

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Avril 2011

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

Caractéristiques détaillées
et pertinence de leur mise
en œuvre dans les eaux chaudes
sanitaires et les tours
aéroréfrigérantes

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Avril 2011

Édition scientifique

Maisons-Alfort, le 7 avril 2011,

Le directeur général

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à la saisine « Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau »

L'Anses a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'alimentation, de l'environnement et du travail et d'évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du Code de la santé publique).

1. PRESENTATION DE LA QUESTION POSEE

L'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset)¹ a été saisie le 29 juillet 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) afin de :

1. Décrire les méthodes pré-analytiques (préparation de l'échantillon avant analyse) et analytiques connues pour la détection et le dénombrement spécifique de légionelles dans l'eau (culture, biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction : PCR), immuno-détection, etc.). Cette description avait notamment pour finalité d'identifier les questions auxquelles répondent les méthodes et leurs limites théoriques. Elle devait être basée sur une recherche bibliographique ;

2. Etudier la pertinence (avantages et inconvénients) de la mise en œuvre de ces méthodes analytiques pour le contrôle sanitaire des eaux chaudes et le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, en fonction de leurs besoins et contraintes respectives :

- dans un premier temps, cette étude devait viser à analyser les avantages et inconvénients des différentes méthodes, notamment sur les questions des contraintes de faisabilité technique et des coûts ;
- dans un second temps, si des méthodes apportant une plus-value technique par rapport à la méthode par culture étaient mises en évidence, la pertinence de leur mise en œuvre dans le cadre des contrôles réglementaires devait être évaluée. S'agissant des méthodes identifiées, une réflexion pouvait notamment être menée concernant les seuils réglementaires et, le cas échéant, leur révision.

3. Si nécessaire, identifier les essais expérimentaux permettant de vérifier ou d'infirmer les hypothèses avancées concernant la pertinence des méthodes recensées, et le cas échéant le lancement des études nécessaires.

¹ L'Afsset et l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) ont fusionné pour donner naissance à l'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses), le 1^{er} juillet 2010.

2. CONTEXTE

L'incidence de la légionellose a diminué en France depuis 2006 pour se stabiliser aux alentours de 1200 cas déclarés par an (1206 cas enregistrés en 2009, BEH n°31-32 du 27 juillet 2010), grâce notamment à une meilleure identification des sources potentielles de contamination.

La surveillance environnementale de *Legionella* spp. ou de *Legionella pneumophila* est encadrée par la réglementation :

- elle est obligatoire :
 - dans les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques dans les établissements thermaux, une fois par mois aux points d'usage les plus sensibles (arrêté 19 juin 2000)¹ ;
 - dans les tours aérorefrigérantes, une fois par mois (en cas d'autorisation) ou tous les deux mois (en cas de déclaration) pendant la période de fonctionnement de l'installation (arrêtés du 13 décembre 2004)² ;
 - dans les réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées, les autres établissements sociaux et médico-sociaux, les hôtels, les résidences de tourisme, les campings et les établissements, pénitentiaires une fois par an aux points d'usage représentatifs (arrêté du 1^{er} février 2010)³ ;
- à compter du 1^{er} janvier 2012, l'arrêté du 1^{er} février 2010 la rend obligatoire dans les autres établissements recevant du public, une fois par an, aux points d'usage représentatifs des réseaux d'eau chaude sanitaire.

Cette réglementation impose l'utilisation de la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431 "Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés".

La DGS et la DGPR soulignent dans la lettre de saisine que la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431, présente certains inconvénients :

- le rendu des résultats définitifs nécessite un délai minimum de 8 jours après la mise en culture (des résultats intermédiaires pouvant cependant être rendus au bout de 3 à 5 jours). Ce délai peut poser des problèmes pour la gestion des installations concernées, notamment pour lever des mesures restrictives d'utilisation d'eau ;
- l'ensemble des différentes formes de *Legionella* potentiellement présentes dans l'eau n'est pas pris en compte par cette méthode. En effet elle ne permet de dénombrer que les *Legionella* libres, viables et cultivables, dans les échantillons d'eau.

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) » avec pour objectif de respecter les points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

¹ Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales

² Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous la rubrique n° 2921 Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air

Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921

³ Arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire

Ces problématiques relèvent des compétences du comité d'experts spécialisées (CES) « évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques ». L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau ». Les travaux ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Ce dernier en a adopté les conclusions le 25 février 2011.

Cette expertise est ainsi issue d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Le présent avis se fonde pour les aspects scientifiques sur le rapport final issu de cette expertise collective (Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau - Caractéristiques détaillées et pertinence de leur mise en œuvre dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aérorefrigérantes).

4. ARGUMENTAIRE

Afin de répondre à la saisine, l'expertise a pris en compte les éléments suivants.

4.1. Les espèces de *Legionella* responsables de légionelloses

A ce jour 58 espèces de bactéries du genre *Legionella* ont été identifiées. Ces espèces sont sub-divisées en sérogroupes (environ 70 sérogroupes actuellement connus). En France, *Legionella pneumophila* est responsable de 98 % des cas déclarés de légionellose qui ont fait l'objet d'une identification après un prélèvement pulmonaire⁴.

Des espèces autres que *Legionella pneumophila* peuvent cependant être à l'origine de légionelloses, en particulier chez les sujets dont l'immunité est compromise (patients à haut risque⁵). Les souches responsables de certains de ces cas ont pu être retrouvées dans des circuits d'eau chaude sanitaire utilisés par, ou à proximité du malade.

En revanche, la bibliographie ne met pas en évidence de cas de légionellose lié à une espèce autre que *Legionella pneumophila* qui soit imputable à une tour aérorefrigérante. Par ailleurs, les données françaises ne mettent pas en évidence de cas de légionellose déclarée, imputable à une *Legionella* d'une autre espèce que *pneumophila* et qui aurait pour origine la contamination d'une tour aérorefrigérante.

Néanmoins, il faut souligner la difficulté que présente l'identification de l'origine environnementale des cas de légionellose. En France, où le système de surveillance des légionelloses est très développé, cette origine reste cependant non identifiée dans 80% des cas.

Quoi qu'il en soit, d'un point de vue sanitaire, *Legionella pneumophila* apparaît comme l'espèce la plus pertinente à dénombrer aussi bien dans les circuits d'eau chaude sanitaire que dans les tours aérorefrigérantes.

4.2. Les bases sanitaires et techniques du choix des espèces de *Legionella* à dénombrer dans le cadre de la surveillance réglementaire

Les différents textes réglementaires qui encadrent la surveillance environnementale des *Legionella* rendent obligatoire le dénombrement de *Legionella pneumophila*, l'espèce la plus pertinente d'un point de vue sanitaire, à l'exception des deux arrêtés du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air

⁴ Prélèvement des sécrétions respiratoires.

⁵ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 : les patients dits « patients à haut risque » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours)

soumises à autorisation et déclaration, communément appelées tours aéroréfrigérantes. Ces deux arrêtés rendent obligatoire le dénombrement de *Legionella* spp., alors que ce choix n'est pas étayé d'un point de vue sanitaire.

D'un point de vue technique, le dénombrement de *Legionella* spp. peut néanmoins avoir une utilité pour les gestionnaires d'installations, notamment pour détecter des dysfonctionnements. Toutefois, cette question n'a pas fait l'objet d'une réflexion approfondie dans le cadre de la présente expertise.

4.3. Critères à prendre en compte pour évaluer une méthode de dénombrement de *Legionella*

La performance attendue d'une méthode de dénombrement de micro-organismes en routine est évaluée sur la base des critères communément admis suivants : sélectivité, spécificité, sensibilité, répétabilité, reproductibilité, justesse, fidélité, rendement. Dans le contexte particulier des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, des critères supplémentaires devront être pris en compte. Ces critères ont été répertoriés et hiérarchisés. Ils concernent :

- le dénombrement spécifique des *Legionella* (*Legionella* spp., *Legionella pneumophila*, *Legionella pneumophila* du sérotype 1, autres sérotypes, etc.) ;
- l'état physiologique des *Legionella* détectées ;
- l'interprétation des résultats ;
- les champs d'application des méthodes (types d'eau, etc.).

La liste détaillée et la hiérarchisation de ces critères sont présentées dans le rapport d'expertise et la note de synthèse associés à cet avis.

Le critère de coût est important à prendre en compte dans le choix d'une méthode analytique. Cependant, dans le cas présent, il doit être considéré comme moins prioritaire que la pertinence d'une méthode de dénombrement des légionelles dans l'eau pour assurer une surveillance sanitaire efficace des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes. Les coûts des méthodes plus particulièrement investiguées sont aujourd'hui du même ordre de grandeur mais sont par ailleurs susceptibles d'évoluer en fonction des développements à venir. Ce critère économique n'a donc pas été pris en compte dans le cadre de cette expertise et il pourra être évalué une fois l'efficacité des techniques bien documentée : caractéristiques intrinsèques et capacité à répondre aux besoins des utilisateurs en routine.

4.4. Les méthodes évaluées

L'analyse des avantages et inconvénients propres à chaque méthode a été réalisée au regard des critères évoqués dans le chapitre 4.3. Elle a été appliquée :

- aux étapes de prétraitement nécessaires : filtration, centrifugation, séparation immuno-magnétique.
- aux méthodes de dénombrement spécifiques de *Legionella* basées sur un principe unique :
 - croissance : culture, Direct Viable Count (DVC), etc. ;
 - amplification génique : PCR quantitative en temps réel (q-PCR), PCR Viable (v-PCR), etc. ;
 - affinité moléculaire (immuno-détection, hybridation *in situ* par molécules fluorescentes (FISH), etc. ;
- aux méthodes de dénombrement spécifiques de *Legionella* basées sur plusieurs principes : Immunological double-staining (IDS), culture-FISH, et à d'autres évolutions possibles (DVC-FISH, Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF), Chromatographie liquide haute pression en condition dénaturante (dHPLC) couplée à la PCR, Séparation immuno-magnétique (IMS) - ATP-métrie) ;

- aux techniques d'analyses complémentaires : analyse de la flore totale (culture, ATP-métrie), détection des amibes, analyse du biofilm, des aérosols.

Le détail de la description des méthodes figure dans le rapport d'expertise. De l'analyse des avantages et des inconvénients propres à chaque méthode, il ressort que les méthodes qui rassemblent le plus grand nombre d'avantages sont : la culture, la q-PCR et, pour autant qu'on puisse la juger compte tenu du peu d'exemples d'utilisation publiés, la v-PCR. Cependant ce criblage très factuel ne prend pas en compte les niveaux de développement respectifs, parfois très différents, de chacune des méthodes et leur adéquation à une application en routine.

4.5. Les méthodes pertinentes pour une utilisation en routine à court terme

Le choix d'une méthode de dénombrement ne peut se fonder seulement sur ses avantages et ses inconvénients intrinsèques. En effet, certains avantages identifiés à l'échelon expérimental peuvent être pris en défaut lorsque la méthode est confrontée aux réalités du terrain. Aussi, il apparaît important de prendre en compte le niveau de développement de la méthode : standardisation du protocole, confirmation de ses performances par différents laboratoires, application possible à différents types d'échantillons environnementaux, robustesse, existence de standards et d'étalons, etc.

Pour une application en routine dans le cadre de la surveillance réglementaire, il importe de disposer d'une méthode éprouvée, dont le protocole est validé par de nombreux laboratoires et sur un grand nombre d'échantillons. Actuellement, seules les méthodes de dénombrement des *Legionella* dans l'eau par culture (normes NF T90-431 et NF EN ISO 11731-2⁶) et par q-PCR (norme NF T90-471) offrent ces garanties, ces deux normes intégrant le prétraitement des échantillons. Les recommandations en vue d'une mise en œuvre à court terme dans un cadre réglementaire ne peuvent donc raisonnablement porter que sur la culture et la q-PCR.

D'autres méthodes semblent prometteuses mais elles demandent à être développées, stabilisées et testées à grande échelle, avant d'envisager leur application en routine.

4.6. Choix des critères d'interprétation des résultats selon les méthodes

L'utilisation d'une méthode analytique va de pair avec la définition de critères d'interprétation de ses résultats. Aussi, avant d'envisager l'utilisation d'une méthode de dénombrement de *Legionella*, dans le cadre de la surveillance sanitaire des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, il apparaît nécessaire de fixer des valeurs cibles au-delà desquelles des actions de gestion pourraient être envisagées.

A l'heure actuelle, ces valeurs cibles ne peuvent pas être basées sur les seules données épidémiologiques du fait :

- du peu de publications disponibles sur le sujet et des fortes incertitudes qu'elles mettent en évidence ;
- de la difficulté d'identification de l'origine environnementale des cas de légionellose (possible dans 20% des cas déclarés) ;
- du grand nombre de facteurs autres que la concentration en *Legionella pneumophila* dans l'eau des installations intervenant dans la survenue des légionelloses (météorologie, taille des gouttelettes produites par les installations, état de viabilité et de virulence des souches de *Legionella* présentes dans l'eau, etc.).

Aussi, la détermination des valeurs cibles doit se fonder sur une approche pragmatique, en exploitant les éléments disponibles.

⁶ Etant donné le peu d'exemples d'application de la norme NF EN ISO 11731-2 en France, les présentes recommandations sont essentiellement basées sur la norme NF T90-431.

4.6.1. Valeurs cibles pour la méthode par culture

En 2001, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a proposé des valeurs cibles, sur la base des connaissances scientifiques et des observations de terrain disponibles à la date de cette proposition. Les valeurs cibles proposées n'étaient pas fondées sur une dose-réponse⁷ chez l'homme.

Ces valeurs cibles ont été reprises dans la réglementation française.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Pour la population générale, la réglementation française en vigueur, fixe la **valeur cible en *L. pneumophila*** à 10^3 UFC/L.

Pour les patients à haut risque (immunodéprimés), la réglementation préconise de ne pas dépasser le seuil de détection de la méthode par culture (selon la norme NF T90-431).

Selon les données de la littérature, la concentration en *L. pneumophila* en dessous de laquelle le risque de légionellose est négligeable ou acceptable pour la population générale est comprise entre 10^4 ou 10^5 UFC/L dans les eaux chaudes sanitaires, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme.

L'examen de la bibliographie et les auditions d'acteurs du système de surveillance des *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires n'ont pas mis en évidence d'argument justifiant, d'un point de vue sanitaire, une modification de ces valeurs cibles.

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

La réglementation française en vigueur, concernant les **tours aéroréfrigérantes, fixe des valeurs cibles en *Legionella* spp.** :

- seuil d'acceptabilité de l'eau d'appoint : limite de quantification de la méthode normalisée utilisée ;
- seuil d'action pour l'eau de l'installation : 10^3 UFC/L ;
- seuil d'arrêt pour l'eau de l'installation : 10^5 UFC/L.

La littérature et les auditions d'acteurs du système de surveillance des tours aéroréfrigérantes mettent en évidence une difficulté d'interprétation des résultats liée au choix de la cible du dénombrement. En effet, l'espèce responsable de la plupart des cas de légionelloses déclarés étant *Legionella pneumophila*, il est difficile d'interpréter un dépassement de seuil en *Legionella* spp. d'un point de vue sanitaire. Ces valeurs doivent avant tout être considérées comme des valeurs de gestion.

