



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

Développement analytique

Delphine Lanoie, M.Sc., Mcb.A.
Professionnelle scientifique,
Direction des Laboratoires, IRSST

11 mai 2023



Plan de la présentation

-
- Section 1
- Historique
 - Manifestations cliniques

-
- Section 2
- Agent étiologique
 - Exposition aux Légionelles en contexte SST

-
- Section 3
- Au laboratoire
- La culture vs la biologie moléculaire
 - Principe du ddPCR

-
- Section 4
- Validation MA-410
- Principe et résultats
 - Comparaisons
-

L'avantage IRSST 😊

1.1 Historique

- Convention de la Légion Américaine à Philadelphie en 1976
 - 211 cas
 - 29 décès
- Isolée en janvier 1977 (CDC)
 - Provenant des tours de refroidissement du système d'air climatisé de l'hôtel
- Analyses rétroactives sur des spécimens révèlent des éclosions sporadiques depuis le début des années 1940.



Des analystes du CDC observant des isolats environnementaux de *Legionella pneumophila* mis en culture pour la 1^{ère} fois.



Le Bellevue-Stratford Hotel, site de la 1^{ère} éclosion associée à *Legionella*

1.2 Manifestations cliniques

Pas de transmission
d'humain à humain

Maladie du Légionnaire (Légionellose)

- Pneumonie
- Incubation 2 à 10 jours
- Doit être traité avec des antibiotiques
- Létal dans 10 à 15% des cas
- Hôtes susceptibles
 - Personnes âgées
 - Immunosupprimés
 - Asthmatiques
 - Fumeurs, etc

Fièvre de Pontiac

- Forme bénigne
- Incubation 1 à 2 jours
- Symptômes : fièvre et toux
- Peut être confondue avec une grippe
- Guérit sans traitement

Légionellose = Maladie à déclaration obligatoire (MADO) depuis 1987

2.1 Agent étiologique

Legionella pneumophila

Genre espèce

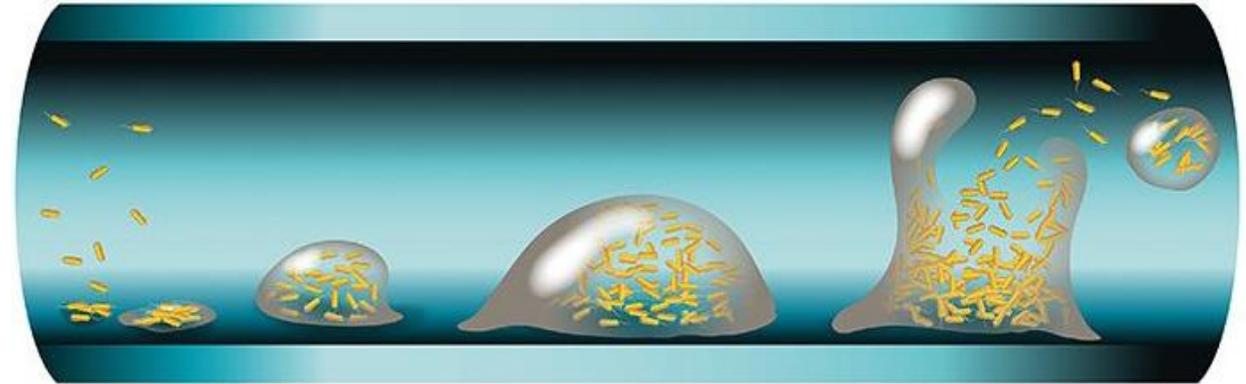
- Bactérie (Bâtonnet Gram négatif)
- Sources : eaux et sols humides
 - Sources d'eaux « artificielles »
 - Biofilms
 - Sols, terreaux, composts (*L. longbeachae*)
- Température : 25-45°C
- Aérosolisation



