

Méthode analytique

Détection moléculaire et quantification absolue des bactéries du genre *Legionella* par ddPCR

Responsable technique de la méthode

Delphine Lanoie, M. Sc., Microbiologiste agréée, professionnelle scientifique, Direction des laboratoires, IRSST

Personnes ayant contribué à la présente version de cette méthode

Audrey Bernèche-D'Amours, M. Sc., RMCCM, Microbiologiste agréée et biochimiste, professionnelle scientifique, Direction des laboratoires, IRSST

Nancy Lacombe, technicienne de laboratoire, Direction des laboratoires, IRSST

Thi Thanh Tam Nguyen, technicienne de laboratoire, Direction des laboratoires, IRSST

Geneviève Marchand Ph.D., RMCCM SCCM(Env), Microbiologiste agréée et biochimiste, chercheuse, Prévention des risques chimiques, biologiques, mécaniques et physique, IRSST

MÉTHODES DE
LABORATOIRES

MA-410

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. Les méthodes d'analyses ou d'étalonnage sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

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

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2022
ISBN : 978-2-89797-231-8
ISSN : 0820-8395

MICROORGANISMES
<i>Legionella spp.</i>
<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella pneumophila</i> du séro groupe 1

APPLICABILITÉ

Cette méthode emploie une technologie de biologie moléculaire, appelée ddPCR (*droplet digital polymerase chain reaction*), qui permet de détecter et de quantifier de façon absolue l'ADN des bactéries viables et non viables du genre *Legionella* qui peuvent être retrouvées dans différents environnements liquides (p. ex. : eau des tours de refroidissement, humidificateurs, douches) et les sols.

Le principe du ddPCR consiste à fractionner l'échantillon d'extrait d'ADN en 20 000 gouttelettes, dans lesquelles l'amplification par PCR de la molécule d'intérêt aura lieu de façon indépendante. Le ddPCR comporte plusieurs avantages, notamment celui de permettre la quantification absolue, de détecter l'ADN de *Legionella* dans des échantillons où il y a prépondérance d'une flore hétérotrophe et de réduire l'impact des inhibiteurs pouvant être présents dans certains échantillons.

Domaine : La limite quantitative inférieure correspond à la valeur minimale rapportée (VMR) respective de chacun des systèmes.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- La présence de particules solides ou de sédiments dans les échantillons liquides qui peut rendre difficile la filtration du volume total d'eau. Un volume moins élevé serait alors filtré, et cela aurait un impact direct sur la limite de détection qui serait alors plus élevée.
- La présence d'inhibiteurs qui empêcheraient l'amplification de l'ADN pourrait produire un résultat faux négatif. Le contrôle interne d'amplification permet de contrôler la production de résultats faux négatifs.
- Les manipulations lors des méthodes de biologie moléculaire doivent se faire de façon à éviter les contaminations par les amplicons produits.

PRÉLÈVEMENT

1) Système d'échantillonnage

Matériel	Matrice
Contenant de prélèvement avec thiosulfate de sodium – format 1L	Échantillons d'eau : eau chaude, spa, piscine, procédé, etc.
Contenant de prélèvement stérile	Échantillons solides : sol, compost, etc.

Remarque : L'envoi de témoin n'est pas nécessaire.

2) Conditions de prélèvement recommandées

Débit : S.O.

Temps d'échantillonnage : S.O.

Volume d'échantillonnage : 1 litre d'eau ou 250 g de sol

4) Entreposage

S.O..

3) Durée de conservation testée et validée

Le transport au laboratoire doit se faire dans les plus brefs délais. Il est préférable de laisser refroidir les échantillons à la température de la pièce et de les protéger du gel et des températures extrêmes. Conserver entre 6 °C et 20 °C durant le transport. Les blocs réfrigérants sont nécessaires seulement l'été. Veuillez noter que le respect d'un délai maximal de 48H entre le prélèvement et la réception des échantillons au laboratoire permet la mise en culture des échantillons, si nécessaire.

5) Détails

Se référer à la consigne d'échantillonnage I-MAT-037, disponible sur le site web de l'IRSST.