4.6.2. Valeurs cibles pour la méthode par q-PCR

Le niveau de connaissance actuel ne permet pas d'établir une valeur cible de *L. pneumophila* à la q-PCR (en UG/L) sur les bases d'une dose réponse chez l'homme.

Cependant, les bénéfices sanitaires potentiels de l'utilisation de la q-PCR, du simple fait de la rapidité de sa mise en œuvre et de l'obtention de résultats spécifiques de *L. pneumophila*, incitent à mettre en place les outils permettant l'utilisation de cette technique en routine. En effet, dans de nombreux cas, elle permettrait de détecter et donc de gérer la contamination d'une installation beaucoup plus rapidement que la méthode par culture. Dans ce contexte, l'établissement de valeurs cibles est primordial.

Les seuls référentiels actuels sont les valeurs cibles déjà présentes dans la réglementation pour la méthode par culture. Les retours d'expérience liés à leur utilisation pour la surveillance des légionelles dans l'eau ne mettent pas en évidence la nécessité de les modifier. Il apparaît donc raisonnable de définir les valeurs cibles applicables à la q-PCR

⁷ Relation spécifique d'une voie entre des niveaux d'exposition à un agent dangereux et l'indice observé d'un effet donné.

de manière à ce que le taux de résultats supérieurs à ces valeurs cibles, obtenues avec une même série de prélèvement, soit équivalent pour la culture et pour la q-PCR.

Cependant les unités des différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* apparaissent hétérogènes et difficilement comparables : unités génomes/L (UG/L) pour les méthodes par biologie moléculaire et unités formant colonies/L (UFC/L) pour les méthodes par culture. En l'absence de données publiées, les valeurs proposées sont principalement basées sur les résultats de la surveillance des légionelles dans l'environnement, présentés par deux acteurs auditionnés.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Sur la base de ce raisonnement des valeurs cibles peuvent être élaborées pour les points d'usage à risque⁸ dans les établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque.

En ce qui concerne les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé, pour assurer une protection sanitaire maximale, il semble raisonnable de proposer des valeurs cibles égales au seuil de détection de la méthode.

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

L'établissement de valeurs cibles en *Legionella* spp., adaptées à la q-PCR, pourrait être envisagé sur la base du raisonnement développé ci-dessus.

Cependant, certains essais montrent une bien meilleure concordance relative entre les résultats obtenus par culture et par q-PCR pour le dénombrement de *L. pneumophila* que pour celui de *Legionella* spp. D'un point de vue analytique, il semble donc plus adapté de déterminer une valeur cible en *L. pneumophila* pour la q-PCR.

D'un point de vue sanitaire, l'établissement de valeurs cibles en *L. pneumophila* apparaît également plus pertinent.

Les valeurs réglementaires actuelles en *Legionella* spp. pourraient être considérées plus protectrices d'un point de vue sanitaire que les mêmes valeurs appliquées à *L. pneumophila*, dans la mesure où ces dernières font partie des *Legionella* spp. On rappellera néanmoins que :

- à ce jour, aucune autre espèce que *L. pneumophila* n'a pu être identifiée chez un patient atteint de légionellose, dont l'origine de la contamination ait été attribuée à une tour aéroréfrigérante ;
- la proportion de *L. pneumophila* parmi les *Legionella* spp. varie fortement dans le temps et il n'existe pas d'outil fiable permettant de la prévoir.

Aussi, il paraît fondé de proposer aujourd'hui des valeurs cibles en *L. pneumophila*, pour la surveillance sanitaire des tours aéroréfrigérantes, aussi bien pour la méthode par culture que pour la méthode par q-PCR.

Ce dispositif présente trois avantages importants :

- d'un point de vue sanitaire :
 - faciliter l'interprétation des résultats de surveillance ;
 - ouvrir la possibilité d'utiliser la q-PCR pour la surveillance des tours aéroréfrigérantes, pour bénéficier de la grande réactivité de cette technique, avec la possibilité de détecter une contamination beaucoup plus rapidement que ce n'est le cas actuellement ;

⁸ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

- du point de vue de la gestion des installations : le choix de dénombrer *L. pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes à la place de *Legionella* spp. permettrait :
 - o d'arrêter les installations uniquement pour une raison sanitaire. Le nombre d'arrêts de fonctionnement des tours aéroréfrigérantes sans fondement sanitaire s'en verrait significativement réduit ;
 - o de vérifier plus rapidement l'efficacité des actions correctives menées en cas d'arrêt d'une installation.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les conclusions et recommandations qui suivent sont basées sur les arguments développés dans le chapitre précédent. Pour autant, ces conclusions ne résultent pas d'une évaluation des risques sanitaires, ce qui n'était pas l'objet de la saisine.

5.1. Conclusions et recommandations à court terme

5.1.1. Choix d'une méthode applicable aux eaux chaudes sanitaires et aux eaux des tours aéroréfrigérantes

En situation de surveillance de routine, dans lesquels les délais de recueil des résultats d'analyse ne constituent pas un critère prioritaire, il est recommandé de laisser le choix au gestionnaire d'utiliser, **soit la méthode par culture, soit la méthode par q-PCR**. Ce choix pourra être fait selon l'accessibilité de la méthode d'analyse, la présence ou non d'inhibiteurs dans l'eau, la présence de flore interférente, etc. **En cas de dépassement des valeurs cibles réglementaires**, lorsque l'analyse aura été réalisée par q-PCR, il est préconisé une mise en culture de l'échantillon, afin de disposer de la souche dénombrée, en vue d'éventuelles analyses complémentaires.

En situation d'urgence sanitaire, en présence de **cas groupés de légionellose ou de cas nosocomial**, il est recommandé d'utiliser la **méthode qui fournira les résultats dans le temps le plus court**. La méthode de q-PCR semble appropriée dans ce cas, au regard de la rapidité d'obtention de ses résultats. Un dénombrement par q-PCR doit, dans ce cas, être complété par la mise en culture d'une partie des échantillons prélevés, afin de confronter les souches environnementales et cliniques lorsqu'elles sont disponibles. Au cas où la q-PCR ne serait pas disponible, la méthode par culture est préconisée. Elle devra inclure l'identification du sérotype en présence d'une légionellose à *L. pneumophila*, ou l'identification de l'espèce dans le cas d'une légionellose à *Legionella* spp.

5.1.2. Propositions de valeurs cibles

Les valeurs cibles proposées reposent sur un avis d'expert, en l'état actuel des connaissances. Elles sont proposées dans l'objectif d'améliorer le niveau de sécurité sanitaire.

Les valeurs cibles proposées pour la q-PCR nécessitent d'être consolidées durant une période probatoire, pendant laquelle une étude métrologique devrait être menée afin de comparer les résultats d'analyse obtenus avec les deux méthodes utilisées en parallèle portant sur un nombre suffisant d'échantillons.

Les valeurs proposées sont propres à chaque méthode. Elles visent cependant à atteindre les mêmes objectifs en termes de gestion des risques.

5.1.2.1. Eaux chaudes sanitaires

▪ En situation de surveillance de routine

Comme justifié précédemment, pour la surveillance des eaux chaudes sanitaires, l'agence propose des valeurs cibles en *L. pneumophila* (tableau 1).

Tableau 1 : synthèse des valeurs cibles en *L. pneumophila* proposées pour la qPCR, comparées aux valeurs réglementaires par culture

	Culture	q-PCR
Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque ⁹ dans des établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque ¹⁰ dans les établissements de santé	10 ³ UFC /L	5.10 ³ UG /L
Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé	Limite de détection	Limite de détection

D'un point de vue sanitaire, concernant les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque, il est recommandé en plus de la surveillance de *Legionella pneumophila*, de procéder à des analyses étendues au genre *Legionella* et à toutes autres bactéries pathogènes, quelle que soit la méthode analytique utilisée : culture ou q-PCR.

▪ En situation de surveillance après une décontamination

Le circulaire DGS 2002 / 243 du 22 avril 2002 requiert une vérification de l'efficacité d'une décontamination chimique ou thermique, par le dénombrement de *L. pneumophila* dans un échantillon prélevé quelques jours après le traitement. Le fascicule de documentation FD T90-522, "Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux" (2006), préconise de réaliser le prélèvement au minimum 48 heures après un traitement de décontamination choc, afin de minimiser les faux positifs (en q-PCR) et négatifs (en culture).

L'Anses souligne l'importance du respect de la préconisation ci-dessus pour obtenir des résultats de dénombrement de *Legionella* interprétables.

Le choix de la méthode de dénombrement la plus appropriée, culture ou q-PCR, peut être laissé à la discrétion du gestionnaire de l'installation. Dans le cas de la culture, comme dans celui de la q-PCR, la décontamination pourra être considérée suffisante si le résultat de l'analyse met en évidence un nombre de *L. pneumophila* inférieur ou égal à la valeur cible précédemment proposée (tableau 1). Dans le cas contraire, l'Anses recommande de nouvelles actions de gestion jusqu'à ce que les analyses fassent état de résultats inférieurs à cette valeur cible.

⁹ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

¹⁰ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours)

5.1.2.2. Eaux de tour aéroréfrigérante

▪ En situation de surveillance de routine

Comme justifié précédemment, pour la surveillance des tours aéroréfrigérantes, l'agence propose des valeurs cibles en *L. pneumophila* (tableau 2).

Tableau 2 : valeurs cibles en *L. pneumophila* proposées

	Culture	q-PCR
Eau d'appoint : valeur cible	Limite de quantification	Limite de quantification
Eau de l'installation :		
• valeur cible d'action	10 ³ UFC /L	5.10 ³ UG /L
• valeur cible d'arrêt	10 ⁵ UFC /L	5.10 ⁵ UG /L

D'un point de vue technique, le suivi de *Legionella* spp. peut présenter un intérêt pour les gestionnaires d'installation, notamment pour détecter des dysfonctionnements ou limiter les dérives de concentration en microorganismes, en particulier celles liées aux *Legionella* autres que *pneumophila*.

Par mesure de prudence, le remplacement éventuel des seuils réglementaires actuels, en *Legionella* spp., par les valeurs cibles proposées ci-dessus mériterait d'être subordonné à une évaluation de la pertinence des modalités de surveillance et de gestion des proliférations microbiennes dans les tours aéroréfrigérantes. L'opportunité du suivi spécifique de *Legionella* spp. parmi les paramètres de surveillance devrait être également considérée à cette occasion.

Une augmentation relative de 2 log ou plus de la concentration en *Legionella* spp. dans l'eau de l'installation par rapport à l'eau d'appoint, pourrait à titre d'exemple, constituer un indicateur de dysfonctionnement de la tour aéroréfrigérante. Le même principe de suivi d'une variation relative pourrait, par ailleurs, s'appliquer à d'autres indicateurs bactériens, plus généraux, tels que l'ATP-métrie.

▪ En situation de surveillance après une décontamination

En cas de décontamination d'une installation déjà à l'arrêt, suite à une contamination excessive ou un cas de légionellose, la réglementation recommande de rincer les circuits afin d'évacuer les bactéries présentes dans l'eau et, le cas échéant, les résidus de produits chimiques. Les procédures de désinfection spécifient que l'absence de résidus de désinfection doit être vérifiée après le rinçage.

Dans ces conditions, le dénombrement de *Legionella* sera peu perturbé par la présence de désinfectant (s'agissant de la méthode par culture) ou la présence de bactéries mortes (s'agissant de la méthode par q-PCR). Il est recommandé de laisser au gestionnaire le choix de la méthode (culture ou q-PCR).

5.1.3. Besoins d'études et de recherches

En ce qui concerne la q-PCR et la culture, il convient de mener une étude comparative sur différentes qualités d'eaux (Eaux chaudes sanitaires et tours aéroréfrigérantes), avec un grand nombre d'échantillons, afin de tester et le cas échéant d'affiner les valeurs cibles proposées dans le cadre de cette expertise.

5.2. Conclusions et recommandations à moyen et long termes

- De l'analyse des différentes méthodes, il ressort qu'actuellement, aucune des méthodes alternatives à la culture et à la q-PCR **ne répond à tous les besoins**

exprimés en lien avec les critères spécifiques détaillés dans le rapport d'expertise, pour le dénombrement de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes. Cependant, les principes et objectifs de certaines permettent d'envisager de repousser certaines des limites, il est donc important d'encourager leur développement :

- la q-PCR, la v-PCR, la culture, le FISH et l'IDS pourraient, sous certaines conditions, permettre une prise en compte des *Legionella* intra-amibiennes ou intra-vésiculaires dans la quantification ;
- la DVC, la v-PCR, l'IDS, le DVC-FISH ou la culture-FISH semblent permettre de détecter uniquement les bactéries viables ou de distinguer les bactéries viables et non viables ;
- la q-PCR, la v-PCR, l'immuno-détection, le FISH, et l'IDS pourraient permettre de détecter l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes ;
- la DVC, la q-PCR, la v-PCR, l'immuno-détection, le FISH, et l'IDS permettent une obtention relativement rapide des résultats d'analyse ;
- le délai d'obtention des résultats par culture pourrait être réduit par une optimisation des milieux de culture ;
- l'immuno-détection, le FISH, l'IDS, la q-PCR et la culture-FISH pourraient permettre d'améliorer la distinction et la quantification des sérogroupes de *L. pneumophila* autres que le séro groupe 1.

▪ **Besoins d'études et de recherches**

A titre indicatif et sans être exhaustif, l'agence suggère des pistes d'études et de recherches sur les thèmes suivants :

Pathogénicité et génomique

Améliorer les connaissances sur la pathogénicité des *Legionella* viables non cultivables ainsi que leur dose infectieuse et sur la détection et la pathogénicité des différents clones de *L. pneumophila* sg1 identifiés.

Prélèvement et échantillonnage

Développer des méthodes de prélèvement et d'échantillonnage applicables aux aérosols et aux biofilms.

Pré-traitement des échantillons

Développer et optimiser le pré-traitement des échantillons afin de l'adapter aux caractéristiques de la méthode de détection pourraient permettre d'améliorer le rendement du dénombrement de *Legionella*.

Développer des techniques de capture des bactéries par le biais d'anticorps spécifiques (séparation immuno-magnétique, etc.) dans le cas des eaux très chargées pour lesquelles le dénombrement reste problématique, quelque soit la méthode d'analyse.

Techniques analytiques

Etudier la sélectivité des différents milieux de culture vis-à-vis des différentes espèces et sous-types de *Legionella*.

Mettre au point de nouveaux milieux de culture plus adaptés à la croissance de la fraction non cultivable, pour améliorer la méthode par culture. Afin de rendre plus efficace la discrimination entre *Legionella* et la flore interférente, de nouveaux antibiotiques devront être développés.

S'agissant de la q-PCR, encourager les développements visant à limiter l'impact des inhibiteurs et à optimiser l'étape d'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

La v-PCR pourrait fournir des informations sur l'état de viabilité des bactéries. Des études visant à tester cette méthode sur des eaux environnementales sont nécessaires pour vérifier son potentiel.

