

Detection of *Legionella* in water : significance of the PCR signal

DÉTECTION DES LEGIONELLA DANS L'EAU : SIGNIFICATION DU SIGNAL PCR

M. Reyrolle, S. Jarraud, J. Étienne

Centre National de Référence des Légionelles, Centre de Biologie et de Pathologie Est
59 boulevard Pinel, 69677 Bron

L'intérêt de la PCR quantitative en temps réel comme outil rapide de détection de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* dans l'eau a conduit à la mise en place d'une norme AFNOR expérimentale XP T 90-471 en 2006. Les textes réglementaires ne font actuellement référence qu'à la méthode conventionnelle par culture décrite dans la norme NFT T 90-431. Le recul permet des maintenant d'apprécier la pertinence de la norme PCR, mais également de se focaliser sur les questions qui se posent lors de l'utilisation de cette technique.

Les différentes étapes de la technique décrites dans la norme sont les suivantes :

1 - La concentration de l'eau

Elle est réalisée par filtration ou par centrifugation pour un échantillon de quantité volume variable : 0,1 L à 1 L.

2 - L'extraction et la purification de l'ADN

La méthode peut être physique ou chimique, manuelle ou automatique.

3 - L'amplification et l'hybridation

La spécificité des amorces et des sondes doit être évaluée.

L'amplification est réalisée en double ou en triple pour chaque échantillon.

4 - Les contrôles

Les témoins positifs et négatifs de PCR et un contrôle interne d'inhibition pour chaque eau.

5 - Les paramètres à fixer

La limite de détection et la limite de quantification sont à déterminer pour chaque système.

Le rendement de la technique supérieur à 25 %.

6 - La quantification

Elle est faite à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec au moins quatre concentrations d'ADN différentes et elle doit être linéaire.

7 - Le résultat

Il est calculé en Unité Génome par litre (UG/L).

L'ADN de *Legionella* spp et l'ADN de *Legionella pneumophila* est quantifié.

Le résultat est obtenu en 24 à 48 h selon les systèmes.

La technique est décrite mais des essais inter-laboratoire ont montré une grande dispersion des résultats imputables à la gamme d'étalonnage réalisée avec des ADN d'origines différentes.

Un ADN étalon de référence est en cours d'évaluation et la révision de la norme XP T90-471 est également en cours.

L'interprétation des résultats et la valeur du signal PCR pour évaluer le risque sont les sujets actuels de discussions et de recherches. Les publications parues depuis 2005 permettent cependant de dégager plusieurs éléments consensuels qui peuvent être cités.

La PCR permet en 24 h le criblage des eaux chaudes sanitaires (ECS) non quantifiables en culture avec une bonne Valeur Prédictive Négative. La définition de seuils PCR d'alerte paraît possible pour les ECS. L'absence de corrélation numérique pour les TAR « culture-PCR » empêche cette définition de seuils pour ce type d'installations. L'interprétation des résultats de PCR sur un prélèvement isolé est délicate voir impossible. La PCR est une méthode efficace pour conduire une stratégie de suivi régulier pour les TAR par exemple.

La présence d'un signal positif en PCR et d'une culture négative peut indiquer la présence de légionelles VBNC (bactérie viable mais non-cultivable) ou de légionelles LLAP (Legionella Like Amoebal Pathogen).

Les LLAP sont connues depuis 1991, elles ont été décrites dans l'environnement mais un cas clinique avec LLAP12 a été aussi relaté.

Pour les VBNC les études « in vitro » ont permis d'observer des légionelles VBNC capables de se multiplier dans les amibes ce qui signe leur potentiel infectieux. La multiplication intracellulaire des bactéries leur permet de restaurer leur cultivabilité, et aussi d'augmenter leur virulence.

Les LLAP et les VBNC posent donc la question de l'évaluation du risque avec un signal PCR positif et une culture conventionnelle négative.

Néanmoins la PCR peut être utilisée :

- pour la surveillance en continu d'un site lorsque le seuil UG/L est défini (en cas d'augmentation significative du seuil la culture est nécessaire) ;
- pour évaluer un méthode de décontamination ;
- pour évaluer rapidement les sites contaminés lors des cas groupés.

Mais dans le cadre de la législation et des enquêtes épidémiologiques la culture selon NF T90-431 (2003) reste indispensable pour isoler les souches environnementales et les comparer aux souches cliniques pour identifier la source de la contamination.

En conclusion la standardisation de la technique permettra d'accorder une valeur plus fiable aux résultats PCR et les études sur les VBNC permettront de mieux interpréter la signification d'une PCR détectant de l'ADN de *Legionella* dans les prélèvements environnementaux.

BIBLIOGRAPHIE

Norme AFNOR (XP T90-471) (avril 2006) : Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et Legionelle pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Norme AFNOR (NF T90-431) (septembre 2003) : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Legionella spp et Legionella pneumophila. Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.