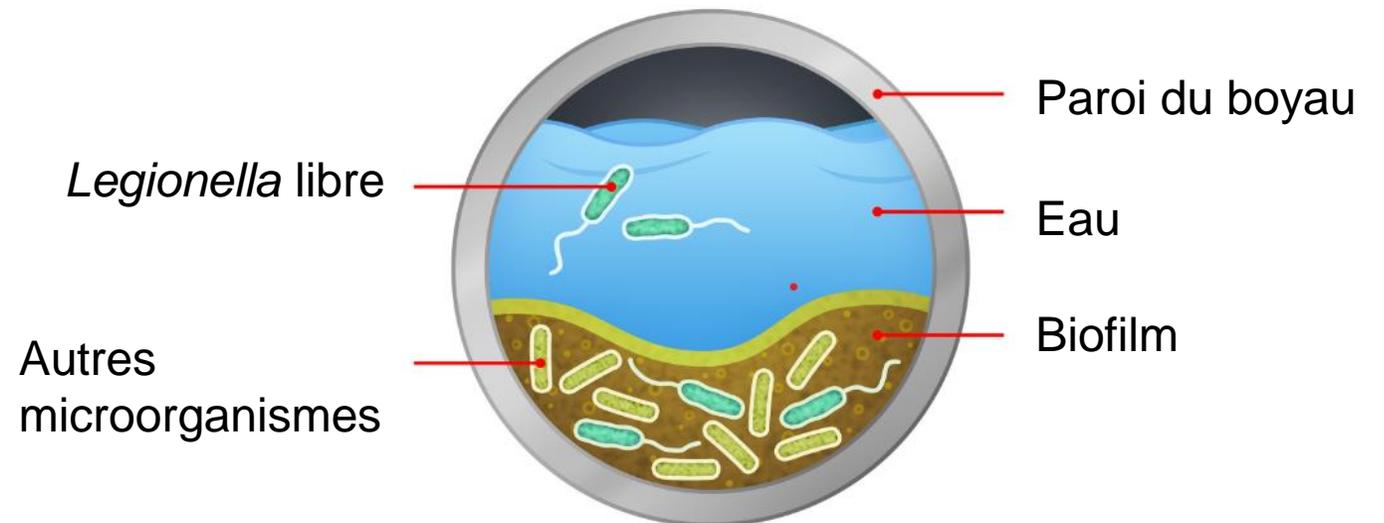
Image tirée de cdc.gov

2.1 Agent étiologique

- Biofilms
 - Matrice polymérique
 - Fonction de protection
 - Environnement
 - Traitements antimicrobiens
 - Relâchement sporadique et imprévisible

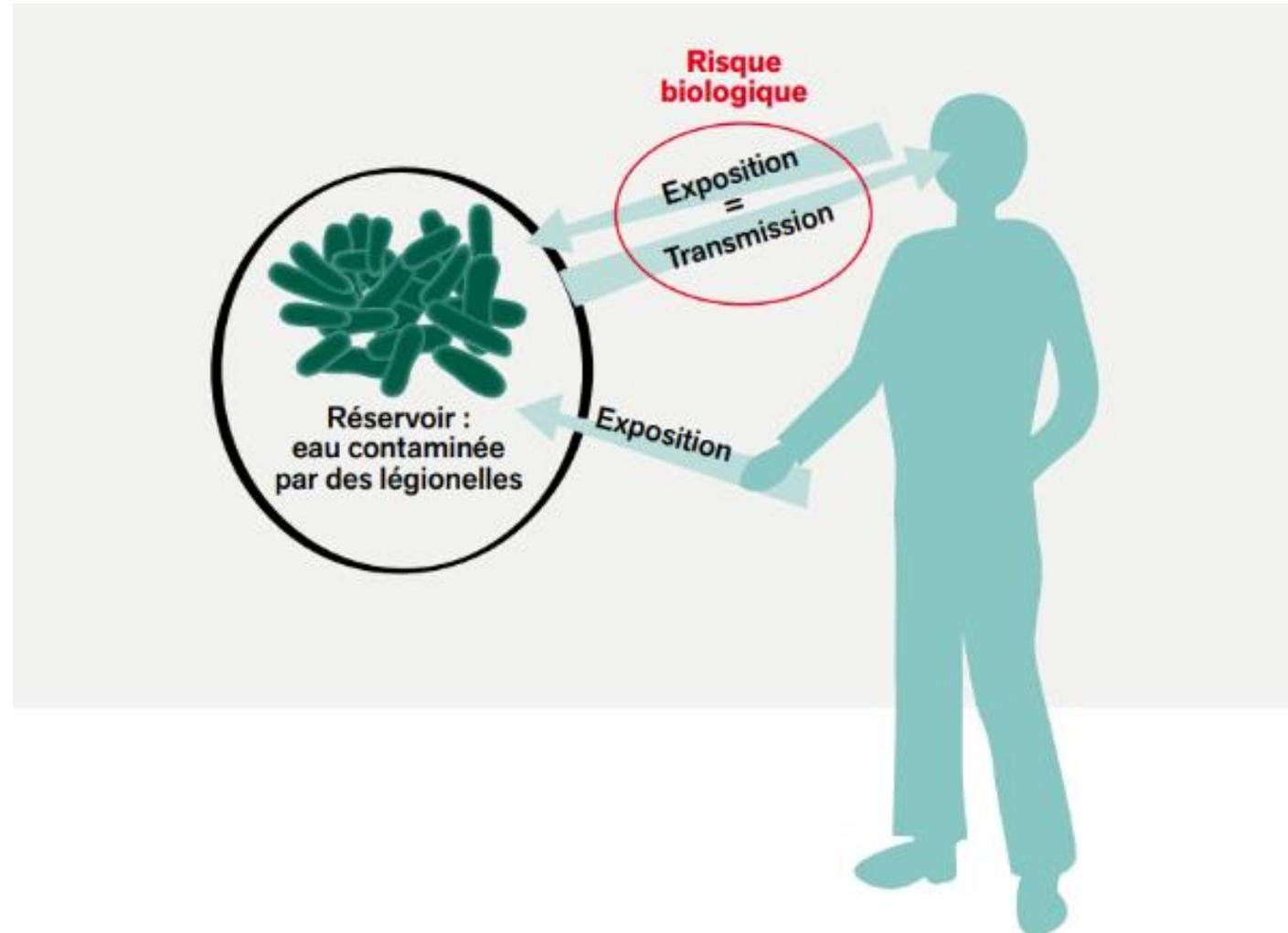
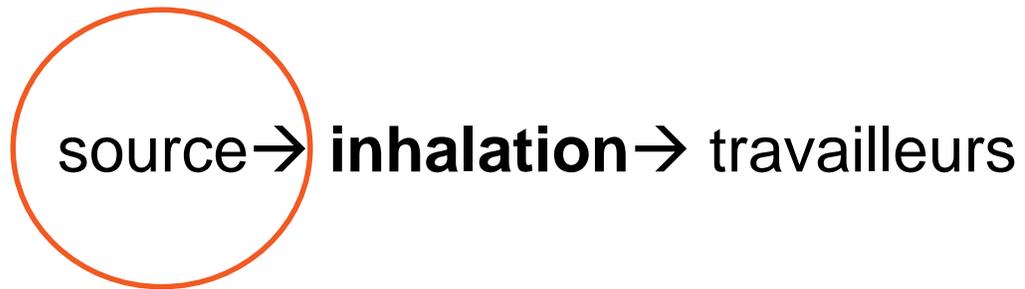


