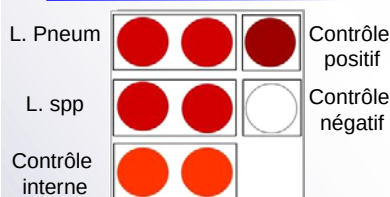


Sécurisation de Tours Aéroréfrigérantes (TAR) : Suivi moléculaire par macroarray

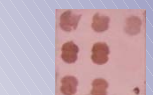
Objectif

La méthode moléculaire par macroarray a pour but de venir en appui de la méthode rapide par ATP. En effet, elle consiste en la détection de la présence spécifique du genre *Legionella* et/ou de l'espèce *pneumophila* à partir d'un même système. La détection d'un témoin en même temps permet d'éviter des faux positifs. La technique est basée sur l'amplification, l'hybridation et la révélation d'ADN spécifique de *Legionella spp* et/ou *Legionella pneumophila* en une demi-journée, permettant de valider les alertes émises après mesures aspécifiques.

Description du système



L'outil de détection est constitué d'une membrane de nylon d'environ 1cm² sur laquelle différentes séquences d'ADN (sondes) sont fixées, respectivement caractéristique du genre *Legionella*, de l'espèce *L. pneumophila*, d'un contrôle interne et de contrôle positifs et négatifs.



Positif *L. spp.*
et *L. pneum.*

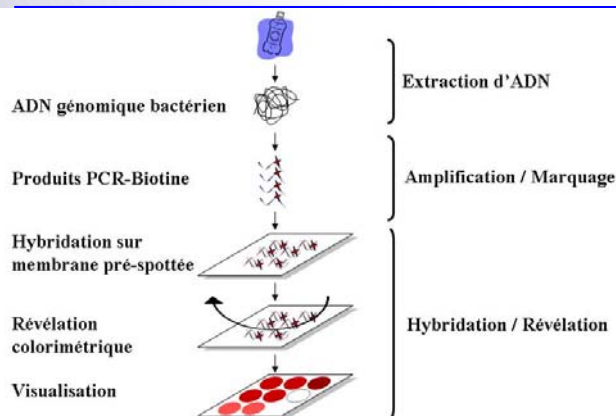


Positif *L. spp.*
Négatif *L. pneum.*



Négatif *L. spp.*
et *L. pneum.*

Protocole



- Filtration (0,45µm) de 1L d'eau suivie d'une extraction de l'ADN bactérien retenu sur le filtre (permettant une préconcentration)
- Amplification spécifique de l'ADN: gènes *dnaJ* (*Legionella pneumophila*) et gène codant pour l'ADNr 16S (*Legionella spp.*) en même temps qu'un contrôle interne d'amplification.
- Hybridation sur membranes sur lesquelles des sondes ont été préalablement accrochées. Les amplifias complémentaires des sondes, se fixent spécifiquement sur ces dernières. Les produits amplifiés peuvent ainsi être détectés de façon colorimétrique à l'aide d'un complexe enzymatique.

Analyse du Macroarray

- Pour chaque analyse, une gamme étalon est réalisée par l'amplification, le marquage et la révélation par macroarray de solution étalon d'ADN de *L. pneumophila* : 0,005 pg, 0,05 pg, 0,5 pg, 5 pg et 50 pg ; correspondant à 13,5 UG.l⁻¹, 135 UG.l⁻¹, 1350 UG.l⁻¹, 13500 UG.l⁻¹, 135000 UG.l⁻¹ (UG = Unité Génome). Les trois gènes cibles sont ainsi étalonnés.
- Les intensités obtenues pour chaque échantillon sont analysées par rapport aux valeurs des courbes étalons.
- Le tableau suivant récapitule les situations possibles et les interprétations effectuées

<i>L. Pneumo et L.spp</i>	++++	++	+		—	
Contrôle interne	+	+	++++	+	++++	++ ;+ ; —
Interprétation	>135000*d	Quantification Possible	< 13,5*d	Inhibition	Négatif	Inhibition

++++ : Signaux > gamme ; ++ : Signaux dans la gamme ; + : Signaux < gamme ; - : Pas de signal d : dilution

Conclusion

Grâce à cette technique les gestionnaires de TAR disposent d'un outil permettant de doser de manière rapide et spécifique le niveau de contamination d'une TAR en *Legionella spp.* et *L. pneumophila* entre 13,5UG l⁻¹ et 13500UG l⁻¹

Action Collective cofinancée par