L'hybridation moléculaire peut également contribuer à répondre au problème du dénombrement de *Legionella* dans des eaux très chargées. Elle est moins sensible aux inhibiteurs que l'amplification génique et permet par ailleurs de détecter aussi bien les cellules cultivables que les VBNC. Son développement est à encourager.

Outils utilisables sur site

Encourager le développement d'outils analytiques utilisables sur site afin de générer le plus rapidement possible des réponses permettant d'améliorer l'efficacité de la surveillance de la qualité des eaux des installations.

Matrices et écosystèmes

Les écosystèmes des légionelles sont encore mal caractérisés. Des études complémentaires sur les conditions environnementales permettraient de faire progresser les connaissances dans ce domaine.

Bien que l'eau soit la source principale de contamination, les aérosols sont la source principale de diffusion de *Legionella*. Le comportement des *Legionella* dans les aérosols est encore trop méconnu et requiert des études supplémentaires.

Des études portant sur les écosystèmes microbiens complexes permettraient de faire progresser les connaissances dans ce domaine et en particulier, l'étude des biofilms et de leur capacité à servir de réservoir aux *Legionella*.

Etudier la contribution des protozoaires au développement des *Legionella* dans les installations à risque.

Des études visant à comparer les stratégies de suivi des installations, au moyen de différentes méthodes de dénombrement, notamment la culture et la q-PCR, sont encouragées, pour optimiser les délais entre les traitements de décontamination et les prélèvements.

Interprétation des résultats

Mettre en œuvre des études comparatives prenant en compte les différentes méthodes dès que leur protocole est suffisamment standardisé.

Aspect économique

Lorsque plusieurs méthodes auront atteint un niveau de développement et de robustesse similaire, il semble pertinent d'introduire dans l'analyse le critère économique. Il sera alors envisageable d'évaluer le coût / bénéfice de leur utilisation, dans le contexte d'analyse de routine pour la surveillance des eaux chaudes sanitaires et des tours aérorefrigérantes. Pour cela, il conviendrait au-delà du simple coût analytique unitaire de disposer d'estimations complémentaires concernant notamment le coût sanitaire supplémentaire lié à la légionellose en cas de défaut de surveillance des installations.

Fait en six exemplaires,

Le Directeur général



Marc Mortureux

Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

Caractéristiques détaillées et pertinence de leur mise en œuvre dans les eaux
chaudes sanitaires et les tours aérorefrigérantes

Saisine : 2009-SA-330

Rapport

Comité d'expert spécialisé "Evaluation des risques liés aux eaux et aux agents
biologiques"

Groupe de travail "Méthode de détection et de dénombrement de *Legionella*
dans l'eau"

Version du 25/02/2011

Mots clés

Méthodes analytiques, dénombrement, *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Legionella* spp., eaux, eaux chaudes sanitaires, tours aérorefrigérantes, seuils.

Table des matières

Table des matières	3
Expertise collective : synthèse et conclusions	5
Présentation des intervenants	19
Abréviations et acronymes	23
Introduction	25
Contexte	25
Objet de la saisine	26
Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	26
1 Description et spécificités du genre <i>Legionella</i>	28
1.1 Caractéristiques générales.....	28
1.2 Association de <i>Legionella</i> avec d'autres composantes du milieu	28
1.2.1 Association avec les protozoaires	28
1.2.2 Association avec le biofilm	30
1.3 Mécanismes conduisant à la contraction d'une légionellose	31
1.4 Pertinence du dénombrement de <i>Legionella</i> versus détection	31
1.5 Pertinence de la recherche de <i>L. pneumophila</i> versus <i>L. spp</i>	32
1.6 Signification sanitaire de la présence de <i>Legionella</i> viables non cultivables	33
2 Définitions des paramètres de caractérisation et de choix des méthodes d'analyses	35
2.1 Paramètres de performances	35
2.1.1 Justesse.....	35
2.1.2 Fidélité	36
2.1.3 Sensibilité	37
2.1.4 Spécificité et sélectivité	38
2.1.5 Rendement	39
2.1.6 Linéarité.....	39
2.2 Autres paramètres de choix d'une méthode analytique	39
2.2.1 Rapidité.....	39
2.2.2 Champ d'application	39
2.2.3 Robustesse.....	40
2.2.4 Simplicité	40
3 Attentes relatives à une méthode de dénombrement de <i>Legionella</i> dans l'eau.....	41
4 Description des étapes de préparation et de prétraitement des échantillons préalables à un dénombrement de <i>Legionella</i>	43
4.1 Echantillonnage	43
4.2 Etape de concentration.....	43
4.2.1 Filtration	43
4.2.2 Centrifugation	44
4.2.3 Séparation immuno-magnétique (IMS)	45
5 Description des méthodes de dénombrement sélectives de <i>Legionella</i> utilisant un principe unique	46
5.1 Méthodes basées sur la croissance.....	46
5.1.1 Culture	46
5.1.2 Direct Viable Count (DVC).....	50
5.1.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur la croissance, peu ou pas testées pour rechercher <i>Legionella</i> dans l'eau	52
5.2 Méthodes basées sur l'amplification génique.....	53
5.2.1 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR)	53
5.2.2 PCR viable (v-PCR).....	58
5.2.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur l'amplification génique, peu ou pas testées pour rechercher <i>Legionella</i> dans l'eau	61
5.3 Méthodes basées sur l'affinité moléculaire	63
5.3.1 Immuno-détection	63
5.3.2 Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridation (FISH).....	66
5.3.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur l'affinité moléculaire, peu ou pas testées pour rechercher <i>Legionella</i> dans l'eau	68
6 Description des méthodes de dénombrement sélectif de <i>Legionella</i> utilisant plusieurs principes.....	70
6.1 Double marquage immunologique (IDS).....	70
6.2 Culture-FISH.....	72

Anses

6.3	Evolutions possibles des méthodes utilisant plusieurs principes, peu ou pas testées pour rechercher et identifier <i>Legionella</i> dans l'eau.....	74
6.3.1	DVC-FISH.....	74
6.3.2	Desorption-ionisation laser assistée par matrice (Spectrométrie de masse MALDI-TOF).....	74
6.3.3	La chromatographie liquide haute pression en condition dénaturante (dHPLC) couplée à la PCR.....	75
6.3.4	IMS - ATP-métrie.....	76
7	Analyses susceptibles d'apporter une information décisionnelle complémentaire.....	77
7.1	Recherche de flore totale.....	77
7.1.1	Culture.....	77
7.1.2	ATP-métrie.....	77
7.2	Recherche d'amibes.....	77
7.3	Analyse du biofilm.....	78
7.4	Analyse des aérosols.....	78
8	Comparaison des différentes méthodes.....	80
8.1	Critères d'équivalence de méthodes de dénombrement de microorganismes.....	80
8.2	Comparabilité des unités.....	81
8.3	Comparabilité des limites de détection et de quantification.....	82
8.4	Comparaison des méthodes en fonction des différents types d'eau.....	83
8.4.1	Eauxensemencées expérimentalement.....	83
8.4.2	Eaux environnementales.....	86
9	Réflexion sur la signification des résultats et des valeurs cibles.....	90
9.1	Eléments à prendre en compte dans l'interprétation des résultats des méthodes de dénombrement de <i>Legionella</i>	90
9.1.1	Conséquence de l'existence de <i>Legionella</i> viables non cultivables et non viables vis-à-vis des méthodes de dénombrement.....	90
9.1.2	Conséquence de l'association de <i>Legionella</i> avec les amibes.....	90
9.1.3	Conséquence de l'association de <i>Legionella</i> avec le biofilm.....	91
9.2	Seuils de gestion et mesures préconisées par la réglementation en vigueur.....	92
9.2.1	Cas général des eaux chaudes sanitaires.....	92
9.2.2	Cas des eaux chaudes sanitaires dans les établissements de santé.....	92
9.2.3	Cas des tours aéroréfrigérantes et autres installations à risque.....	93
9.3	Signification sanitaire des valeurs cibles actuelles.....	96
9.3.1	Cas général.....	96
9.3.2	Cas des eaux chaudes sanitaires.....	97
9.3.3	Cas des tours aéroréfrigérantes.....	97
9.4	Détermination de valeurs cibles pour les méthodes alternatives à la culture.....	97
9.4.1	Cas des eaux chaudes sanitaires.....	98
9.4.2	Cas des tours aéroréfrigérantes.....	98
10	Synthèse des éléments recueillis.....	99
10.1	Synthèse sur la base des éléments bibliographiques.....	99
10.2	Synthèse sur la base des auditions.....	103
11	Conclusions et recommandations.....	110
11.1	Conclusions et recommandations générales à court terme.....	110
11.2	Conclusions et recommandations à moyen et long termes.....	116
	Références bibliographiques.....	119
	Annexes.....	130
	Annexe 1 : Courrier de saisine de l'Afsset par la DGS et la DGPR sur les méthodes de détection des légionelles dans l'eau.....	130
	Annexe 2 : Textes réglementaires et législatifs relatifs aux <i>Legionella</i> ,.....	132
	Annexe 3 : Normes référencées dans le rapport.....	135
	Annexe 4 : Réglementation et guides internationaux.....	136
	Annexe 5 : Exemples de courriers de sollicitation utilisés pour préparer les auditions menées par le groupe de travail "Détection des légionelles dans l'eau".....	137
	Annexe 6 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine.....	140

Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

**Caractéristiques détaillées et pertinence de leur mise en œuvre dans les eaux
chaudes sanitaires et les tours aérorefrigérantes**

Saisine : 2009-SA-330

Synthèse et conclusions

**Comité d'expert spécialisé "évaluation des risques liés aux eaux et aux agents
biologiques"**

**Groupe de travail "Méthode de détection et de dénombrement de *Legionella*
dans l'eau"**

Version du 25/02/2011

1 Présentation de la question posée

L'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset)¹ a été saisie le 29 juillet 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de la prévention des risques (DGPR) afin de :

1. Décrire les méthodes pré-analytiques (préparation de l'échantillon avant analyse) et analytiques connues pour la détection et le dénombrement spécifique de légionelles dans l'eau (culture, biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction : PCR), immuno-détection, etc.). Cette description avait notamment pour finalité d'identifier les questions auxquelles répondent les méthodes et leurs limites théoriques. Elle devait être basée sur une recherche bibliographique ;

2. Etudier la pertinence (avantages et inconvénients) de la mise en œuvre de ces méthodes analytiques pour le contrôle sanitaire des eaux chaudes et le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, en fonction de leurs besoins et contraintes respectives :

- dans un premier temps, cette étude devait viser à analyser les avantages et inconvénients des différentes méthodes, notamment sur les questions des contraintes de faisabilité technique et des coûts ;
- dans un second temps, si des méthodes apportant une plus-value technique par rapport à la méthode par culture étaient mises en évidence, la pertinence de leur mise en œuvre dans le cadre des contrôles réglementaires devait être évaluée. S'agissant des méthodes identifiées, une réflexion pouvait notamment être menée concernant les seuils réglementaires et, le cas échéant, leur révision.

3. Si nécessaire, identifier les essais expérimentaux permettant de vérifier ou d'infirmer les hypothèses avancées concernant la pertinence des méthodes recensées, et le cas échéant le lancement des études nécessaires.

2 Contexte

L'incidence de la légionellose a diminué en France depuis 2006 pour se stabiliser aux alentours de 1200 cas déclarés par an (1206 cas enregistrés en 2009, BEH n°31-32 du 27 juillet 2010), grâce notamment à une meilleure identification des sources potentielles de contamination.

La surveillance environnementale de *Legionella* spp. ou de *Legionella pneumophila* est encadrée par la réglementation :

- elle est obligatoire :
 - dans les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques dans les établissements thermaux, une fois par mois aux points d'usage les plus sensibles (arrêté 19 juin 2000)¹ ;
 - dans les tours aéroréfrigérantes, une fois par mois ou tous les deux mois pendant la période de fonctionnement de l'installation (arrêtés du 13 décembre 2004)² ;
 - dans les réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées, les autres établissements sociaux et médico-sociaux, les hôtels, les résidences de tourisme, les campings et les établissements, pénitentiaires une fois par an aux points d'usage représentatifs (arrêté du 1^{er} février 2010)³ ;
- à compter du 1^{er} janvier 2012, l'arrêté du 1^{er} février 2010 la rend obligatoire dans les autres établissements recevant du public, une fois par an, aux points d'usage représentatifs des réseaux d'eau chaude sanitaire.

¹ Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales

² Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous la rubrique n° 2921 Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air

Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921

³ Arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire

Anses

Cette réglementation impose l'utilisation de la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431 "Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés".

La DGS et la DGPR soulignent dans la lettre de saisine que la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431, présente certains inconvénients :

- le rendu des résultats définitifs nécessite un délai minimum de 8 jours après la mise en culture (des résultats intermédiaires pouvant cependant être rendus au bout de 3 à 5 jours). Ce délai peut poser des problèmes pour la gestion des installations concernées, notamment pour lever des mesures restrictives d'utilisation d'eau ;
- l'ensemble des différentes formes de *Legionella* potentiellement présentes dans l'eau n'est pas pris en compte par cette méthode. En effet elle ne permet de dénombrer que les *Legionella* libres, viables et cultivables, dans les échantillons d'eau.

3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise a été menée conformément aux exigences de la norme NF X 50-110 relative à la qualité en expertise (AFNOR, 2003), avec l'appui du Comité d'expert spécialisé (CES) "évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques".

Un groupe de travail (GT) a été constitué en veillant notamment à la compétence et l'indépendance de ses membres. Le GT s'est réuni à 21 reprises entre le 15 février 2010 et le 14 octobre 2010. Sur la base d'une synthèse bibliographique produite par l'Afsset, le GT a poursuivi la collecte d'éléments bibliographiques, procédé à 7 auditions formelles⁴ et analysé l'ensemble des données collectées pour formuler ses conclusions et recommandations. Ces auditions ont permis de compléter les informations recueillies dans la bibliographie, en les comparant avec les tendances et hypothèses déjà publiées. Le rapport établit une distinction entre les éléments issus de la bibliographie et ceux issus des auditions.

Les travaux ont été soumis régulièrement au Comité d'experts spécialisé «Evaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques» pour avis et commentaires et adopté le 24 février 2011.

4 Argumentaire

Pour répondre aux objectifs de la saisine et du contrat d'expertise, le GT chargé de l'expertise a pris en compte les éléments suivants.

4.1 Les espèces de *Legionella* responsables de légionelloses

A ce jour 58 espèces de bactéries du genre *Legionella* ont été identifiées. Ces espèces sont subdivisées en sérogroupes (environ 70 sérogroupes actuellement connus). En France, *Legionella pneumophila* est responsable de 98 % des cas déclarés de légionellose qui ont fait l'objet d'une identification après un prélèvement pulmonaire⁵.