Attachement → Croissance → Relargage



2.2 Exposition aux Légionelles en contexte SST

Voie d'exposition: inhalation de gouttelettes par les voies respiratoires



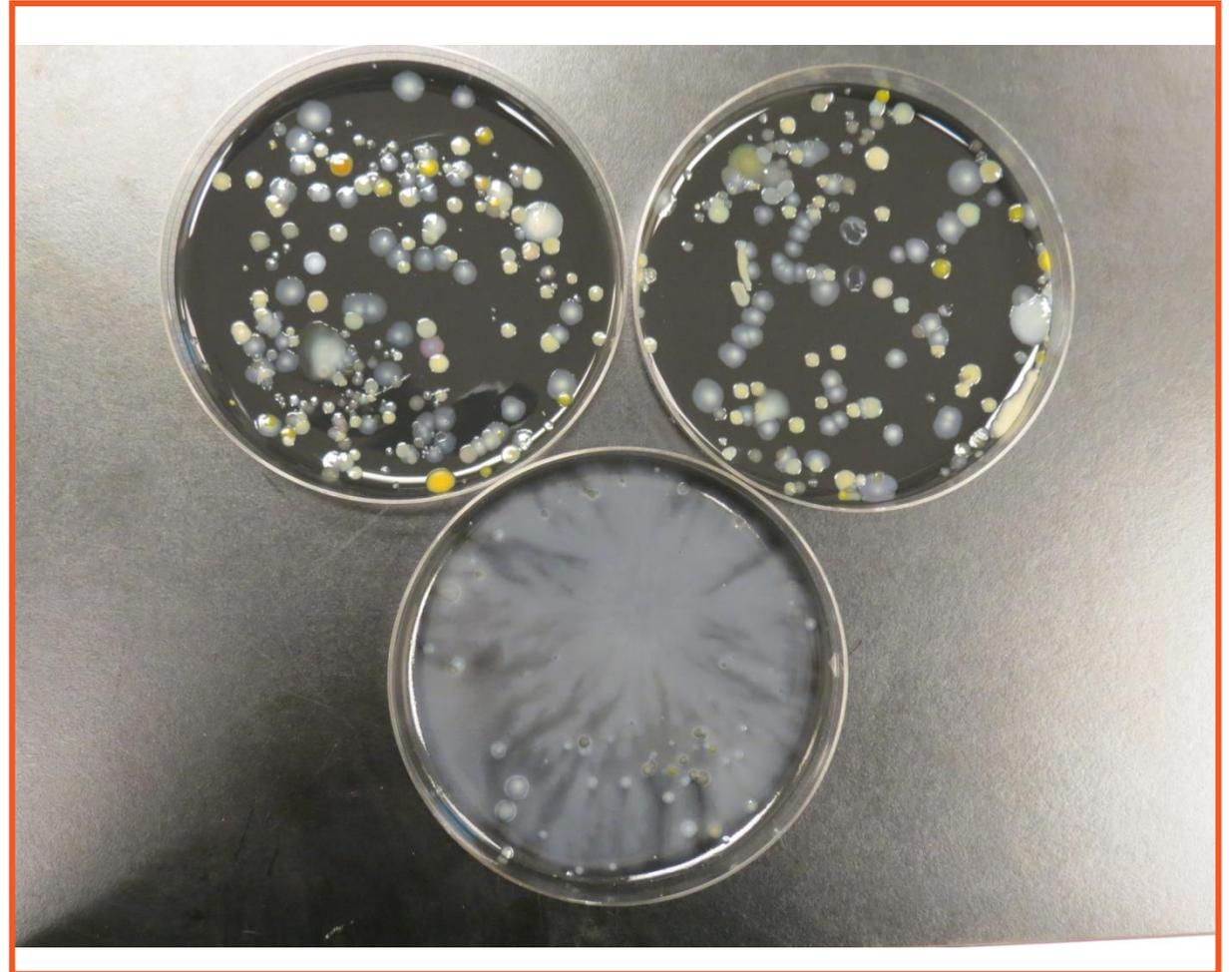
3. Au laboratoire

- La culture

- Méthode officielle reconnue
 - RBQ (TRE)

- Portion viable et cultivable

- Limites
 - Flore interférente
 - Subjectivité de l'analyste
 - Biais de repiquage
 - Délais longs (10j.)