RÉACTIFS

- Thiosulfate de sodium
- Tampon PBS 1X stérile
- Eau ultrapure, désionisée, de qualité biologie moléculaire (Eau PCR)
- Tampon Tris-EDTA (TE), pH 7,6, grade biologie moléculaire
- ADN contrôle positif de *Legionella pneumophila* sérogr. 1
- Trousses d'extraction
 - Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo)
 - Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo)
- Supermix (Biorad # cat : 1863023, 1863024, 1863025)¹
- Tampon contrôle pour ddPCR (Biorad # cat : 1863052)¹
- Huile pour la génération de gouttelettes (Biorad # cat : 1863005)¹
- Huile pour le QX200 Droplet Reader (Biorad # cat : 1863004)¹
- Amorces JRP & JFP, PT69 & PT70, P65 & P66 (IDT)
- Sondes LegLC, LpneuFL, Sg1-PB (IDT)
- Contrôle interne d'amplification : Amorces-Sonde HEX (IDT # cat : 10031228) et ADN HEX (IDT # cat : 10031285)¹
- Chlorure de magnésium (MgCl₂)
- Éthanol 70%
- DNA Away

LOGICIELS

- QX Manager 1.2 Standard Edition

APPAREILLAGE

- Congélateur (±-20°C)
- Réfrigérateur (±4°C)
- Enceinte de sécurité biologique
- Enceinte PCR (2 unités)
- Microcentrifugeuse 6 tubes
- Centrifugeuse de table pour tubes 2 mL
- Centrifugeuse pour tubes 50 mL et plaque PCR
- Système de filtration sous vide et entonnoirs
- Mini et Maxi-vortex
- Balance
- T100 Thermal Cycler (ou équivalent)
- PX1 PCR Plate Sealer (Biorad # cat : 17005226)¹
- QX200 Droplet Generator (Biorad # cat : 17005227)¹
- QX200 Droplet Reader (Biorad # cat : 17005228)¹

MATÉRIEL

- Plaque 96 puits pour ddPCR (Biorad # cat : 12001925)¹
- Joints d'étanchéité en caoutchouc «Gaskets» (Biorad # cat : 1863009, 1864007)¹
- Cartouches (Biorad # cat : 1864008, 1864007)¹
- Porte-cartouche (Biorad #cat : 1863051)¹
- Films métalliques (Biorad # cat : 1814040)¹
- Filtres à membrane Millipores en ester de cellulose 0,45µm
- Grattoirs de plastique
- Petits pétris
- Pincés stériles
- Pipettes sérologiques
- Micropipettes et Embouts
- Bâtons stériles
- Récipient pour pesée
- Tubes 1,5 mL, 2 mL et 50 mL
- Gants

¹ : Cette méthode utilise le système de ddPCR de la compagnie Bio-Rad. Les numéros de catalogue fournis sont à titre indicatif seulement et sont susceptibles d'être modifiés par le manufacturier.

Commentaire : Tous les consommables et réactifs utilisés doivent être stériles et/ou sans ADN ainsi que sans DNase et RNase.

PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Étape 1	Traitement des échantillons <ul style="list-style-type: none"> • Concentration par filtration : eau de consommation (ex. : douche, buvettes) • Concentration par centrifugation : eau de procédé (ex. : réservoir, bain thérapeutique, bassin) et sols
Étape 2	Extraction d'ADN

Étape 1

Matrice	Traitement
Eau de consommation (ex. : douches, buvettes)	Filtrer le volume d'échantillon désiré, sans assécher le filtre Millipores. À l'aide d'une pince stérile, déposer le filtre dans un petit pétri vide. Déposer 1 mL d'eau PCR sur le filtre. Gratter fermement toute la surface pour faire décoller les bactéries. Aspirer le liquide et le transférer dans un tube de 2 mL. Redéposer 1 mL d'eau PCR sur le filtre, gratter de nouveau, aspirer et ajouter au volume précédemment récolté dans le tube de 2 mL. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 17 000G et conserver les culots.
Eau de procédé (ex. : réservoir, bassin)	Centrifuger 50 mL de l'échantillon à 7000G pendant 15 minutes. Retirer le surnageant, laisser environ 2 mL afin de resuspendre le culot. Transférer la suspension dans un tube de 2 mL. Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 17 000G et conserver les culots.
Solide (ex. : sol, compost)	À l'aide d'un bâton stérile, bien homogénéiser la terre. Prélever environ 5 g de l'échantillon, en évitant les roches et les gros morceaux. Déposer dans un tube de 50 mL contenant 30 mL d'eau PCR. Agiter au maxi-vortex pendant 15 minutes à 2200 RPM. Laisser sédimenter pendant 10-15 minutes. Centrifuger 7 mL de surnageant (4 x 1,75 mL) pendant 10 minutes à 17 000G. Retirer les surnageants, combiner les culots dans un seul tube de 2 mL. Centrifuger le tube pendant 5 minutes à 17 000G et conserver le culot.