Des espèces autres que *Legionella pneumophila* peuvent cependant être à l'origine de légionelloses, en particulier chez les sujets dont l'immunité est compromise (patients à haut risque⁶). Les souches responsables de certains de ces cas ont pu être retrouvées dans des circuits d'eau chaude sanitaire utilisés par un malade, ou à proximité d'un malade.

En revanche, la bibliographie ne met pas en évidence de cas de légionellose lié à une espèce autre que *Legionella pneumophila* qui soit imputable à une tour aérorefrigérante. Par ailleurs, les données françaises ne mettent pas en évidence de cas de légionellose déclarée, imputable à une *Legionella* d'une autre espèce que *pneumophila* et qui aurait pour origine la contamination d'une tour aérorefrigérante.

⁴ Les 7 organismes auditionnés sont : l'Institut Pasteur Lille (IPL) santé environnement durable, Suez environnement, Veolia environnement, EDF, le président de la Commission T 90E de l'Afnor, l'Association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement (AGLAE) et des participants au projet européen Emile. Ces organismes ont été sélectionnés par le GT après en avoir contacté préalablement près de 45 pour évaluer la nécessité d'une audition

⁵ Prélèvement des sécrétions respiratoires.

⁶ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisonne pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisonne pendant plus de 5 jours)

Néanmoins, il faut souligner la difficulté que représente l'identification de l'origine environnementale des cas de légionellose. En France, où le système de surveillance des légionelloses est très développé, cette origine reste cependant non identifiée dans 80% des cas.

Quoi qu'il en soit, d'un point de vue sanitaire, *Legionella pneumophila* apparaît comme l'espèce la plus pertinente à dénombrer aussi bien dans les circuits d'eau chaude sanitaire que dans les tours aérorefrigérantes

4.2 Les bases sanitaires et techniques du choix des espèces de *Legionella* à dénombrer dans le cadre de la surveillance réglementaire

Les différents textes réglementaires qui encadrent la surveillance environnementale des *Legionella* rendent obligatoire le dénombrement de *Legionella pneumophila*, l'espèce la plus pertinente d'un point de vue sanitaire, à l'exception des deux arrêtés du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation et déclaration, communément appelées tours aérorefrigérantes. Ces deux arrêtés rendent obligatoire le dénombrement de *Legionella* spp., alors que ce choix n'est pas étayé d'un point de vue sanitaire.

D'un point de vue technique, le dénombrement de *Legionella* spp. peut néanmoins avoir une utilité pour les gestionnaires d'installations, notamment pour détecter des dysfonctionnements. Toutefois, cette question n'a pas fait l'objet d'une réflexion approfondie dans le cadre de la présente expertise.

4.3 Les critères à prendre en compte pour évaluer la pertinence d'une méthode de dénombrement de *Legionella*

Le GT a défini les critères de performance attendus d'une méthode de dénombrement de *Legionella* en routine, au premier rang desquels les spécifications techniques telles que : sélectivité, spécificité, sensibilité, répétabilité, reproductibilité, justesse, fidélité ou encore rendement. Cependant, la prise en compte d'autres critères est apparue également nécessaire pour évaluer la pertinence d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau dans les contextes particuliers des eaux chaudes sanitaires (ECS) et des tours aérorefrigérantes (TAR). Le tableau 1 présente les critères retenus dans le cadre de cette expertise, ainsi que le niveau d'importance relatif qui leur a été attribué, au regard de la problématique posée.

Tableau 1 : Pertinence, pour le contrôle sanitaire et la surveillance, des critères de sélection d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, dans les contextes du suivi des ECS, des TAR et des décontaminations.

	ECS	TAR	Décontamination
Critères relatifs aux cibles			
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i>	++++	++++	++++
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1	+++	+++	+/-
Distinction et quantification des sérogroupes autre que sg1	++	++	+/-
Quantification de l'ensemble des <i>Legionella species</i>	++	++	++
Identification des différentes espèces de <i>Legionella</i> présentes dans l'échantillon	+/-	+/-	+/-
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification	+++	+++	+++
Quantification sélective des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires	+/-	+/-	+/-
Critères relatifs à l'état physiologique des <i>Legionella</i> détectées			
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+++	+++	+++
Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes	+++	+++	+++
Critères relatifs au contexte pratique de mise en œuvre			
Rapidité des résultats (hors crise)	+++	+++	+++
Faisabilité, simplicité	++	++	++
Equipements nécessaires limités	++	++	++
Faibles coûts (global)	++	++	++
Temps technicien faible	++	++	++
Critères relatifs à l'interprétation des résultats			
Interprétation technique simple des résultats bruts	++	++	++
Interprétation pour le risque sanitaire disponible	+++	+++	+++
Critères relatifs aux champs d'application			
Applicable sur des échantillons d'eau chargée	++	++	+/-
Applicable sur des échantillons d'eau traitée	+++	+++	+++
Permet de disposer de souches pour des études complémentaires	++	++	++

++++ indispensable ; +++ priorité élevée ; ++ priorité modérée ; +/- peu ou pas pertinent

Le critère de coût est important à prendre en compte dans le choix d'une méthode analytique. Cependant, dans le cas présent, il doit être considéré comme moins prioritaire que la pertinence d'une méthode de dénombrement des légionelles dans l'eau pour assurer une surveillance sanitaire efficace des eaux chaudes sanitaires et des tours aérorefrigérantes. Les coûts des méthodes plus particulièrement investiguées sont aujourd'hui du même ordre de grandeur mais sont par ailleurs susceptibles d'évoluer en fonction des développements à venir. Ce critère économique n'a donc pas été pris en compte dans le cadre de cette expertise et il pourra être évalué une fois l'efficacité des techniques bien documentée : caractéristiques intrinsèques et capacité à répondre aux besoins des utilisateurs en routine.

4.4 Les méthodes évaluées

La réflexion a porté sur les caractéristiques techniques des méthodes qui ont été répertoriées par le groupe de travail, avec une description :

- des étapes de prétraitement : filtration, centrifugation, séparation immuno-magnétique ;
- des méthodes de dénombrement spécifiques de *Legionella* utilisant un principe unique :
 - o croissance : culture, Direct Viable Count (DVC), etc. ;
 - o amplification génique : q-PCR (PCR quantitative en temps réel), v-PCR (PCR Viable), etc. ;
 - o affinité moléculaire (immuno-détection, hybridation *in situ* fluorescente (FISH), etc. ;

Anses

- des méthodes de dénombrement spécifique de *Legionella* utilisant plusieurs principes : Immunological double-staining (IDS), culture-FISH, et à d'autres évolutions possibles (DVC-FISH, Desorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF), dHPLC, Séparation immuno-magnétique (IMS) - ATP-métrie) ;
- des analyses complémentaires : flore totale (culture, ATP-métrie), amibes, biofilm, aérosols.

Dans le rapport d'expertise, chaque description de méthode est assortie d'un tableau présentant les avantages et les inconvénients intrinsèques théoriques de la méthode, tels que définis en fonction, des critères listés et priorisés dans le tableau 1. Le tableau 2, présente ci-après une synthèse des résultats de cette analyse.

Tableau 2 : Avantages (+), inconvénients (-) ou critères non évalués (?) pour les différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* examinées par le groupe de travail, en regard des critères de sélection précédemment évalués comme de priorité élevée ou modérée.

Méthodes	Culture	DVC	q-PCR	v-PCR	Immuno-détection	FISH	IDS	Culture-FISH
Critères à priorité élevée								
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i>	+	?	+	+	+	+	+	+
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du sérotype 1	+	?	+	+	+	?	+	?
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification	-	?	+	+	-	?	?	-
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+	+	-	+	-	-	?	+
Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes	-	?	+	+	+	+	+	-
Rapidité des résultats	-	+	+	+	+	+	+	+
Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles	+	-	-	-	-	-	-	-
Applicable sur des échantillons d'eau traitée	+	?	+	+	?	?	?	+
Critères à priorité modérée								
Distinction et quantification des sérotypes Lp autre que sg1	+	?	?	?	+	-	+	+
Quantification de l'ensemble des <i>Legionella species</i>	+	?	+	+	+	+	?	+
Applicable sur des échantillons d'eau chargée	-	?	-	-	-	?	-	-
Faisabilité, simplicité	+	?	+	+	+	+	?	+
Equipements nécessaires faibles	+	?	+	+	-	+	-	+
Temps technicien faible	-	?	+	+	-	-	-	-
Interprétation technique simple des résultats bruts	+	?	+	+	+	+	+	+
Permet de disposer de souches pour des études complémentaires	+	?	-	-	?	-	?	+

4.5 Les méthodes pertinentes pour une utilisation en routine à court terme

Le choix d'une méthode de dénombrement ne peut se fonder seulement sur ses avantages et ses inconvénients intrinsèques. En effet, certains avantages identifiés à l'échelon expérimental peuvent être pris en défaut lorsque la méthode est confrontée aux réalités du terrain. Aussi, il apparaît important de prendre en compte le niveau de développement de la méthode : standardisation du protocole, confirmation de ses performances par différents laboratoires, application possible à différents types d'échantillons environnementaux, robustesse, existence de standards et d'étalons, etc.

Pour une application en routine dans le cadre de la surveillance réglementaire, il importe de disposer d'une méthode éprouvée, dont le protocole est validé par de nombreux laboratoires et sur un grand nombre d'échantillons. Actuellement, seules les méthodes de dénombrement des *Legionella* dans l'eau par culture (normes NF T90-431 et NF EN ISO 11731-2⁷) et par q-PCR (norme NF T90-471) offrent ces garanties, ces deux normes intégrant le prétraitement des échantillons. Les recommandations en vue d'une mise en œuvre à court terme dans un cadre réglementaire ne peuvent donc raisonnablement porter que sur la culture et la q-PCR.

⁷ Etant donné le peu d'exemples d'application de la norme NF EN ISO 11731-2 en France, les présentes recommandations sont essentiellement basées sur la norme NF T90-431.

D'autres méthodes semblent prometteuses mais elles demandent à être développées, stabilisées et testées à grande échelle, avant d'envisager leur application en routine.

4.6 Comparaison de méthodes recensées dans la bibliographie

Les études de comparaison des différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* répertoriées dans la bibliographie ont été examinées. Les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats issus des méthodes considérées ne sont souvent pas comparables. Toutefois, lorsqu'elles existent, des corrélations entre des résultats de dénombrement exprimés dans différentes unités, permettent d'alimenter la réflexion relative à l'élaboration de règles d'interprétation des méthodes alternatives à la culture. Pour l'analyse d'eaux environnementales, dont les qualités sont très variables, les différentes méthodes apparaissent rarement équivalentes. Néanmoins, les corrélations observées entre les résultats des méthodes comparées sont sensiblement meilleures, pour l'analyse d'eaux relativement peu chargées, comme les eaux de réseaux domestiques, que pour l'analyse d'eaux chargées, comme les eaux de tours aéroréfrigérantes.

4.7 Choix des critères d'interprétation des résultats selon les méthodes

L'utilisation d'une méthode analytique va de pair avec la définition de critères d'interprétation de ses résultats. Aussi, avant d'envisager l'utilisation d'une méthode de dénombrement de *Legionella*, dans le cadre de la surveillance sanitaire des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, il apparaît nécessaire de fixer des valeurs cibles au-delà desquelles des actions de gestion pourraient être envisagées.

A l'heure actuelle, ces valeurs cibles ne peuvent pas être basées sur les seules données épidémiologiques du fait :

- du peu de publications disponibles sur le sujet et des fortes incertitudes qu'elles mettent en évidence ;
- de la difficulté d'identification de l'origine environnementale des cas de légionellose (possible dans 20% des cas déclarés) ;
- du grand nombre de facteurs autres que la concentration en *Legionella pneumophila* dans l'eau des installations intervenant dans la survenue des légionelloses (météorologie, taille des gouttelettes produites par les installations, état de viabilité et de virulence des souches de *Legionella* présentes dans l'eau, etc.).

Aussi, la détermination des valeurs cibles doit se fonder sur une approche pragmatique, en exploitant les éléments disponibles.

4.7.1 Valeurs cibles pour la méthode par culture

En 2001, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a proposé des valeurs cibles, sur la base des connaissances scientifiques et des observations de terrain disponibles à la date de cette proposition. Les valeurs cibles proposées n'étaient pas fondées sur une dose-réponse⁸ chez l'homme.

Ces valeurs cibles ont été reprises dans la réglementation française.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Pour la population générale, la réglementation française en vigueur, fixe la **valeur cible en *L. pneumophila*** à 10³ UFC/L.

Pour les patients à haut risque (immunodéprimés), la réglementation préconise de ne pas dépasser le seuil de détection de la méthode par culture (selon la norme NF T90-431).

Selon les données de la littérature, la concentration en *L. pneumophila* en dessous de laquelle le risque de légionellose est négligeable ou acceptable pour la population générale est comprise entre 10⁴ ou 10⁵ UFC/L dans les eaux chaudes sanitaires, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme.

L'examen de la bibliographie et les auditions d'acteurs du système de surveillance des *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires n'ont pas mis en évidence d'argument justifiant, d'un point de vue sanitaire, une modification de ces valeurs cibles.

⁸ Relation spécifique d'une voie entre des niveaux d'exposition à un agent dangereux et l'indice observé d'un effet donné. Il existe très peu d'agents biologiques pour lesquels sont publiées des données « dose-réponse ».

Anses

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

La réglementation française en vigueur, concernant les **tours aéroréfrigérantes, fixe des valeurs cibles en *Legionella* spp.** :

- seuil d'acceptabilité de l'eau d'appoint : limite de quantification de la méthode normalisée utilisée ;
- seuil d'action pour l'eau de l'installation : 10^3 UFC/L ;
- seuil d'arrêt pour l'eau de l'installation : 10^5 UFC/L.

La littérature et les auditions d'acteurs du système de surveillance des tours aéroréfrigérantes mettent en évidence une difficulté d'interprétation des résultats liée au choix de la cible du dénombrement. En effet, l'espèce responsable de la plupart des cas de légionelloses déclarés étant *Legionella pneumophila*, il est difficile d'interpréter un dépassement de seuil en *Legionella* spp. d'un point de vue sanitaire. Ces valeurs doivent avant tout être considérées comme des valeurs de gestion.

4.7.2 Valeurs cibles pour la méthode par q-PCR

Le niveau de connaissance actuel ne permet pas d'établir une valeur cible de *L. pneumophila* à la q-PCR (en UG/L) sur les bases d'une dose réponse chez l'homme.

Cependant, les bénéfices sanitaires potentiels de l'utilisation de la q-PCR, du simple fait de la rapidité de sa mise en œuvre et de l'obtention de résultats spécifiques de *L. pneumophila*, incitent à mettre en place les outils permettant l'utilisation de cette technique en routine. En effet, dans de nombreux cas, elle permettrait de détecter et donc de gérer la contamination d'une installation beaucoup plus rapidement qu'avec la culture. Dans ce contexte, l'établissement de valeurs cibles est primordial.