3. Au laboratoire

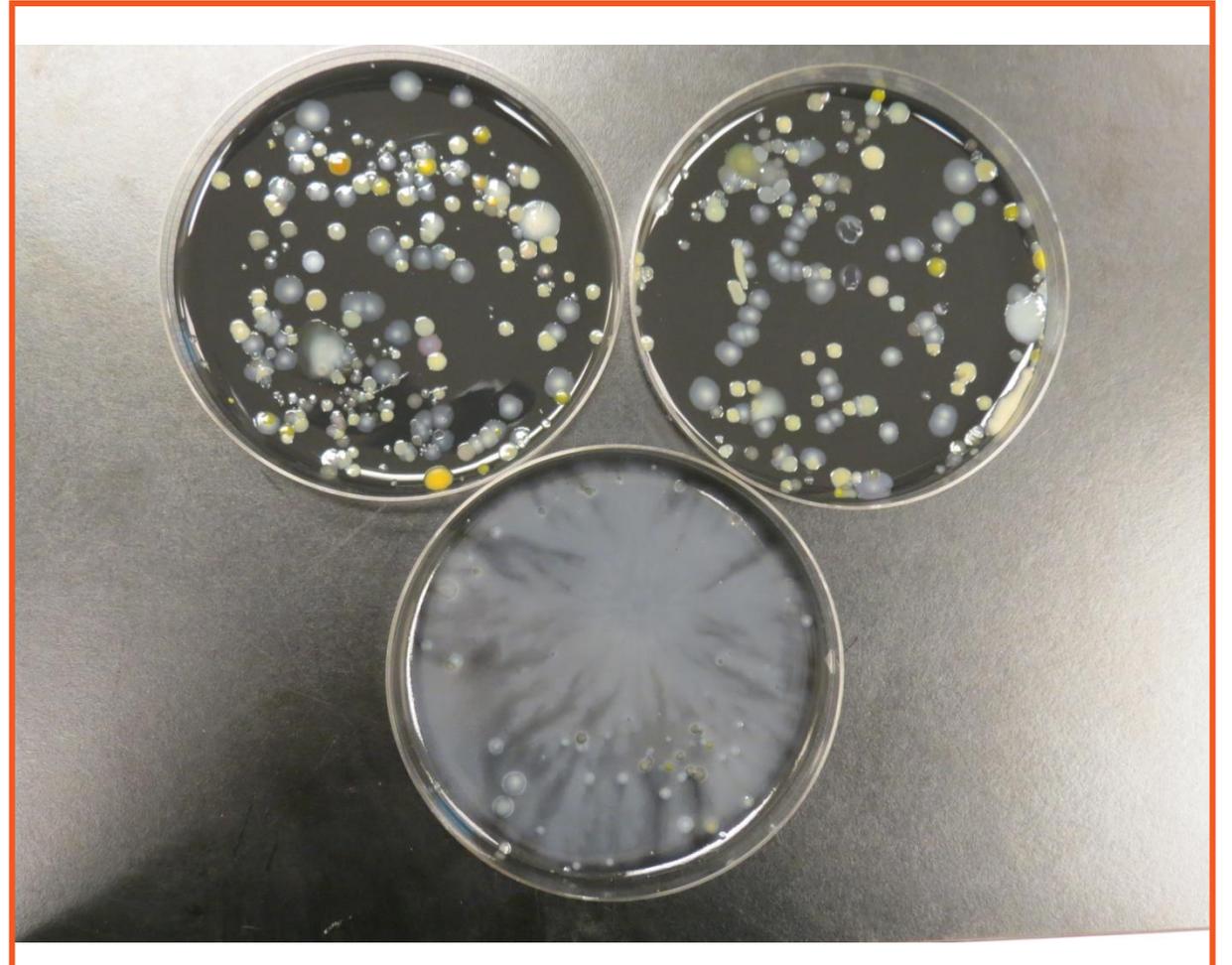
- La culture

- Méthode officielle reconnue
 - RBQ (TRE)

