirabilis	83,1	1,70
IRSST B79	Stenotrophomonas maltophilia	95,3	1,91
IRSST B78	Pseudomonas aeruginosa	6,5	1,53
IRSST B77	Staphylococcus aureus subsp. aureus	9,2	1,72
IRSST B76	Klebsiella oxytoca	10,8	1,59
IRSST B75	Enterococcus faecalis	17,9	1,71
IRSST B58	Bacillus subtilis	8,8	1,69
IRSST B55	Staphylococcus epidermidis	21,8	1,71
IRSST B49	Kocuriarosea	12,3	1,67
IRSST B48	Kocuria varians	12,8	1,71
IRSST B46	Bacillus circulans	36,1	1,08
IRSST B45	Bacillus cereus	8,0	1,51
IRSST B41	Streptococcus sp.	16,6	1,94
IRSST B38	Serratia marcescens	5,0	2,23
IRSST B36	Enterobacter aerogenes	28,0	1,85
IRSST B35	Enterobacter aerogenes	25,8	1,76

Numéro IRSST	Souche	ng/ul	260/280
IRSST B30	Enterococcus faecalis	11,2	1,85
IRSST B26	Salmonella sp.	6,1	1,98
IRSST B17	Myroides odoratus	11,9	1,64
IRSST B16	Micrococcus luteus	6,3	1,71
IRSST B12	Bacillus subtilis	12,4	1,72
IRSST B11	Escherichia coli	16,6	1,88
IRSST B10	Enterococcus faecalis	19,9	1,92
IRSST B9	Acinetobacter lwoffii	13,5	1,94
IRSST B2	Serratia marcescens	12,7	2,21

**ANNEXE C : ABRÉGÉ DE LA MÉTHODE ET SOMMAIRE DE LA
DÉMARCHE RECOMMANDÉE POUR L'ANALYSE DE *LEGIONELLA*
PAR PCR**

Après avoir effectué des tests d'optimisation et de comparaison, ainsi qu'en prenant en considération la méthodologie et les besoins reliés aux analyses de routine, les principales étapes de la méthode d'analyse recommandée se résument ainsi :

Concentrat bactérien (500 ml d'échantillon)

Eau propre:

- filtration sur membrane filtrante: Millipores stériles, 0,45 µm, 47 mm de diamètre
- grattage des cellules et récupération dans 2 ml d'eau PCR

Eau avec charge particulaire élevée :

- centrifugation 7000G 15 minutes
- resuspension du culot cellulaire dans 2 ml d'eau PCR

Volume final: 2 ml

Extraction de l'ADN

Note : Le v-PCR se fait avant l'extraction et nécessite la préparation d'un deuxième concentrat. Faire un culot cellulaire avant de débiter l'extraction de l'ADN.

Trousse d'extraction: ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™

Note : D'autres trousse d'extraction sont disponibles et utilisables, les résultats de cette étude démontrent qu'une vérification est nécessaire avant un changement.

- HotStarTaq Master Mix : 2,5 U
- Amorces : 0,25 µM
- Sonde : 0,375 µM
- MgCl₂ : 2 µM
- 50X Exo IPC Mix (VIC): 0,35 µl
- 10X Exo IPC DNA: 2,5 µl
- 10X Block-Exp IPC: 2 µl
- Volume d'ADN : 2 µl
- Albumine de sérum bovin (20mg/ml): 1,25 µl

Note : Utiliser l'albumine lorsqu'une inhibition ne peut être contrôlée par une dilution de l'extrait d'ADN, les performances de l'albumine peuvent être variables.

Volume total de la réaction PCR: 25 µl

v-PCR sur le système JFP/JRP: LegLC (si désiré)

Préparation du concentrat bactérien avec 500 ml d'échantillon

Centrifugation du concentrat à 17 000g pour 1 min

Resuspension de culot cellulaire dans 500 µl

Ajout de PMA (20mM) à une concentration finale de 50 µM

Incubation dans le noir 5 minutes

Exposition dans le PhAST blue pour 10 minutes

Extraction de l'ADN

Programme de la PCR (voir Figure 5, sous-section 3.1.4) : Le même programme est utilisé pour les 3 systèmes.

Tableau 14 : Liste des marqueurs utilisés dans les trois différents systèmes de détection moléculaire pour l'analyse de la *Legionella*.

Systèmes		Séquences	Température de désappariement, T _m (°C)
<i>Legionella</i> sp: JFP/JRP: LegLC			
Amorces	JFP	5- AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC -3	51,4
	JRP	5- CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG -3	53,4
Sonde	LegLC	5'-/56-FAM/TAC TGA CAC/ZEN/TGA GGC ACG AAA GCG T/ 3IABkFQ/-3	62,1
<i>Legionella pneumophila</i>: PT69-PT70: LpneuFL			
Amorces	PT69	5-GCA TTG GTG CCG ATT TGG -3	55,1
	PT70	5-GCT TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA-3	54,5
Sonde	LpneuFL	5'-/56-FAM/CCA CTC ATA/ZEN/GCG TCT TGC ATG CCT TTA/3IABkFQ/-3'	60,8
<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1: P66/P65: LegSg1			
Amorces	P66	5-CAA ACA CCC CAA CCG TAA TCA -3	55,5
	P65	5- CAA AGG GCG TTA CAG TCA AAC C-3	56,6
Sonde	LegSg1	5'-/56-FAM/TCC TGG GAT/ZEN/TGG GTT GGG TTA TTT TAA CTC CT/3IABkFQ/-3'	61,1

Tableau 15 : Sommaire de la sélectivité des trois systèmes de détection moléculaire pour l'analyse de la *Legionella*.

	P66/P65: Sg1		PT69-PT70: LpneuFL		JFP/JRP: LegLC	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
<i>Legionella pneumophila</i> (Sérogroupe 1)	19	1				
<i>Legionella pneumophila</i> (non Sg1)	3	77	130	0		
<i>Legionella</i> spp	0	18	3	35	177	0
Autre genres	0	94	1	110	1	110