Les seuls référentiels actuels sont les valeurs cibles déjà présentes dans la réglementation pour la méthode par culture. Les retours d'expérience liés à leur utilisation pour la surveillance des légionelles dans l'eau ne mettent pas en évidence la nécessité de les modifier. Il apparaît donc raisonnable de définir les valeurs cibles applicables à la q-PCR de manière à ce que le taux de résultats supérieurs à ces valeurs cibles, obtenus avec une même série de prélèvements, soit équivalent pour la culture et pour la q-PCR.

Cependant les unités des différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* apparaissent hétérogènes et difficilement comparables : unités génomes/L (UG/L) pour les méthodes par biologie moléculaire et unités formant colonies/L (UFC/L) pour les méthodes par culture. En l'absence de données publiées, les valeurs proposées sont principalement basées sur les résultats de la surveillance des légionelles dans l'environnement, présentés par deux acteurs auditionnés.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Sur la base de ce raisonnement des valeurs cibles peuvent être élaborées pour les points d'usage à risque⁹ dans les établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque.

En ce qui concerne les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé, pour assurer une protection sanitaire maximale, il semble raisonnable de proposer des valeurs cibles égales au seuil de détection de la méthode.

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

L'établissement de valeurs cibles en *Legionella* spp., adaptées à la q-PCR, pourrait être envisagé sur la base du raisonnement développé ci-dessus.

Cependant, certains essais montrent une bien meilleure concordance relative entre les résultats obtenus par culture et par q-PCR pour le dénombrement de *L. pneumophila* que pour celui de *Legionella* spp. D'un point de vue analytique, il semble donc plus adapté de déterminer une valeur cible en *L. pneumophila* pour la q-PCR.

D'un point de vue sanitaire, l'établissement de valeurs cibles en *L. pneumophila* apparaît également plus pertinent.

⁹ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

Anses

Les valeurs réglementaires actuelles en *Legionella* spp. pourraient être considérées plus protectrices d'un point de vue sanitaire que les mêmes valeurs appliquées à *L. pneumophila*, dans la mesure où ces dernières font partie des *Legionella* spp. On rappellera néanmoins que :

- à ce jour, aucune autre espèce que *L. pneumophila* n'a pu être identifiée chez un patient atteint de légionellose, dont l'origine de la contamination ait été attribuée à une tour aérorefrigérante ;
- la proportion de *L. pneumophila* parmi les *Legionella* spp. varie fortement dans le temps et il n'existe pas d'outil fiable permettant de la prévoir.

Aussi, il paraît fondé de proposer aujourd'hui des valeurs cibles en *L. pneumophila*, pour la surveillance sanitaire des tours aérorefrigérantes, aussi bien pour la méthode par culture que pour la méthode par q-PCR.

Ce dispositif présente quatre avantages importants :

- d'un point de vue sanitaire :
 - faciliter l'interprétation des résultats de surveillance ;
 - ouvrir la possibilité d'utiliser la q-PCR pour la surveillance des tours aérorefrigérantes, pour bénéficier de la grande réactivité de cette technique, avec la possibilité de détecter une contamination beaucoup plus rapidement que ce n'est le cas actuellement ;
- du point de vue de la gestion des installations : le choix de dénombrer *L. pneumophila* dans les tours aérorefrigérantes à la place de *Legionella* spp. permettrait :
 - d'arrêter les installations uniquement pour une raison sanitaire. Le nombre d'arrêts de fonctionnement des tours aérorefrigérantes sans fondement sanitaire s'en verrait significativement réduit ;
 - de vérifier plus rapidement l'efficacité des actions correctives menées en cas d'arrêt d'une installation.

5 Conclusions et recommandations

5.1 Conclusions et recommandations générales à court terme

Les conclusions et recommandations qui suivent sont basées sur les arguments développés dans le chapitre précédent. Pour autant, ces conclusions ne résultent pas d'une évaluation des risques sanitaires, ce qui n'était pas l'objet de la saisine.

5.1.1 Choix d'une méthode applicable aux eaux chaudes sanitaires et aux eaux des tours aérorefrigérantes

En situation de surveillance de routine, dans lesquels les délais ne constituent pas un critère prioritaire, il est recommandé de laisser le choix au gestionnaire d'utiliser, **soit la méthode par culture, soit la méthode par q-PCR**. Ce choix pourra être fait selon l'accessibilité de la méthode d'analyse, la présence ou non d'inhibiteurs dans l'eau, la présence de flore interférente, etc. **En cas de dépassement des valeurs cibles réglementaires**, lorsque l'analyse aura été réalisée par q-PCR, il est préconisé une mise en culture de l'échantillon, afin de disposer de la souche dénombrée, en vue d'éventuelles analyses complémentaires.

En situation d'urgence sanitaire, en présence de **cas groupés de légionellose ou de cas nosocomial**, il est recommandé d'utiliser la **méthode qui fournira les résultats dans le temps le plus court**. La méthode de q-PCR semble appropriée dans ce cas, au regard de la rapidité d'obtention de ses résultats. Un dénombrement par q-PCR doit, dans ce cas, être complété par la mise en culture d'une partie des échantillons prélevés, afin de confronter les souches environnementales et cliniques lorsqu'elles sont disponibles. Au cas où la q-PCR ne serait pas disponible, la méthode par culture est préconisée. Elle devra inclure l'identification du sérotype en présence d'une légionellose à *L. pneumophila*, ou l'identification de l'espèce dans le cas d'une légionellose à *Legionella* spp.

5.1.2 Propositions de valeurs cibles

Les valeurs cibles proposées ici reposent sur un avis d'expert en l'état actuel des connaissances. Elles sont proposées dans l'objectif d'améliorer le niveau de sécurité sanitaire.

Les valeurs cibles proposées pour la q-PCR nécessitent d'être consolidées durant une période probatoire, pendant laquelle une étude métrologique serait menée afin de comparer les résultats

Anses

d'analyse obtenus avec les deux méthodes utilisées en parallèle sur un nombre suffisant d'échantillons.

Les valeurs proposées ici sont propres à chaque méthode. Elles visent cependant à atteindre les mêmes objectifs en termes de gestion des risques.

5.1.2.1 Eaux chaudes sanitaires :

- En situation de surveillance de routine
- Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque¹⁰ dans des établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque¹¹ dans les établissements de santé :

Pour les résultats d'analyses obtenus par **culture**, aucune des données répertoriées ne permet de justifier une modification de la réglementation en vigueur en France concernant l'objectif de concentration en *L. pneumophila* à ne pas dépasser, soit **10³UFC /L**.

Pour les résultats obtenus par **q-PCR**, la valeur cible en *L. pneumophila* à ne pas dépasser est de **5.10³UG /L**.

Ces deux valeurs cibles sont indépendantes et ne sont pas *sensu stricto* équivalentes.

En cas de dépassement des valeurs cibles proposées et en fonction de la méthode de dénombrement choisie, des actions de gestion doivent être envisagées par le responsable de l'installation. Au cas où des résultats non satisfaisants¹² sont obtenus, il convient de rechercher l'origine de la contamination en confrontant les résultats d'analyse d'eau prélevée en différents points du réseau de distribution d'eau chaude. Il importe aussi de vérifier la concentration en *L. pneumophila* dans l'eau du réseau d'eau froide. Le taux de points conformes et la localisation des points non-conformes peuvent également apporter des informations utiles au gestionnaire de l'installation. Les mesures de gestion de la qualité des eaux incluent outre la désinfection, des améliorations à envisager telles que la suppression de bras morts, et de points de soutirage non utilisés ou l'équilibrage du débit. Dans tous les cas, une vérification de l'efficacité des mesures de gestion choisies sera indispensable.

La gestion technique des installations d'eau chaude sanitaire peut permettre de détecter, voire d'anticiper des dysfonctionnements. Elle peut être réalisée par le dénombrement de *Legionella* spp comme par des indicateurs beaucoup plus simples, tels qu'un suivi rigoureux de température basé sur un nombre suffisant de points de mesure.

- Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé :

Selon la réglementation en vigueur en France, (Arrêté du 1er février 2010¹³) l'objectif de concentration en *L. pneumophila* à ne pas dépasser est le seuil de détection de la méthode par culture¹⁴. Le groupe de travail préconise de conserver cet objectif pour les résultats de surveillance obtenus par culture et recommande d'appliquer ce même objectif de non dépassement du seuil de détection de la méthode utilisée, aux résultats obtenus par q-PCR¹⁵.

Concernant les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque, il convient, en plus de la surveillance vis-à-vis de *Legionella pneumophila*, de procéder à une analyse de risque étendue au genre *Legionella* et à toutes autres bactéries pathogènes..

- En situation de surveillance après une décontamination

¹⁰ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

¹¹ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours)

¹² Dépassement des seuils de gestion fixés

¹³ Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire

¹⁴ 50 UFC /L

¹⁵ Selon la norme NF T90-471, le seuil de détection de la méthode par q-PCR est variable en fonction des éventuelles dilutions appliquées à l'échantillon en présence d'inhibiteurs. Il est important que les dilutions éventuelles n'impactent pas la valeur cible.

Anses

Après une décontamination chimique ou thermique, il est nécessaire de vérifier son efficacité en dénombrant *L. pneumophila* dans un échantillon prélevé quelques jours après le traitement (circulaire DGS 2002 / 243 du 22 avril 2002). Le fascicule de documentation FD T90-522, "Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux" (2006), préconise de réaliser le prélèvement au minimum 48 heures après un traitement de décontamination choc. Ce délai est notamment prévu pour permettre le renouvellement de l'eau dans le réseau et l'élimination des éventuelles bactéries mortes. En termes d'impact sur les résultats des méthodes, les risques de dénombrement de fortes proportions de bactéries mortes, par q-PCR, ou de non dénombrement de fortes proportions de bactéries viables mais non cultivables (VBNC) par culture sont limités. De surcroît, dans le cas d'un traitement de l'eau par un désinfectant chloré, il est nécessaire de traiter l'échantillon d'eau par du thiosulfate de sodium pour neutraliser le chlore. Dans ce cas, le risque d'inhibition par le chlore de la croissance des bactéries sur les milieux de culture et donc le risque de faux négatifs, sont limités.

Le choix de la méthode la plus appropriée (culture ou q-PCR) peut être laissé à la discrétion du gestionnaire de l'installation. Dans le cas de la culture, comme dans celui de la q-PCR, la décontamination peut être considérée suffisante si le résultat de l'analyse met en évidence un nombre de *L. pneumophila* inférieur ou égal à la valeur cible précédemment proposée. Dans le cas contraire, une nouvelle action de gestion doit être envisagée jusqu'à ce que les analyses fassent état de résultats inférieurs à cette valeur cible.

5.1.2.2 Eaux de tour aéroréfrigérante :

- En situation de suivi de routine

Actuellement, dans un contexte sanitaire, les seuils relatifs aux tours aéroréfrigérantes fixés par la réglementation française concernant *Legionella* spp. Le **groupe de travail propose de ne plus rechercher *Legionella* spp., mais seulement *L. pneumophila***. Les valeurs cibles en *L. pneumophila* préconisées sont les suivantes :

Résultats obtenus par culture :

- **valeur à ne pas dépasser pour l'eau d'appoint : 250 UFC/L** (limite de quantification de la méthode) ;
- **valeur cible d'action** pour l'eau de l'installation : **10³ UFC /L** ;
- **valeur cible d'arrêt** pour l'eau de l'installation : **10⁵ UFC /L**.

Résultats obtenus par q-PCR :

- **valeur à ne pas dépasser pour l'eau d'appoint : limite de quantification** de la méthode (limite variable) ;
- **valeur cible d'action** pour l'eau de l'installation : **5.10³ UG /L** ;
- **valeur cible d'arrêt** pour l'eau de l'installation : **5.10⁵ UG /L**.

Les valeurs cibles proposées pour la culture et pour la q-PCR sont indépendantes et ne sont pas *sensu stricto* équivalentes.

Par ailleurs, une augmentation relative significative de la teneur en *Legionella* spp. par rapport à l'eau d'appoint (2 log ou plus) pourrait constituer un indicateur de dysfonctionnement de la tour aéroréfrigérante. Le même principe pourrait par ailleurs s'appliquer à d'autres indicateurs bactériens, tels que l'ATP-métrie.

- En situation de surveillance après une décontamination

En cas de traitement de décontamination d'une installation à l'arrêt, par suite d'une contamination excessive ou d'un cas de légionellose, il est nécessaire de rincer les circuits afin d'évacuer les bactéries présentes dans l'eau et le cas échéant les résidus de produits chimiques. Les procédures de désinfection spécifient que l'absence de résidus de désinfection doit être vérifiée après le rinçage. Ainsi, le risque de voir un dénombrement perturbé par la présence de désinfectant (pour la méthode par culture) ou la présence de bactéries mortes (pour la méthode par q-PCR), est diminué. Il est donc recommandé de laisser la possibilité d'utiliser la méthode par culture ou la méthode par q-PCR. Il convient cependant de mettre les résultats à disposition du gestionnaire le plus rapidement possible (q-PCR ou culture selon les contextes locaux). L'interprétation des résultats devra prendre en compte les performances analytiques et la particularité des méthodes utilisées.

Selon la réglementation en vigueur, dans le cadre du suivi de décontamination, en cas de dépassement du seuil d'action, il est nécessaire de dénombrer *L. pneumophila* dans un échantillon prélevé au maximum deux semaines après le traitement. En cas de dépassement du seuil d'arrêt, la

réglementation demande un prélèvement de contrôle 48h après la remise en service (Arrêté du 13 décembre 2004). La décontamination est suffisante si le résultat de l'analyse met en évidence un nombre de *L. pneumophila* inférieur aux seuils d'action.

En cas de contaminations récurrentes d'un même site, il convient de réaliser des investigations complémentaires incluant la conception hydraulique des installations, la présence de biofilms ainsi que celle de protozoaires.

5.1.3 Besoins d'études et de recherches

L'absence de **critères d'interprétation des résultats** du point de vue sanitaire, quelles que soient les méthodes alternatives à la culture, tient principalement au manque de données analytiques obtenues par ces différentes méthodes. A court terme, il est nécessaire d'affiner les critères d'interprétation des résultats retenus pour la q-PCR. A moyen ou long terme, il convient d'élaborer des critères pour les autres méthodes qui atteindront un niveau de développement suffisant.

5.2 Conclusions et recommandations à moyen et long termes

Des critères de choix des méthodes ont été définis, discutés et hiérarchisés dans le tableau 1 "Pertinence, pour le contrôle sanitaire et la surveillance, des critères de sélection d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, dans les contextes du suivi des ECS, des TAR et des décontaminations".

Les méthodes actuelles ne répondent pas à tous les besoins exprimés. Les deux méthodes normalisées (culture et q-PCR) qui font l'objet des recommandations à court terme présentent des limites largement évoquées dans le rapport. **Des informations supplémentaires sont potentiellement apportées par certaines méthodes alternatives, sous réserve de développements et d'évaluations *in situ***

Aucune des méthodes alternatives de dénombrement de *Legionella* décrites dans le rapport ne semble pouvoir satisfaire à l'ensemble des attentes identifiées par les experts. Cependant, les principes et objectifs de certaines méthodes décrites permettent d'envisager de repousser certaines des limites et il est important d'encourager leur développement.