- Portion viable et cultivable

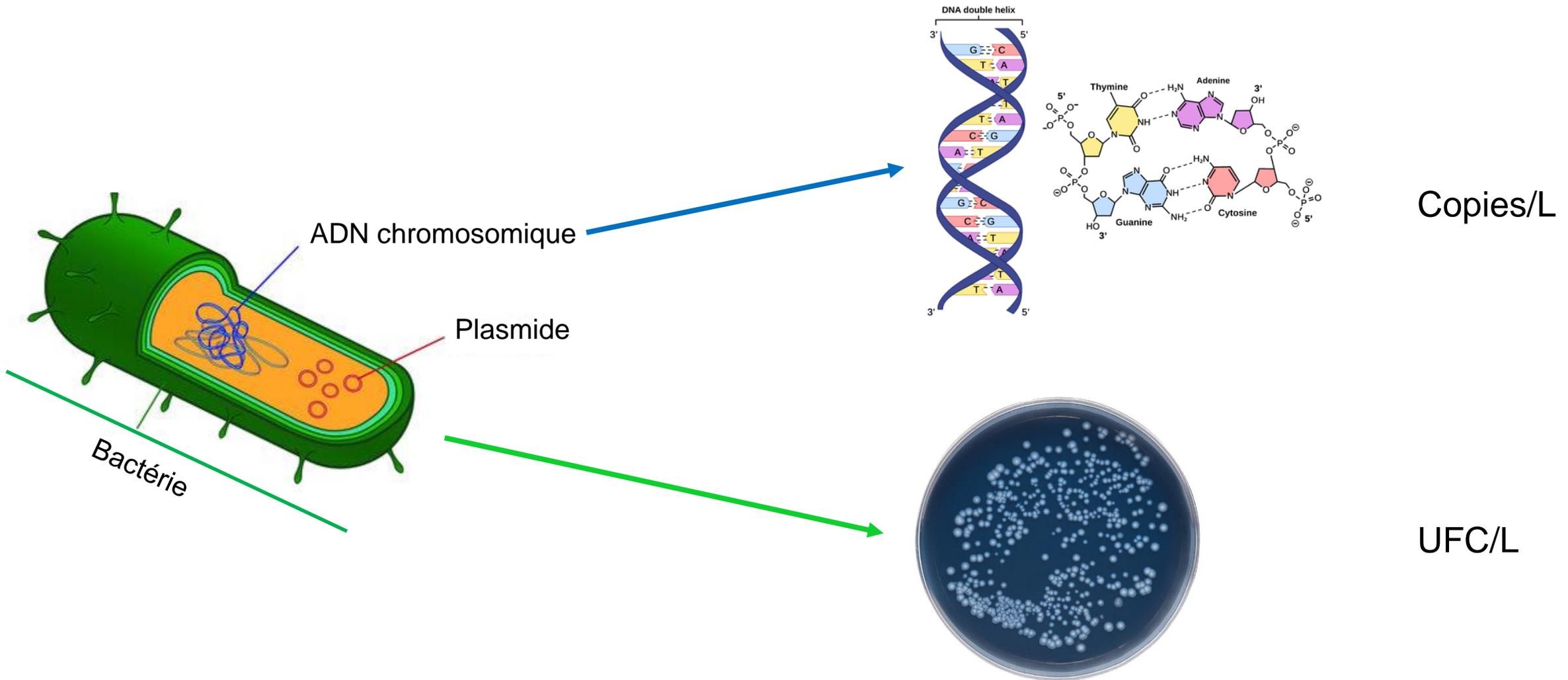
- Limites
 - ~~Flore interférente~~
 - ~~Subjectivité de l'analyste~~
 - ~~Biais de repiquage~~
 - ~~Délais longs (10j.)~~

Biologie
moléculaire



3. Au laboratoire

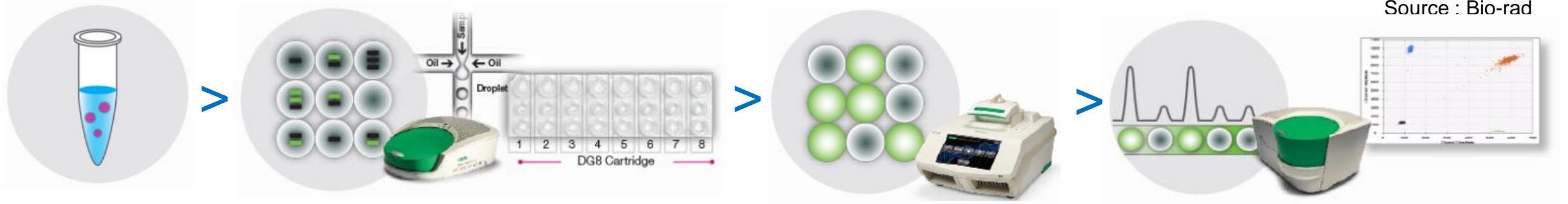
- La culture VS la biologie moléculaire



3. Au laboratoire

- Le principe du ddPCR (droplet digital PCR)

Objectif du PCR « Polymerase chain reaction » :
Détecter un microorganisme grâce à une cible moléculaire qui sera amplifiée et donc, qui deviendra détectable.