Étape 2

	Trousse d'extraction d'ADN	
	Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo)	Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo)
Eau de consommation	✓	
Eau de procédé	✓	
Sols		✓

CONDITIONS ANALYTIQUES

Technique analytique : Amplification par ddPCR

Systèmes		Cible	Séquences
<i>Legionella</i> spp.: JFP/JRP- LegLC			
Amorces	JFP-modif	ADNr 16S	5'- GGA GGG TTGA TAG GTT AAG AGC-3'
	JRP-modif		5'- CCA ACA GCTA GTT GAC ATC GT-3'
Sonde	LegLC		5'-/56-FAM/TAC TGA CAC/ZEN/TGA GGC ACG AAA GCG T/ 3IABkFQ/-3'
<i>Legionella pneumophila</i>: PT69/PT70- LpneuFL			
Amorces	PT69	mip	5'-GCA TTG GTG CCG ATT TGG -3'
	PT70		5'-GCT TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA-3'
Sonde	LpneuFL		5'-/56-FAM/CCA CTC ATA/ZEN/GCG TCT TGC ATG CCT TTA/3IABkFQ/-3'
<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1: P66/P65- LegSg1			
Amorces	P66	wzm	5'-CAA ACA CCC CAA CCG TAA TCA -3'
	P65		5'- CAA AGG GCG TTA CAG TCA AAC C-3'
Sonde	SG1-PB		5'-/56-FAM/TCC TGG GAT/ZEN/TGG GTT GGG TTA TTT TAA CTC CT/3IABkFQ/-3'

Commentaire : Veuillez noter que le nombre de copies des gènes ciblés par les systèmes de détection n'est pas le même au sein du génome de *Legionella* spp. Le gène codant pour l'ARNr 16S est généralement présent en trois copies alors que les gènes mip et wzm sont en simple copie.

MasterMix	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (µL)
Eau			1,75
Super Mix	2X	1X	12,5
Concentré 20X ¹ Amorces+Sonde Système Légio	20X	1X	1,25
Concentré 20X ¹ Amorces+Sonde Contrôle interne HEX	20X	1X	1,25
Contrôle interne ADN HEX	1/200		0,25
MgCl ₂	25 mmol	1 mmol	1
Volume de MasterMix à distribuer			18
Extrait d'ADN (échantillons) OU contrôle positif OU contrôle négatif (eau)			7
Volume total			25

¹ Pour connaître la recette du concentré 20X, référez-vous à l'annexe 1.

Générer les gouttelettes en suivant les instructions du manufacturier.

Sceller la plaque à l'aide du PX1 PCR Plate Sealer en suivant les instructions du manufacturier.

Programmes d'amplification PCR					
<i>Legionella</i> spp		<i>Legionella pneumophila</i>		<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1	
LegLC		LpneuFL		LegSg1	
95 °C - 10 min		95 °C - 10 min		95 °C - 10 min	
94 °C - 30 s		94 °C - 30 s		94 °C - 30 s	
51 °C - 60 s	40 x	58,5 °C - 60 s	40 x	58,5 °C - 60 s	40X
72 °C - 30 s		72 °C - 30 s		72 °C - 30 s	
98 °C - 10 min		98 °C - 10 min		98 °C - 10 min	
12 °C - ∞		12 °C - ∞		12 °C - ∞	
<i>Ramping</i> de 2 °C/sec à tous les cycles					

Commentaire : Dans un programme de ddPCR, le *ramping* de l'appareil, soit la vitesse de chauffe et de refroidissement, est importante pour ne pas faire éclater les billes. Elle ne doit pas être plus rapide que 2°C/sec.

Suite à l'amplification, la plaque est lue par l'appareil QX200 Droplet Reader.