Les méthodes par q-PCR, v-PCR, culture, FISH et IDS, pourraient sous certaines conditions, permettre une prise en compte des *Legionella* intra-amibiennes ou intra-vésiculaires dans la quantification.

Les méthodes de dénombrement par DVC, v-PCR, IDS, DVC-FISH ou culture-FISH semblent permettre de détecter uniquement les bactéries viables ou de distinguer les bactéries viables et non viables.

Les méthodes de dénombrement par q-PCR, v-PCR, immuno-détection, FISH, et IDS permettent théoriquement de détecter l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes.

Les méthodes de dénombrement par DVC, q-PCR, v-PCR, immuno-détection, FISH, et IDS permettent une obtention relativement rapide des résultats d'analyse.

Des améliorations des milieux utilisés pour les méthodes de dénombrement par culture pourraient également permettre une réduction du temps d'obtention des résultats de ces méthodes.

Les méthodes de dénombrement par immuno-détection, FISH, IDS, q-PCR et culture-FISH permettent théoriquement d'améliorer la distinction et la quantification des sérogroupes de *L. pneumophila* autres que le séro groupe 1.

Besoins d'études et de recherches

Les experts ont mis en évidence des **manques de connaissances qui pourraient justifier la réalisation d'études ou d'essais expérimentaux**. A titre indicatif, et sans être exhaustif, quelques pistes d'études et de recherches sont proposées.

Pathogénicité et génomique

Il semble opportun de mener des recherches pour améliorer les connaissances sur les *Legionella* pathogènes, notamment des différents clones de *L. pneumophila* sg1 déjà identifiés en pathologie humaine et leur détection. De même, des recherches pourraient être menées pour améliorer les connaissances sur la notion de dose infectieuse ainsi que sur la pathogénicité des *Legionella* viables non cultivables.

Echantillonnage

Le prélèvement et l'échantillonnage constituent un enjeu fort des futurs travaux de développements. En effet, dans ces deux cas, les méthodes analytiques applicables à l'eau sont utilisables en l'état, à condition d'arriver à disposer d'un échantillon représentatif. Aussi, il convient d'encourager le **développement de méthodes de prélèvement et d'échantillonnage applicables aux aérosols et biofilms**.

Prétraitement des échantillons

Le développement et l'optimisation des prétraitements des échantillons, pour adapter leurs caractéristiques aux méthodes de détection déjà utilisées ou en cours de développement, pourraient permettre d'améliorer les rendements globaux des dénombrements de *Legionella*.

L'analyse des eaux très chargées, reste problématique pour l'ensemble des méthodes utilisées. **La capture des bactéries par le biais d'anticorps spécifiques** (séparation immuno-magnétique, etc.) est, dans ce domaine, une piste intéressante qui demande à être développée.

Techniques analytiques

Chaque méthode étudiée possède ses points faibles, que les développements ultérieurs devront s'attacher à atténuer.

Ainsi, il s'agit de s'assurer que les milieux sélectifs utilisés en culture présentent une sélectivité équivalente en termes de dénombrement pour les différentes espèces et sous-types de *Legionella*.

Par ailleurs, **la mise au point de nouveaux milieux de cultures plus adaptés**, en particulier permettant la croissance de la fraction actuellement non cultivable, est sans nul doute une voie d'amélioration de la méthode par culture. Il convient également d'évaluer l'efficacité de nouveaux antibiotiques, différents de ceux actuellement utilisés dans le milieu Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide (GVPC), afin de rendre plus efficace la discrimination entre *Legionella* et flore interférente.

La q-PCR pourrait également faire l'objet d'améliorations. Des développements visant à limiter l'impact des inhibiteurs et à optimiser l'étape d'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) semblent une voie d'amélioration intéressante.

La v-PCR semble fournir une information sur l'état de viabilité des bactéries. Des études visant à tester cette méthode sur des eaux environnementales sont cependant encore nécessaires pour vérifier son potentiel.

L'hybridation moléculaire, peut également contribuer à répondre au problème du dénombrement de *Legionella* dans des eaux très chargées. Elle est moins sensible aux inhibiteurs que l'amplification génique et est par ailleurs capable de détecter aussi bien les cellules cultivables que les VBNC.

Le développement de kits prêts à l'emploi, basés sur les différents principes déjà évoqués semble également une voie d'amélioration prometteuse.

Outils utilisables sur site

Une demande a été fortement exprimée lors des auditions par différents acteurs. Elle concerne un besoin de **développement d'outils utilisables sur site** afin de générer le plus rapidement possible, directement sur les lieux d'installation, des réponses non ambiguës permettant d'améliorer l'efficacité de la surveillance de la qualité des eaux.

Matrices et écosystèmes

Les écosystèmes des légionelles sont encore mal caractérisés. Des études complémentaires sur les conditions environnementales permettraient de faire progresser les connaissances dans ce domaine.

Bien que l'eau soit la source principale de contamination, les aérosols sont sa source principale de diffusion. Leur comportement et constitution sont encore trop méconnus et requièrent des études supplémentaires.

Une lacune dans la connaissance des écosystèmes microbiens complexes, en particulier des **biofilms** et de leur capacité à servir de réservoir aux *Legionella* a été mise en évidence. Cette lacune impacte de façon dommageable les possibilités de contrôle et il est préconisé de la combler.

Le suivi des **protozoaires** (amibes et ciliés) dans les installations et leur contribution à la dangerosité des installations à risque est trop largement négligé. Une maîtrise complète du risque ne pourra être

Anses

envisagée sur le long terme que si ces deux paramètres sont pris en compte et un **effort sensible de la recherche dans ces deux domaines** est préconisé.

Des études **comparant les stratégies de suivi des installations mettant en œuvre les différentes méthodes** de dénombrement disponibles, en commençant par la culture et la q-PCR, pourraient être proposées, notamment en cas de décontamination, pour optimiser les délais entre traitements et prélèvements en fonction des méthodes.

Enfin, il semble important que le développement des futurs réseaux intègre la problématique des *Legionella* et anticipe autant que possible les problèmes hydrauliques à l'origine de développement bactérien.

Interprétation des résultats

Le manque de cohérence des essais comparatifs mettant en œuvre les différentes technologies justifie de **mettre en œuvre des essais à grande échelle s'agissant des méthodes non encore rodées. Ces essais permettront d'aboutir à terme à une standardisation des protocoles**, voire à leur normalisation et de disposer de données suffisantes pour pouvoir les comparer.

Le Comité d'expert spécialisé « Eaux et agents biologique » adopte le rapport d'expertise associé à cette synthèse et valide cette dernière, le 25 février 2011.

Maisons-Alfort, le 1^{er} mars 2011,

Au nom des experts du CES « Eaux et agents biologique »,

Madame la présidente du CES

Sylvie Rauzy



Anses

Présentation des intervenants

Groupe de travail «Dénombrement des légionelles dans l'eau»

Président :

M. Claude-Olivier SARDE : Enseignant chercheur à l'Université de Technologie de Compiègne

Membres :

M. Pierre ABASQ : Responsable du laboratoire de microbiologie Environnement Santé de l'IDAC (Nantes).

Mme Séverine ALLEGRA : Enseignant chercheur de l'Université Jean Monnet (Saint-Etienne) ;

M. Philippe CHANTELOUP : Chef du service de microbiologie environnementale du laboratoire du Conseil Général du Var (Draguignan) ;

M. Didier HILAIRE : Chef du département toxines bactériennes du Centre d'études du Bouchet (Vert le Petit).

Mme Sophie JARRAUD : Co-directeur du Centre National de Référence des légionelles (Lyon).

Mme Christine LAWRENCE : Responsable de l'équipe opérationnelle d'hygiène de l'Hôpital Raymond Poincaré (Garches).

M. Pierre LE CANN : Enseignant chercheur à l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (Rennes).

Mme Marylin LECSO : Praticien attaché dans le service de Bactériologie-Hygiène du groupe hospitalier de la Pitié Salpêtrière (Paris), Maître de conférences à l'université René Descartes (Paris)

M. Fabien SQUINAZI : Directeur du Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (LHVP).

Anses

Coordination scientifique

M. Rémi POIRIER : Chef de projet à l'Unité d'évaluation des risques liés à l'eau et aux agents biologiques

Relecture

Mme Sylvie ZINI : Chef de l'Unité d'évaluation des risques liés à l'eau et aux agents biologiques

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX : Assistante à la Direction d'évaluation des risques

Adoption du rapport par le comité d'experts spécialisé

Le présent rapport a été présenté au Comité d'experts spécialisé «Evaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques» pour avis et commentaires et adopté le 25 février 2011.

Président du Comité d'experts spécialisé

Mme Sylvie RAUZY. Docteur en hydrologie. Responsable qualité. Office national de l'eau et des milieux aquatiques (ONEMA). Chimie analytique

Membres du Comité d'experts spécialisé

Anses

M. Rafik ABSI. Docteur, Ingénieur, Enseignant-chercheur à l'École de biologie Industrielle à Cergy-Pontoise. Recherche en mécanique des fluides, hydraulique et modélisation.

M. Jean-Jacques BALLET. Médecin immunologiste. Professeur à l'université et au CHU de Caen et au Laboratoire d'Immunologie et Immunopathologie. Immunopathologie, infections (n'a pas participé aux travaux concernant cette saisine).

M. Jean-Marc BERJEAUD. Maître de conférences. Université de Poitiers et laboratoire de microbiologie fondamentale et appliquée.

M. Jean-Luc BOUDENNE. Maître de conférences. Université de Provence, Chef de l'équipe chimie et métrologie des eaux au Laboratoire de Chimie Environnement. Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux.

Mme Jeanne BRUGERE-PICOUX. Professeur, spécialiste de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

M. Pierre-Jean CABILLIC. Ingénieur ENGEES et Ingénieur du Génie Sanitaire. Chef du département «Santé Environnement» de la DDASS du Morbihan. Retraité. Qualité des eaux, assainissement, baignades et process de traitement.

M. Patrick CAMUS. Cadre de Recherche, Chef de laboratoire à l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER). Écologie, hydrologie, pollution et surveillance des eaux marines.

M. Edmond CREPPY. Professeur à l'Université de Bordeaux 2, Directeur du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée. Modes d'action des toxiques de l'environnement.

M. Christophe CUDENNEC. Maître de conférences HDR en hydrologie, Agrocampus Ouest et INRA Rennes. Hydrologie, ressources en eau, aménagement du territoire, modélisation.

M. Christophe DAGOT. Professeur, Responsable Eau et Environnement de l'Université de Limoges et de l'École Nationale supérieures d'ingénieurs de Limoges (ENSIL). Génie des procédés, traitement des eaux.

M. Sam DUKAN. Docteur en Microbiologie, Responsable d'équipe au Laboratoire de Chimie Bactérienne au centre national de recherche scientifique (CNRS) de Marseille. Chimie bactérienne, mécanismes de survie bactérienne (n'a pas participé aux travaux concernant cette saisine).

M. Jean-François GEHANNO. Médecin du travail. Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier au centre hospitalier universitaire (CHU) de Rouen au Service Médecine du Travail et Pathologie Professionnelle - Risques professionnels en particulier biologiques et toxiques.

M. Jean-Pierre GUT. Professeur hospitalo-universitaire. Directeur de l'Institut de virologie. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

M. Didier HILAIRE. Docteur, expert en microbiologie, Expert décontamination à la DGA - Désinfection des agents du risque biologique et stabilité des agents biologiques dans l'environnement.

M. Jean-François HUMBERT. Docteur, Directeur de Recherche à l'Institut national de recherche agronomique (INRA) de Thonon-les-Bains. Écologie microbienne.

M. Abdel LAKEL. Ingénieur de recherche, co-responsable du domaine Air/Eau-Pollution Santé, Pilote du département «Climatologie aérodynamique pollution épuration» au Centre scientifique des techniques du bâtiment (CSTB). Dépollution des eaux usées.

Mme Colette LE BACLE. Médecin du travail, Conseiller médical en Santé au Travail, Pilote de la thématique «Risques Biologiques» à l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS). Risques biologiques professionnels.

M. Patrick MARCHANDISE. Membre permanent du Conseil général de l'environnement et du développement durable (CGEDD), MEEDDM. Eau, assainissement, risques sanitaires

Mme Laurence MATHIEU. Maître de conférences HDR, Ecole pratique des hautes études. LCPME, UMR 7564 CNRS/Nancy Université. Microbiologie, eau, aérosol, exposition aux contaminants biologiques

Anses

M. Gérard MOGUEDET. Professeur, Hydrogéologue agréée en matière d'hygiène publique, Vice Président de l'Université d'Angers. Hydrologie, hydrogéologie et pollution des eaux.

Mme Catherine MOUNEYRAC. Professeur en écotoxicologie aquatique, Directrice de l'Institut de Biologie et d'Écologie Appliquée à l'Université Catholique de l'Ouest. Ecotoxicologie, biomarqueurs.

Mme Anne-Marie POURCHER. Maître de conférences, enseignant - Chercheur au CEMAGREF de Rennes dans l'Unité «Gestion Environnementale et Traitement biologique des déchets» - Aspect sanitaire des traitements biologiques des déchets liquides et solides, survie bactérienne.

Mme Renée RUNIGO-MAGIS. Ingénieur du centre national des arts et métiers (CNAM) en Sécurité au Travail, Ingénieur Sécurité à l'assistance publique-hôpitaux de Paris (APHP).Hygiène et sécurité professionnelle.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT. Professeur de santé publique, Chef de service à l'Université d'Auvergne au Laboratoire Santé publique et Environnement. Santé publique et épidémiologie.

Mme Nicole TANDEAU DE MARSAC. Docteur es Science, Directeur de recherche émérite au Laboratoire de chimie bactérienne au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de Marseille. Microbiologie, cyanobactéries.

Mme Michèle TREMBLAY. Médecin en santé communautaire, Médecin conseil en maladies infectieuses et en santé au travail à l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) à la Direction de la santé publique de Montréal. Risques biologiques professionnels liés aux eaux.

M. Bernard TRIBOLLET. Ingénieur de l'École Supérieure d'Électricité, Docteur d'État, Directeur de Recherches à l'Université de Jussieu au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques. Biofilms, entartrage, corrosion des matériaux en milieux naturels.

Mme Isabelle VILLENA. Médecin biologiste, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier au CHU de Reims au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie. Parasitologie et mycologie, diagnostic et traitement de zoonoses.