1

Préparation

L'ADN est combiné avec un mélange réactionnel pour PCR

2

Génération de gouttelettes

L'ADN est distribué aléatoirement dans 20 000 gouttelettes d'huile

3

PCR

La séquence cible est amplifiée par PCR end-point dans chaque gouttelette

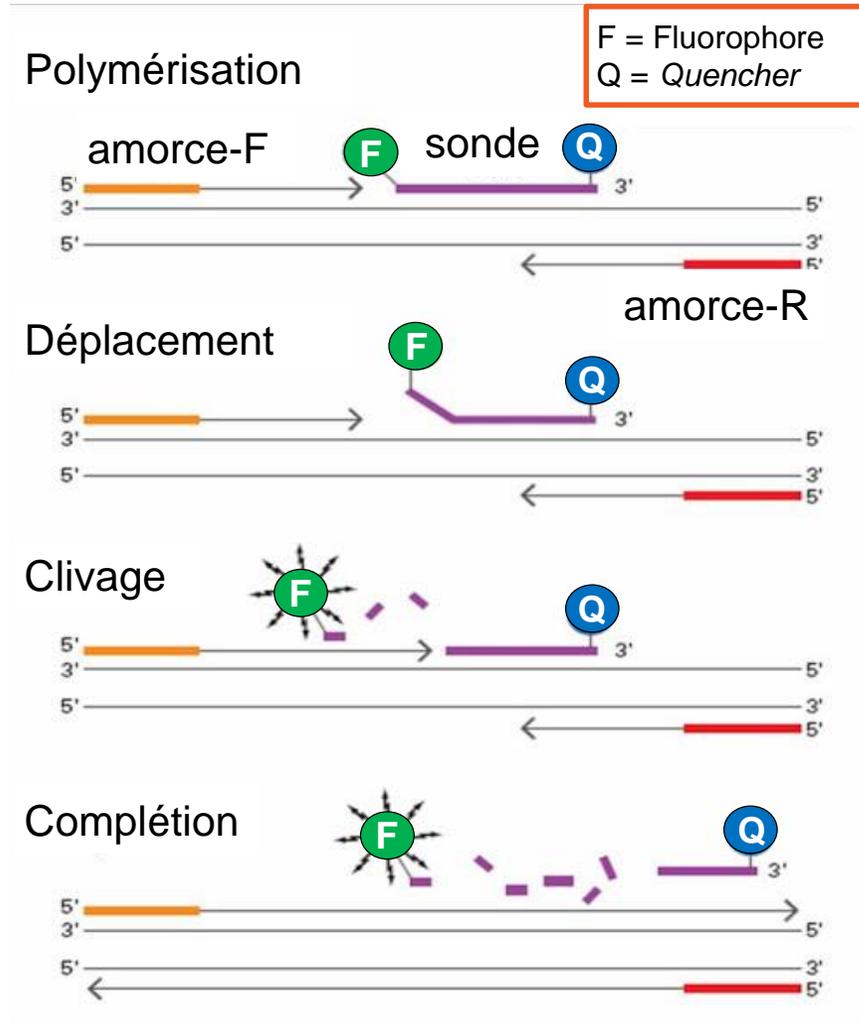
4

Lecture et analyse

Les gouttelettes positives et négatives sont comptées permettant une quantification absolue de la séquence cible dans l'échantillon

4. Validation de la MA-410

- Principe



3 systèmes de détection avec sondes TaqMan

	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1
Amorces	JFP-modif JRP-modif	PT69 PT70	P65 P66
Sonde	LegLC	LpneuFL	LegSg1
Cible	ARNr 16S	mip	wzm

Source : R-887, IRSST



4. Validation de la MA-410

- Évaluation de la précision
 - B155 *L. pneumophila* sérogroupe 1 ATCC 33152
 - 4 concentrations indépendantes



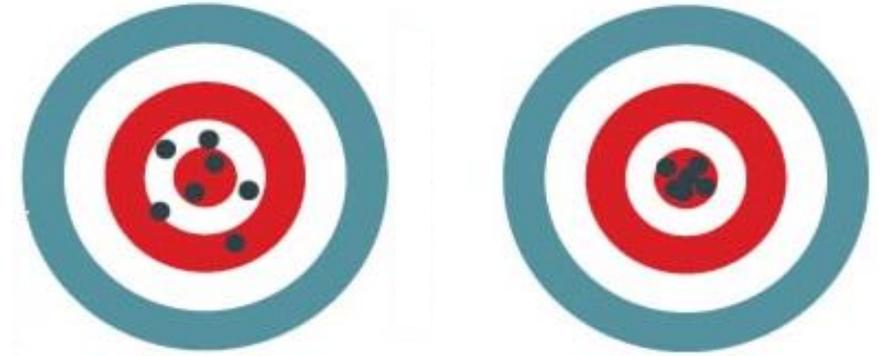
Systemes	Réplicabilité (%)	Répétabilité (%)
<i>Legionella</i> spp	7.0	14
<i>Legionella pneumophila</i>	4.0	11
<i>Legionella pneumophila</i> sérogroupe 1	5.3	11

↓
Même jour
Même analyste
Même instrument

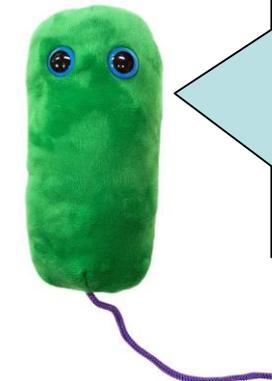
↓
Jour différent
ou
Analyste différent

4. Validation de la MA-410

- Évaluation de la justesse
 - *L. pneumophila* sérotype 1 ATCC 33152DQ
- L'exactitude a été déterminée en calculant la moyenne des écarts logarithmiques entre la valeur théorique attendue (CoA) et celle obtenue.



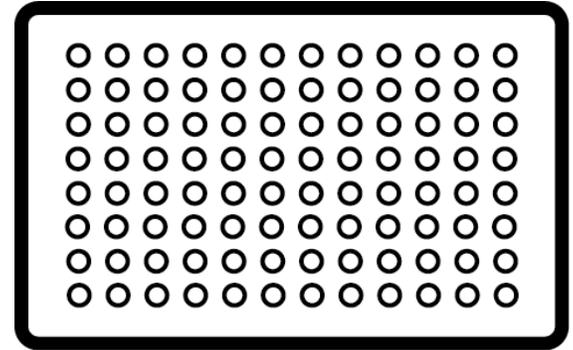
Systèmes	Exactitude (comp. CoA) (LOG)	(LOG)
<i>Legionella</i> spp	0.37	0.5
<i>Legionella pneumophila</i>	0.46	
<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	0.47	



Les analyses utilisant la technique de PCR (*polymerisation chain reaction*), tel que le qPCR et le ddPCR, impliquent des réactions dites **exponentielles!**

4. Validation de la MA-410

- Sensibilité



	puit <i>copies/20 ul</i>	brut <i>copies/ul</i>		
Théorie	1	0,05		
Littérature	4	0,20		
	Limite de détection		Limite de quantification	
<i>Legionella</i> spp.	6	0,26	18	0,88
<i>Legionella pneumophila</i>	4	0,16	11	0,54
<i>Legionella pneumophila</i> de sérogroupe 1	5	0,22	15	0,75