Interprétation des résultats

		Critères d'acceptabilité
Échantillon		≥ 10 000 billes totales
		Si ≥ 5000 billes positives → Diluer et reprendre l'analyse
Contrôle de filtration	Négatif	<VMR
	Positif	>VMR
Contrôle d'extraction d'ADN	Négatif	<VMR
	Positif	>VMR
Contrôle de plaque	Négatif	<VMR
	Positif	>VMR
Contrôle interne d'amplification		Si échantillon négatif, doit être positif

CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans un échantillon d'eau de consommation :

$$C = \frac{c \times V \times FD}{V_{ADN}} \times \frac{V_e}{V_f} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}$$

Où :

- C = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans l'échantillon d'eau, en **copies/L**
- c = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans la réaction d'amplification, en **copies/ μ L**
- V = Volume de la réaction d'amplification, en **μ L**
- FD = Facteur de dilution de l'extrait d'ADN (F=1 en l'absence de dilution)
- V_{ADN} = Volume d'extrait d'ADN ajouté à la réaction d'amplification, en **μ L**
- V_e = Volume d'éluion, en **μ L**
- V_f = Volume d'échantillon filtré, en **mL**

Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans un échantillon d'eau de procédé :

$$C = \frac{c \times V \times FD}{V_{ADN}} \times V_e \times \frac{1000 \text{ mL}}{V_c}$$

Où :

- C = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans l'échantillon d'eau, en **copies/L**
- c = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans la réaction d'amplification, en **copies/ μ L**
- V = Volume de la réaction d'amplification, en **μ L**
- FD = Facteur de dilution de l'extrait d'ADN (F=1 en l'absence de dilution)
- V_{ADN} = Volume d'extrait d'ADN ajouté à la réaction d'amplification, en **μ L**
- V_e = Volume d'éluion, en **μ L**
- V_c = Volume d'échantillon centrifugé, en **mL**

Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans un échantillon de sol :

$$C = \left(\frac{c \times V \times FD}{V_{ADN}} \times V_e \times \frac{V_r}{V_c} \right) \div P$$

Où :

- C = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans l'échantillon de sol, en **copies/g**
- c = Concentration de copies d'ADN de *Legionella* dans la réaction d'amplification, en **copies/ μ L**
- V = Volume de la réaction d'amplification, en **μ L**
- FD = Facteur de dilution de l'extrait d'ADN (F=1 en l'absence de dilution)
- V_{ADN} = Volume d'extrait d'ADN ajouté à la réaction d'amplification, en **μ L**
- V_e = Volume d'éluion, en **μ L**
- V_r = Volume total dans lequel l'échantillon a été resuspendu, en **mL**
- V_c = Volume d'échantillon centrifugé, en **mL**
- P = Poids de l'échantillon analysé, en **g**

VALIDATION

Remarque : les valeurs relatives à la validation de la méthode font référence à l'étape d'amplification d'ADN exclusivement et correspondent à des paramètres d'analyse précis.

Limite de détection (LD) et Limite de quantification (LQ)

SYSTÈMES	PAR RÉACTION D'AMPLIFICATION		EAU DE CONSOMMATION		EAU DE PROCÉDÉ		SOLS	
	LD (COPIES/μL)	LQ (COPIES/μL)	LD (copies/L)	LQ (copies/L)	LD (copies/L)	LQ (copies/L)	LD (COPIES/G)	LQ (COPIES/G)
<i>Legionella</i> spp. JFP/JRP- LegLC	0,75	2,5	93	310	1900	6300	80	270
<i>Legionella pneumophila</i> PT69-PT70- LpneuFL	0,47	1,5	58	190	1100	3900	49	170
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 P66/P65- LegSg1	0,64	2,1	79	270	1600	5400	68	230

Commentaire concernant les limites calculées

- Eau de consommation: volume d'échantillon filtré de 1 litre avec un éluat final de 100 μl.
- Eau de procédé : volume d'échantillon centrifugé de 50 mL avec un éluat final de 100 μl.
- Sols : 5 grammes d'échantillon resuspendu dans un volume total de 30 mL d'eau, dont 7 mL sont centrifugés et utilisés pour l'extraction avec un éluat final de 100 μl.

Fidélité

Remarque : Les 3 systèmes de détection utilisés dans cette méthode ont été validés à l'aide de plus de 430 souches bactériennes. La liste des souches utilisées pour la validation est disponible en matériel supplémentaire.