Auditions

IPL santé environnement durable : M. Matthieu BERNIER, laboratoire IPL Midi-Pyrénées

Suez environnement :

- Mme Sophie COURTOIS : pôle Analyse et Santé, CIRSEE (Centre de Recherche sur l'eau et l'Environnement)
- M. Samuel ROBERT : département Santé et Environnement, Pôle Analyse et Santé, CIRSEE

Veolia environnement :

- Mme Karine DELABRE : Veolia environnement recherche et innovation (VERI)
- Mme Florence POTY : Veolia environnement – Centre d'analyse environnementale (CAE)
- M. Jean-Philippe PUIBARAUD : Veolia Environnement – Dalkia (Veolia énergie), Direction technique, chargé du risque légionelle

EDF :

- Mme Marie BINET : service de recherche et développement
- Mme France WALLET : service des Etudes Médicales

Commission T 90E de l'Afnor (chargée de l'élaboration de la norme NF T90-471) : M. Laurent GARRELLY, président de la commission

Association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement (AGLAE)

- M. Philippe GARINI : Directeur d'AGLAE
- M. Olivier MOLINIER : Statisticien d'AGLEA
- M. Jean-Marie DELATTRE : Président d'AGLAE

Participants au projet européen Emile (Environmental Monitoring Investigation of *Legionella* in Europe)

- Mme Sirine ASSAF : GeneSystems
- M. Bertrand COISSAC : GeneSystems
- M. Philippe HARTEMANN : Université de Nancy

L'organisation des auditions menées par le groupe de travail a été précédée d'une phase de prise de contact préalable avec près de 45 laboratoires, industriels, organismes et personnalités compétentes dans le domaine du dénombrement de *Legionella* (utilisateurs de méthodes, développeurs de méthodes). Compte tenu du temps disponible pour réaliser cette étude, il n'était pas envisageable que le groupe de travail les auditionne tous. Ainsi, ces contacts préalables, réalisés par téléphone ou mail, ont fait l'objet de comptes-rendus au groupe de travail, qui a ainsi pu évaluer l'intérêt de les compléter ou non par une audition. Le choix des organismes et personnalités auditionnés a ainsi été basé sur leur capacité potentielle à fournir des informations dont le groupe de travail ne disposait pas déjà.

Préalablement aux auditions, chaque organisme auditionné a été sollicité par un courrier précisant les informations que le groupe de travail souhaitait aborder (exemples de courriers en annexe 5). L'objectif premier de ces auditions était de collecter des informations provenant d'observations de terrain ou d'études en cours. Il n'y a pas eu de questionnaire mais une liste de points sur lesquels le groupe de travail souhaitait recueillir la position ou une description des pratiques des personnes entendues. Les points que le groupe de travail souhaitait aborder en priorité portaient sur : les méthodes utilisées, les contextes d'utilisation, (réglementaires, technique, etc....), les informations attendues, l'interprétation des résultats, le type de décision que pouvaient engendrer les résultats obtenus et les essais de comparaison inter laboratoire.

En pratique, les auditions se sont déroulées sous la forme de présentations des personnes auditionnées, suivies de discussion de 1 à 2 heures avec le groupe de travail. Chaque audition a fait l'objet d'un compte rendu validé par les personnes auditionnées.

Abréviations et acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique,
ADNc : ADN complémentaire
ADNr : ADN ribosomal
AFNOR : Agence française de normalisation
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire – alimentation, environnement, travail
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : ARN ribosomal
ATP : Adénosine triphosphate
BCYE : Buffered charcoal yeast extract ; gélose tamponnée à l'extrait de levure et au charbon actif
CCLIN : Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
CNRL : Centre national de référence des légionelles
CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique de France
DGS : Direction générale de la santé
dATP : Désoxyadénosine tri-phosphate
dCTP : Désoxycytidine tri-phosphate
dGTP : Désoxyguanosine tri-phosphate
dHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography; Chromatographie liquide haute pression en condition dénaturante
dNTP : Désoxynucléotides tri-phosphates
dTTP : Désoxythymidine tri-phosphate
DVC : Dead and Viable Count ; comptage viable direct
ECS : Eau chaude sanitaire
EMA : Monoazide d'éthidium
EWGLI : European Working Group for Legionella Infections
FAO : Food and Agricultural Organization ; Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FCM : Flow Cytometer ; cytomètre en flux
FISH : Fluorescence In Situ Hybridation ; Hybridation *in situ* fluorescente
GT : Groupe de travail
GVPC : Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide
IDS : Immunological Double Staining ; double marquage immunologique
IMS : Séparation immuno-magnétique
InVS : Institut de veille sanitaire
IRDEFA : Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air
ISO : International Standard Organization ; Organisation internationale de normalisation
LD : Limite de détection
LPS : lipopolysaccharides
LQ : Limite de quantification
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ; desorption-ionisation laser assistée par matrice
mip : Macrophage Infectivity Potentiator ; potentiator d'infectivité des macrophages
PCR : Polymerase Chain Reaction ; réaction de polymérisation en chaîne
PMA : Monoazide de propidium
q-PCR : real time quantitative PCR ; PCR quantitative en temps réel
RT-PCR : Reverse Transcriptase – PCR ; PCR après transcription inverse

Anses

r^2 : Coefficient de corrélation

TAR : tour aéroréfrigérante

TOF : Time-Of-Flight : temps de vol

TVC : Total Viable Count ; comptage viable total

UFC : Unité formant colonie

UG : Unité génome

VBNC : Viable But NonCulturable ; Viable mais non cultivable

VLEP : Valeurs limites d'exposition professionnelle

v-PCR : viability PCR ; PCR Viable

Introduction

Contexte

L'incidence de la légionellose a diminué en France depuis 2006 pour se stabiliser aux alentours de 1200 cas déclarés par an (1206 cas enregistrés en 2009, BEH n°31-32 du 27 juillet 2010), grâce notamment à une meilleure identification des sources potentielles de contamination. Cependant, cette identification se heurte aux limites des méthodes de détection et de dénombrement des légionelles (*Legionella*) dans l'environnement.

Selon la réglementation française actuellement en vigueur, la recherche et le dénombrement de *Legionella* spp. et / ou de *Legionella pneumophila* :

- est obligatoire :
 - o dans les tours aéroréfrigérantes, une fois par mois pendant la période de fonctionnement de l'installation¹ (arrêtés du 13 décembre 2004) ;
 - o dans les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques dans les établissements thermaux, une fois par mois aux points d'usage les plus sensibles (arrêté 19 juin 2000) ;
 - o dans les réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements de santé, des établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées, des autres établissements sociaux et médico-sociaux, des hôtels, des résidences de tourisme, des campings et des établissements pénitentiaires, une fois par an aux points d'usage représentatifs (Arrêté du 1^{er} février 2010) ;
- sera obligatoire, une fois par an aux points d'usage représentatifs (Arrêté du 1^{er} février 2010), à compter du 1^{er} janvier 2012 pour les autres établissements recevant du public.

Il est clairement indiqué dans les arrêtés du 13 décembre 2004, relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation et du 1^{er} février 2010, relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, que seuls les résultats d'analyse produits avec la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431 "Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés", sont reconnus par les pouvoirs publics. Les valeurs cibles réglementaires, établies en unités formant colonies (UFC) par litre, reposent donc sur la méthode par culture. Elles sont détaillées dans le chapitre "Seuils de gestion et mesures préconisées par la réglementation en vigueur".

Cette méthode par culture est également systématiquement mise en œuvre lors d'investigations épidémiologiques de cas de légionellose.

Toutefois la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431, présente certains inconvénients :

- le rendu des résultats définitifs nécessite un délai minimum de 8 jours après la mise en culture (des résultats intermédiaires pouvant cependant être rendus au bout de 3 à 5 jours). Ce délai peut poser des problèmes pour la gestion des installations concernées, notamment pour lever des mesures restrictives d'utilisation d'eau (ex : interdiction d'utilisation de douches dans l'attente de résultats négatifs, etc.) ;
- l'ensemble des différentes formes de *Legionella* potentiellement présentes dans l'eau n'est pas pris en compte par cette méthode. En effet :
 - la méthode permet le dénombrement de *Legionella* libres, viables et cultivables², dans les échantillons d'eau ;
 - elle ne permet pas le dénombrement de *Legionella* viables non cultivables ;
 - le dénombrement par culture de *Legionella* contenues dans des protozoaires ou des vésicules externes de ces protozoaires est peu documenté et il existe des incertitudes quant à la capacité de cette méthode à les dénombrer correctement.

Face à ces inconvénients, plusieurs autres techniques d'analyses ont vu le jour et sont aujourd'hui utilisées ou en cours de développement par les exploitants pour l'autosurveillance³ des installations.

¹ Si, pendant une période d'au moins 12 mois continus, les résultats des analyses mensuelles sont inférieurs à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau, la fréquence des prélèvements et analyses des *Legionella* spp selon la norme NF T90-431 pourra être au minimum trimestrielle

² Ces termes sont définis dans le chapitre 1.6.

Anses

Par ailleurs de nouvelles approches basées sur des méthodes ayant fait leurs preuves pour d'autres applications ou sur des technologies émergentes apparaissent dans la littérature ou sur le marché.

Pour pouvoir évaluer la pertinence de chacune des méthodes disponibles, préalablement à toute étude d'équivalence, il apparaît nécessaire de conduire une étude des caractéristiques et des performances pour le dénombrement de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire et dans les eaux des circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, de manière à évaluer la pertinence de leur mise en œuvre en fonction du type d'eau à analyser.

En complément de cette description du contexte, des listes des textes réglementaires, législatifs et normatifs relatifs aux *Legionella* sont proposées en annexes 2 et 3 du présent document.

Objet de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) a été saisie le 29 juillet 2009 par la Direction générale de la santé (DGS) et la Direction générale de la prévention des risques⁴ sur les méthodes de détection des légionelles dans l'eau (Annexe 1).

Les objectifs du contrat d'expertise étaient plus particulièrement les suivants :

1. Décrire les méthodes pré-analytiques (préparation de l'échantillon avant analyse) et analytiques connues pour la détection et le dénombrement spécifique de légionelles dans l'eau (culture, biologie moléculaire (PCR), immuno-détection, etc.). Cette description avait notamment pour finalité d'identifier les questions auxquelles répondent les méthodes et leurs limites théoriques. Elle devait être basée sur une recherche bibliographique ;

2. Etudier la pertinence (avantages et inconvénients) de la mise en œuvre de ces méthodes analytiques pour le contrôle sanitaire des eaux chaudes et le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, en fonction de leurs besoins et contraintes respectives :

- dans un premier temps, cette étude devait viser à analyser les avantages et inconvénients des différentes méthodes, notamment sur les questions des contraintes de faisabilité technique et des coûts ;
- dans un second temps, si des méthodes apportant une plus-value technique par rapport à la méthode par culture étaient mises en évidence, la pertinence de leur mise en œuvre dans le cadre des contrôles réglementaires devait être évaluée. S'agissant des méthodes identifiées, une réflexion pouvait notamment être menée concernant les seuils réglementaires et, le cas échéant, leur révision.

3. Si nécessaire, identifier les essais expérimentaux permettant de vérifier ou d'infirmar les hypothèses avancées concernant la pertinence des méthodes recensées, et le cas échéant le lancement des études nécessaires.

Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise a été menée conformément aux exigences de la norme NF X 50-110 relative à la qualité en expertise (AFNOR, 2003), avec l'appui du CES "Evaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques".

Un groupe de travail (GT) a été constitué en veillant notamment à la compétence et l'indépendance de ses membres.

Le GT s'est réuni à 21 reprises entre le 15 février 2010 et le 14 octobre 2010. Sur la base d'une synthèse bibliographique produite par l'Afsset, le GT a poursuivi la collecte d'éléments bibliographiques, procédé à 7 auditions formelles⁵ et analysé l'ensemble des données collectées pour formuler ses conclusions et recommandations. Ces auditions ont permis de compléter les informations recueillies dans la bibliographie, en les comparant avec les tendances et hypothèses déjà publiées. Le rapport établit une distinction entre les éléments issus de la bibliographie et ceux issus des auditions.

³ Surveillance réalisée par les exploitants d'installation, à distinguer du contrôle réglementaire, reconnu par les autorités.

⁴ L'Afsset et l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) ont fusionné pour donner naissance à l'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses), le 1^{er} juillet 2010. Ainsi, la réponse à la saisine de l'Afsset est donnée sous forme d'un rapport de l'Anses.

⁵ Les 7 organismes auditionnés sont : l'Institut Pasteur Lille (IPL) santé environnement durable, Suez environnement, Veolia environnement, EDF, le président de la Commission T 90E de l'Afnor, l'Association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement (AGLAE) et des participants au projet européen Emile. Ces organismes ont été sélectionnés par le GT après en avoir contacté préalablement près de 45 pour évaluer la nécessité d'une audition.

Anses

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement au CES "évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques". Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

1 Description et spécificités du genre *Legionella*

1.1 Caractéristiques générales

Les bactéries du genre *Legionella* appartiennent à la famille des *Legionellaceae*. Actuellement 58 espèces de *Legionella* sont identifiées⁶, dont la plus fréquemment isolée chez les patients est *Legionella pneumophila*. Ces espèces peuvent être divisées en sérogroupes⁷; ainsi environ 70 sérogroupes de *Legionella* différents sont actuellement connus. Pour l'espèce *L. pneumophila*, 16 sérogroupes ont été définis à ce jour. Au sein d'un même séro groupe, des sous groupes ont été définis selon leurs propriétés immunologiques et génomiques (par exemple, une *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 peut être de sous-type⁸ Pontiac, Philadelphie, etc.). La classification EWGLI (European Working Group for Legionella Infections) tend à homogénéiser la classification décrite ici (Luck *et al.* 2009).

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif aérobies, qui mesurent de 0,2 à 0,9 µm de large sur 20 µm de long. Elles ne sont ni capsulées, ni sporulées, et peuvent être mobiles grâce à 1 ou 2 flagelles polaires. Elles sont caractérisées par une croissance relativement lente et ont besoin pour se multiplier de L-cystéine et de Fer (Fe^{2+} ou Fe^{3+}). Il a cependant été observé sur trois espèces isolées de cas cliniques (*L. jordanis*, *L. oakridgensis*, *L. spiritensis*) une perte de la dépendance vis-à-vis de la cystéine (Orrison *et al.* 1983).

Dans l'environnement et le milieu hydrique en particulier, leur survie et leur croissance sont influencées par de nombreux paramètres (Avril *et al.* 2000; Bhopal *et al.* 1991; Bollin *et al.* 1985; Borella *et al.* 2004; Ciesielski *et al.* 1984; Den Boer *et al.* 2002; Dennis *et al.* 1984; Fields *et al.* 2002; Habicht and Muller 1988; Hoebe and Kool 2000; Keller *et al.* 1996; Leoni *et al.* 2001; Pongratz *et al.* 1994; Rogers *et al.* 1994; States *et al.* 1985; Stout *et al.* 1985; Wadowsky *et al.* 1985; Zacheus and Martikainen 1994) :

- la température : croissance optimale à 35°C, multiplication entre 20 et 45°C ; survie entre 6 et 66°C ;
- le pH (tolérance d'une large gamme de pH entre 5,5 et 10) ;
- les concentrations en ions fer et zinc ;
- les conditions hydrauliques (stagnation éventuelle de l'eau) ;
- la présence d'autres microorganismes : les études montrent que dans des conditions environnementales défavorables (température, présence de désinfectant, etc.), *Legionella* spp se développent beaucoup mieux et plus rapidement lorsqu'elles sont co-cultivées avec des amibes. La présence de certaines bactéries et de biofilms⁹ ou de cyanobactéries qui agissent sur la présence de nutriments dans le milieu, peut également influencer sur la survie et/ou le développement de *Legionella* (Declerck 2010).