4. Validation de la MA-410

- Spécificité

> 430 souches

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 P65/P66 : 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

4. Méthode analytique 410



• Type d'échantillons éligibles

- Eaux de consommation (douches, robinets, etc)
- Eaux de procédé (réservoirs, bassins, etc)
- Sols
- ***Nouveauté*** Écouvillons

• Agents biologiques ciblés

- *Legionella* spp.
- *Legionella pneumophila*
- *Legionella pneumophila* du sérotype 1

• Performance

- Hautement spécifique (systèmes validés avec **430 souches**)
- Reproductible et juste
- Excellents résultats aux essais interlaboratoires

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

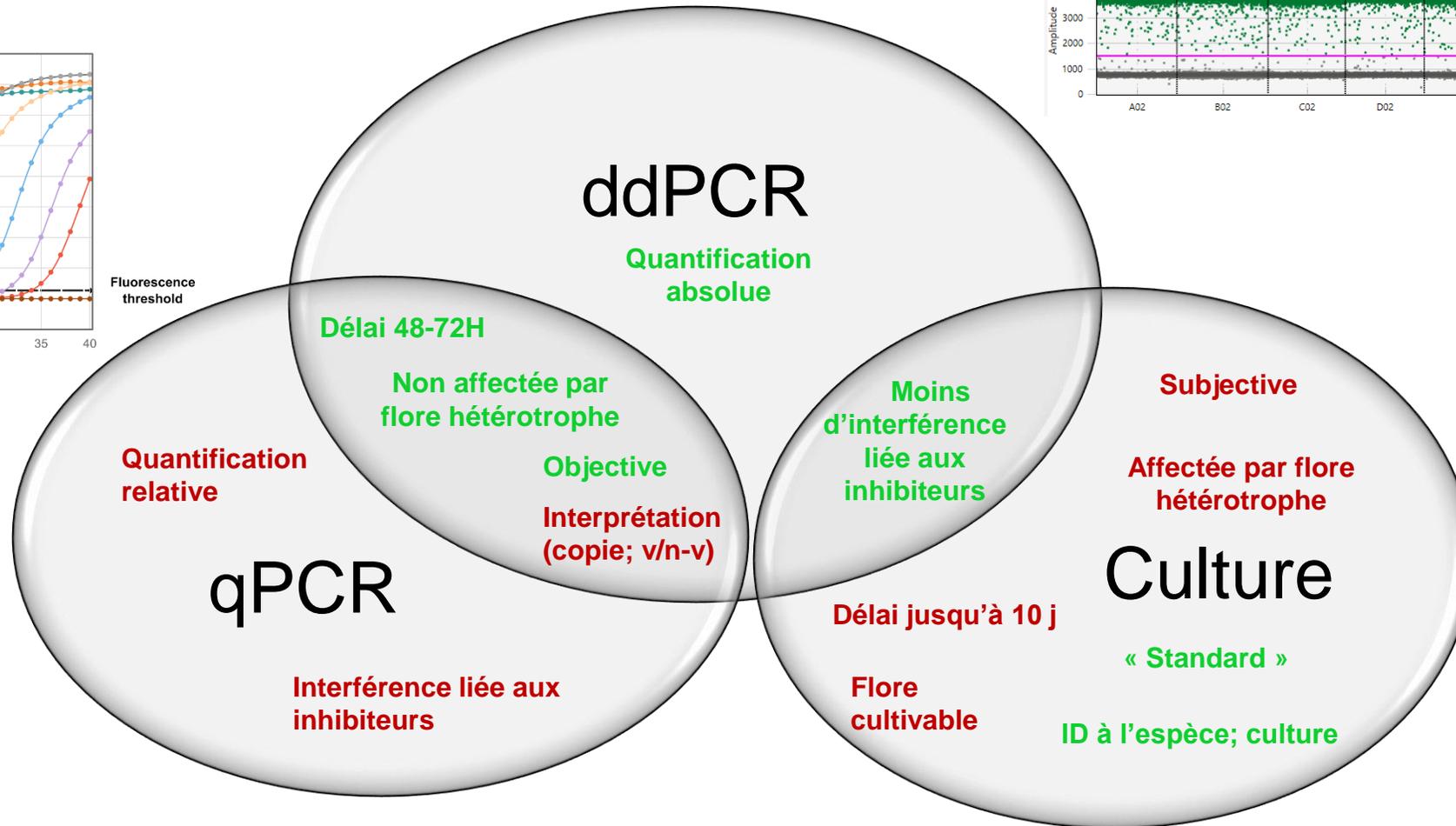
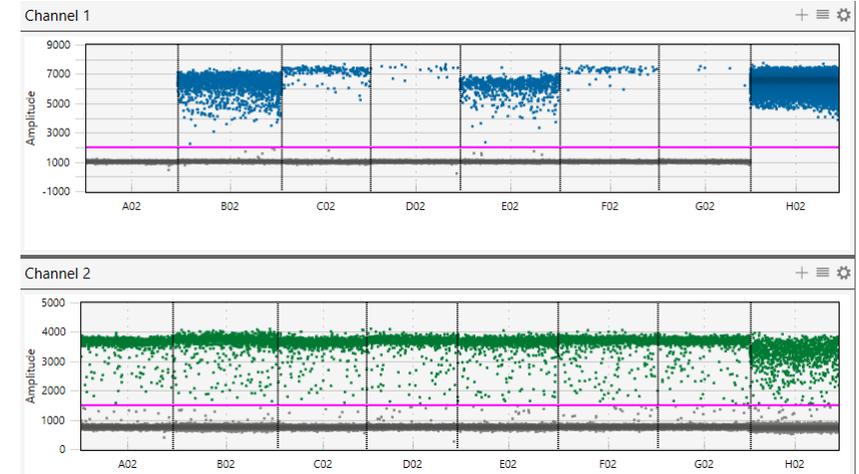
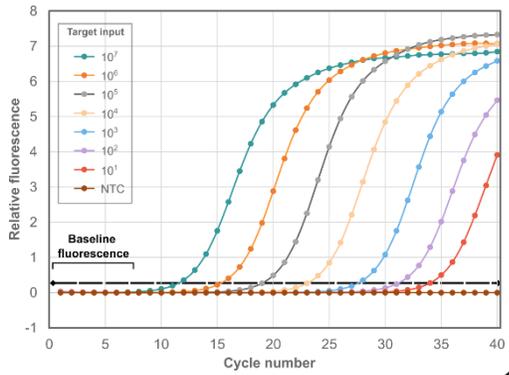
Thi Thanh Tam Nguyen, technicienne de laboratoire, Direction des laboratoires, IRSST