Système JFP/JRP: LegLC	Positif	Négatif
<i>Legionella</i> spp	336	0
Autres genres	0	96
Système PT69-PT70: LpneuFL	Positif	Négatif
<i>Legionella pneumophila</i>	229	0
<i>Legionella</i> spp (autre que <i>L. pneumophila</i>)	0	67
Autres genres	0	97
Système P66/P65 : LegSg1	Positif	Négatif
<i>Legionella pneumophila</i> (Sg1)	52	0
<i>Legionella pneumophila</i> (non Sg1)	0	217
<i>Legionella</i> spp (autre que <i>L. pneumophila</i>)	0	67
Autres genres	0	96

Précision

SYSTÈMES	RÉPLICABILITÉ (%)	RÉPÉTABILITÉ (%)
<i>Legionella</i> spp. JFP/JRP- LegLC	7,0	14
<i>Legionella pneumophila</i> PT69-PT70- LpneuFL	4,0	11
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 P66/P65- LegSg1	5,3	11

Note : Ces valeurs sont les plus élevées parmi celles obtenues pour quatre concentrations testées.

Justesse

SYSTÈMES	JUSTESSE
<i>Legionella</i> spp. JFP/JRP- LegLC	0,5 log
<i>Legionella pneumophila</i> PT69-PT70- LpneuFL	
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 P66/P65- LegSg1	

Note : Puisque les analyses utilisent la technique de PCR impliquant des réactions dites exponentielles, la justesse a été déterminée en calculant la moyenne des écarts logarithmiques entre la valeur théorique attendue d'un standard moléculaire ATCC 33152DQ et celle obtenue.

Récupération

S.O..

Incertitude analytique

Remarque : Ces données représentent la performance de la méthode au moment de sa publication. Pour les valeurs d'incertitude analytique à jour, consulter le site Web de l'IRSST.

L'incertitude de mesure analytique (CV_a) de la méthode est déterminée à partir de résultats individuels obtenus sur des échantillons soumis à l'ensemble de la procédure analytique. Celle-ci ne tient pas compte d'un seuil de probabilité (95 %, par exemple) ni de la contribution de l'incertitude associée à l'échantillonnage.

SYSTÈMES	CV _a (%)
<i>Legionella</i> spp. JFP/JRP- LegLC	11
<i>Legionella pneumophila</i> PT69-PT70- LpneuFL	10
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 P66/P65- LegSg1	9,6

Pour information supplémentaire sur la détermination des incertitudes, référez-vous au [Document Explicatif pour éléments de validation de méthodes, I-G-041](#), de la Direction des laboratoires de l'IRSST.

RÉFÉRENCES

- Association française de normalisation. (2015). 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 (qPCR). Norme AFNOR NF T90-471.
- ASTM International. (2015). Standard guide for inspecting water systems for Legionellae and investigating possible outbreaks of Legionellosis (Legionnaire's Disease or Pontiac Fever). Norme ASTM D5952 - 08.
- Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention », Études et recherches, Guide technique T-23, 2001, 72 p.
<https://www.irsst.qc.ca/media/documents/PublIRSST/T-23.pdf>
- Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S. et Bhakdi, S. (1995). Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of Legionellae in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1247-1252.
- Macioszek, J. A., Lin, B.-C. et Martinez, A. E. (1999). Nucleic Acid Primers and Probes for Detecting *Legionella pneumophila* (Brevet américain no US 5,968,739). U.S. Patent and Trademark Office.
<https://patents.google.com/patent/US5968739A/en>
- Marchand, G. et Lacombe, N. (2015). Détection moléculaire des bactéries du genre *Legionella* dans l'eau des tours de refroidissement et l'eau de consommation (Rapport no R-887). IRSST.
<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PublIRSST/R-887.pdf>
- Mérault, N., Rusniok, C., Jarraud, S., Gomez-Valero, L., Cazalet, C., Marin, M., . . . Buchrieser, C. (2011). Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1708-1717. 10.1128/AEM.02261-10
- Organisation internationale de normalisation. (2019). 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). Norme ISO 12869.
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K. et Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 43, D593-D598. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Větrovský, T. et Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*, 8(2), e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Wellinghausen, N., Frost, C. et Marre, R. (2001). Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time lightcycler PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3985-3993. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3985-3993.2001>
- Zymo Research. (2021a). Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit. https://files.zymoresearch.com/protocols/d6010_quick-dna_fecalsoil_microbe_miniprep_kit.pdf
- Zymo Research. (2021b). Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit. https://files.zymoresearch.com/protocols/d6005_quick-dna_fungal-bacterial_miniprep_kit.pdf

ANNEXE 1

Concentré 20X amorces et sonde

	Concentration initiale (μM)	Concentration finale (μM)	Volume (μL)
Amorce F	250	18	36
Amorce R	250	18	36
Sonde	250	5	10
TE	-	-	418
Volume total			500