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

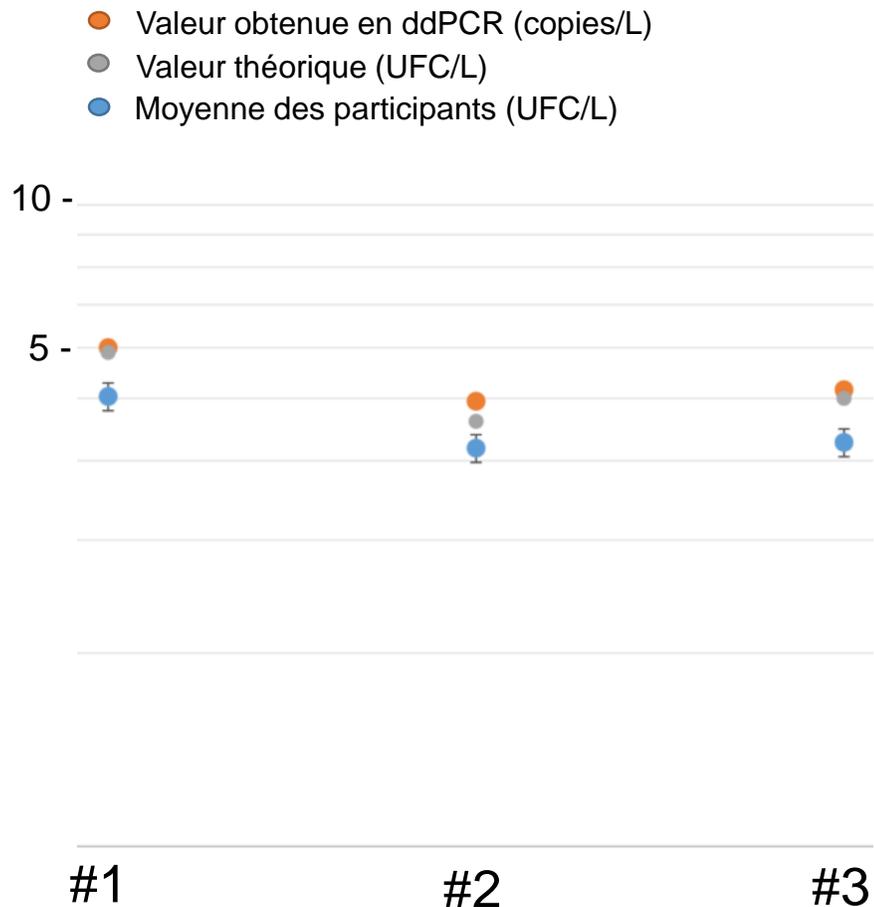
MÉTHODES DE
LABORATOIRES

MA-410

Comparaisons



Comparaisons



**Échantillons
d'essais
interlaboratoire
standardisés**

↓

**Environ 1 log
au-dessus de la
concentration
moyenne
établie par
culture**

↓

**10X plus
sensible**

Par culture :

Sous-estimation de la concentration initiale



Mort cellulaire lors du transport



Manipulations du protocole de concentration de l'échantillon et de sa mise en culture



Biais de repiquage

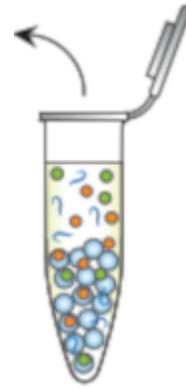
L'avantage IRSST

- Analyse par ddPCR (\$) < Analyse par culture (\$\$)
- Possibilité d'offrir un service combiné personnalisé (ddPCR-Culture) dans un même dossier

En culture, ce qui est difficile, c'est de confirmer un négatif.

Le travail se poursuit...

- Nouvelle cible prochainement disponible : *Legionella longbeachae*
- Discrimination de la portion viable/non-viable (v-ddPCR)



Remerciements

Audrey Bernèche-D'Amours

Nancy Lacombe

Tam Nguyen

Julien Trépanier

Alberto Morales

Geneviève Marchand

risquesbio@irsst.qc.ca

Merci!