1.2 Association de *Legionella* avec d'autres composantes du milieu

1.2.1 Association avec les protozoaires

En dehors des bactéries, les eaux douces sont généralement colonisées par de nombreux protozoaires, parmi lesquels figurent au premier rang les amibes et les ciliés (Cavalier-Smith 1993; Finlay and Esteban 1998).

⁶ http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=LEGIONELLA

⁷ Un séro groupe est théoriquement une subdivision taxonomique d'une espèce basée sur des caractéristiques immunologiques, à savoir la présence d'épitopes antigéniques reconnus spécifiquement par un sérum, généralement polyclonal et produit chez le lapin. Toutefois, eu égard à la nature polyclonale de ce sérum, une certaine réactivité croisée est possible (par exemple, reconnaissance de bactéries appartenant au genre mais pas à l'espèce concernée).

⁸ Un sous-type est une subdivision taxonomique basée sur l'identité génétique conférée par l'analyse de séquence ADN d'une souche isolée avec celle d'une souche de référence déjà caractérisée (par exemple dans le cas des legionelles, lors d'un épisode contaminant antérieur, le lieu de contamination : Paris, Corby, Bellingham, Philadelphia, Knoxville, Lens, etc...)

⁹ Un biofilm est un système métastable, résultant (1) de la multiplication des bactéries fixées sur un support et du dépôt de bactéries provenant de la phase eau, (2) de l'érosion continue, conduisant à un relargage constant de microorganismes dans la phase eau (Ascon-Cabrera 1995; Declerck 2010; Rittman 1989). En d'autres termes, la contamination bactérienne de l'eau d'un réseau est directement liée au biofilm et particulièrement à la croissance et à l'arrachage des bactéries fixées. A l'inverse, la dynamique du biofilm est également influencée par la qualité de l'eau à son contact.

Anses

Les amibes sont des protozoaires de taille variant entre 10 µm et 1 mm de longueur (200 -500 µm en moyenne). Elles vivent en milieu aqueux, dans lequel elles se déplacent le plus souvent par reptation à l'aide de pseudopodes. Certaines sont équipées de flagelles pour assurer leur mobilité. Elles se reproduisent par fission binaire et se nourrissent par phagocytose de microalgues, de protozoaires plus petits et de bactéries (Corsaro *et al.* 2010). Leur implication dans le développement de nombreux micro-organismes pathogènes est désormais avérée (Berk *et al.* 1998; Pagnier *et al.* 2009; Thomas *et al.* 2006). Dans leur milieu naturel, les conditions affectant généralement la croissance des amibes sont le pH, la température, la salinité et la teneur en soufre (acide sulfurique) (Rodriguez-Zaragoza 1994). Les amibes sont capables de se développer à des températures très variées, dans des plages spécifiques à chaque espèce (Griffin 1972). La température idéale moyenne de croissance en milieu liquide pour le genre *Acanthamoeba* semble se situer entre 30 et 37°C. Cependant, il existe des variantes thermorésistantes susceptibles de croître à des températures plus élevées (De Jonckheere 1980).

Les ciliés sont des protozoaires binucléés pouvant atteindre 2 mm de long et caractérisés par la présence constante ou provisoire de cils vibratiles à leur surface. Ils sont présents dans les eaux douces, saumâtres et marines où ils existent sous diverses formes : formes libres nageuses, formes fixes pédonculées, formes coloniales, formes parasitaires non pathogènes ou formes symbiotiques. Les ciliés sont hétérotrophes et se nourrissent de particules organiques, de bactéries, d'autres ciliés, de flagellés voire d'animaux microscopiques. Leurs structures orales se spécialisent selon leur régime alimentaire (Baroin-Tourancheau *et al.* 1992; Lynn and Corliss 1991).

La relation entre *Legionella* et protozoaires est connue depuis une trentaine d'années. Elle a particulièrement été étudiée pour *L. pneumophila* (Rowbotham 1983), notamment avec des amibes des genres *Naegleria*, *Acanthamoeba* (Kuiper *et al.* 2004; Newsome *et al.* 1985; Newsome *et al.* 1998; Tyndall and Domingue 1982; Wadowsky *et al.* 1991) ou des ciliés de genre *Tetrahymena* (Faulkner *et al.* 2008; Fields *et al.* 1984; Garduño *et al.* 2006). Ces protozoaires sont des hôtes naturels de *Legionella* (Fields *et al.* 2002) et constitueraient même, selon certains auteurs, leur principal réservoir dans l'environnement (Cirillo *et al.* 1994; Fields *et al.* 1989). En effet, les *Legionella* sont capables de se multiplier de manière importante en leur sein (Holden *et al.* 1984; Rowbotham 1983) et il est supposé que les protozoaires, en particulier les amibes, constituent un microenvironnement propice à la multiplication bactérienne dans un milieu extérieur défavorable (par exemple, carencé en nutriment). La croissance de *Legionella* requiert en effet la présence minimale de nutriments spécifiques, ainsi qu'en témoigne la composition particulière des milieux de culture utilisés pour leur isolement.

Une fraction des *Legionella*, appelées viables non cultivables (VBNC), ne se développe pas dans les conditions de culture usuelles. Or le séjour de *L. pneumophila* à l'intérieur des protozoaires, en particulier les amibes, permettrait de faire passer *L. pneumophila* d'un état viable non cultivable à un état viable cultivable¹⁰ (Moritz *et al.* 2010; Oliver 2009). Ceci conduit à considérer que certains éléments, nécessaires à la croissance des VBNC, comme certains nutriments, ne seraient pas présents dans les milieux de culture, alors qu'ils le seraient dans l'environnement intracellulaire des protozoaires (Fields *et al.* 2002).

Le maintien ou la croissance des *Legionella* dans les protozoaires se produit au sein de vésicules digestives ayant des devenir différents selon que l'hôte est une amibe ou un cilié :

- chez les ciliés, les vésicules digestives accumulent les *Legionella*, lesquelles subissent ensuite une digestion partielle. Le résultat de cette digestion est la formation d'une « pelote » contenant la plupart du temps des *Legionella* digérées et un nombre variable de *Legionella* intactes potentiellement infectieuses. La pelote est ensuite relarguée dans le milieu extérieur (Garduño *et al.* 2006).
- chez les amibes, les *Legionella* ingérées subissent un cycle d'amplification intracellulaire dont le principe a été décrit pour *L. pneumophila* et l'hôte *A. polyphaga* par Rowbotham. Succinctement, des *Legionella* sont phagocytées et forment une vésicule digestive où elles se multiplient en perdant leur mobilité. La vésicule perd ses capacités digestives et envahit peu à peu le cytoplasme. Elle est susceptible de se rompre, entraînant la lyse de l'amibe et la libération de *Legionella* redevenues mobiles. Dans certains cas, l'amibe libère également des vésicules

¹⁰ Les différents états de viabilité d'une bactérie sont définis ultérieurement dans le chapitre « Signification sanitaire de la présence de *Legionella* viables non cultivables »

Anses

encore intactes dont le diamètre se situe majoritairement entre 1 et 5 μm (Berk *et al.* 1998; Rowbotham 1980; Rowbotham 1983; Rowbotham 1986). Ces petites vésicules sont soupçonnées être des vecteurs particulièrement efficaces d'infection par les *Legionella* (Berk *et al.* 1998; Philippe *et al.* 2006). En effet, leur taille les rend aptes à être inhalées profondément dans l'arbre bronchique et la membrane amibienne qui les entoure est suspectée favoriser leur fusion avec la membrane des cellules de l'épithélium pulmonaire (Berk *et al.* 1998). La survie de ces vésicules dans l'environnement peut être extrêmement longue (supérieure à plusieurs mois), ce qui en accentue la dangerosité (Bouyer *et al.* 2007).

Il est généralement admis que la prolifération de *Legionella* libres dans le milieu est optimale lorsque la température avoisine les 35°C ou *a minima* à l'intérieur d'une plage s'étendant de 20 et 45°C (Fields *et al.* 2002). Le fait que les amibes constituent un important réservoir multiplicatif suggère fortement que l'association amibes - *Legionella* est également influencée par la température. Il semble désormais établi que *L. pneumophila* infecte de manière optimale les formes trophozoïtes d'*Acanthamoeba* à des températures supérieures à 25°C (Berk *et al.* 1998; Cirillo *et al.* 1994; Rowbotham 1986).

Les observations ci-dessus tendraient à montrer que c'est également vers 35°C que le relargage de vésicules par les trophozoïtes est optimal. Ces trophozoïtes amibiens sont toutefois susceptibles de se transformer en kystes lors de l'apparition de conditions défavorables (carence en nutriments, exposition à certains agents chimiques ou baisse de température). L'enkystement induit une digestion partielle des vésicules intracellulaires et parallèlement un relargage dans l'environnement d'une fraction des vésicules non ou partiellement digérées, lesquelles contiennent donc de nombreuses *Legionella* infectieuses (Berk *et al.* 1998; Ohno *et al.* 2008; Schuster 1979). Il semble en effet que les *Legionella* infectieuses (caractérisées par une reprise de mobilité) soient susceptibles de résister à la digestion par l'amibe (Fields 1996).

De la même manière, les amibes confèrent aux *Legionella* qu'elles hébergent une protection dans un environnement défavorable. Cette protection augmente encore dans l'amibe enkystée dont la paroi est plus résistante que celle des trophozoïtes. Elle permet aux *Legionella* intracellulaires d'être protégées vis-à-vis des températures très élevées, normalement létales, voire vis-à-vis de la chloration (Breiman *et al.* 1990; Cirillo *et al.* 1999; Fields *et al.* 2002; Holden *et al.* 1984; Kilvington and Price 1990; Rowbotham 1980; Steinert *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2004).

Le phénomène d'enkystement et de relargage à basse température (inférieure à 20°C) a été mis en évidence pour *L. pneumophila* hébergée par *A. castellanii* (Ohno *et al.* 2008). Ceci suggère que si une hausse de température favorise l'augmentation de *Legionella* libres dans le milieu en stimulant leur croissance, une baisse de température favorise également un accroissement de leur population dans l'environnement et potentiellement de dangerosité par un mécanisme non prolifératif, lié au relargage massif des vésicules amibiennes suite à l'enkystement. Berk *et al.* suggèrent qu'un processus similaire peut être provoqué par l'adjonction de biocides (Berk *et al.* 1998).

Les protozoaires constituent un réservoir avéré de *Legionella* et contribuent à leur protection contre les stress environnementaux (notamment les traitements de désinfection), favorisent leur multiplication et leur revivification, et semblent accroître leur pathogénicité pour l'homme. Compte tenu de ces éléments, la présence de protozoaires est un facteur à prendre en considération lors du suivi des installations, en particulier à la suite d'un traitement de désinfection, et pourrait être à l'origine d'une recontamination plus rapide de l'installation.

1.2.2 Association avec le biofilm

L. pneumophila est capable de survivre dans les biofilms présents à l'intérieur de canalisations (Declerck 2010; Fields *et al.* 2002; Frère 2009; Kuiper *et al.* 2004; Moritz *et al.* 2010). Une étude de Rogers *et al.*, a montré que la proportion de *L. pneumophila* cultivables dans le biofilm et dans la phase planctonique varie avec la température (Rogers *et al.* 1994). Selon cette étude où les *Legionella* ont été dénombrées par culture dans une installation simulant une canalisation d'eau potable à 20°C, *L. pneumophila* représente une faible proportion de la population bactérienne cultivable (0,1%), aussi bien dans la phase planctonique que dans le biofilm. A 40°C, *L. pneumophila* représente 12 % des bactéries cultivables de la phase planctonique et 50 % du biofilm. A 50°C, *L. pneumophila*, est encore capable de survivre, mais ne représente plus que 0,7 % des bactéries

cultivables de la phase planctonique et 0,1 % du biofilm. A 60°C la bactérie est indétectable aussi bien dans le biofilm que dans la phase planctonique.

Selon certains auteurs *L. pneumophila* peut se multiplier dans ces biofilms en présence de protozoaires comme l'amibe *Hartmannella vermiformis* (Abu Kwaik *et al.* 1998; Kuiper *et al.* 2004; Lau and Ashbolt 2009; Moritz *et al.* 2010; Murga *et al.* 2001). Certains auteurs supposent également que le complexe nutritif constitué par un biofilm peut permettre une multiplication de *Legionella* en dehors d'une cellule de protozoaire hôte. Cette dernière hypothèse reste cependant encore à vérifier (Fields *et al.* 2002; Rogers and Keevil 1992).

Ainsi *L. pneumophila* peut avoir été éliminée de l'eau libre et persister dans les biofilms des canalisations, probablement si un protozoaire hôte de *Legionella* y est également présent, voire peut-être même s'y multiplier en l'absence de protozoaire hôte. Lorsqu'elle est révélée par une analyse par culture, l'absence de *L. pneumophila* dans un prélèvement d'eau ne signifierait donc pas nécessairement que *L. pneumophila* est totalement absente du réseau dans lequel le prélèvement a été effectué. Cette mise en garde, légitimée pour *L. pneumophila*, peut probablement être étendue à tout le genre.

Le biofilm constitue un réservoir avéré de *Legionella* et contribue à leur survie et leur protection contre les stress environnementaux, notamment les traitements. De surcroît, il favorise le développement de nombreux protozoaires. Compte tenu de ces éléments, la présence de biofilm est un facteur à prendre en considération lors du suivi des installations et pourrait également contribuer à la recontamination plus rapide de l'installation, après un traitement de désinfection.

1.3 Mécanismes conduisant à la contraction d'une légionellose

Chez l'Homme, la contamination par les bactéries du genre *Legionella* s'effectue par l'inhalation d'un aérosol composé de fines gouttelettes d'eau contaminée. L'infectiosité d'un aérosol est liée à différents paramètres : ses caractéristiques physiques, dont la taille des gouttelettes, sa concentration en *Legionella* et leur capacité de survie dans l'aérosol. Ainsi, il est admis qu'un aérosol ne peut être infectieux que si les gouttelettes d'eau qui le composent sont suffisamment petites pour atteindre les alvéoles pulmonaires (diamètre inférieur ou égal à 5 µm) (Bollin *et al.* 1985; Girod *et al.* 1982) et assez grandes pour contenir une ou plusieurs bactéries (diamètre supérieur à 2 µm) (Baron and Willeke 1986).

Après avoir pénétré dans l'arbre pulmonaire, *L. pneumophila* établit un foyer infectieux au sein de l'alvéole pulmonaire où la bactérie interagit avec les macrophages et les cellules épithéliales (Mody *et al.* 1993). Sur les modèles expérimentaux animaux, un important accroissement de l'inoculum bactérien est observé dans le cul de-sac alvéolaire, jusqu'à la 48^{ème} – 72^{ème} heure après l'inoculation. Après une période de multiplication des *L. pneumophila*, la cellule infectée est lysée, causant d'importantes lésions au niveau de la barrière alvéolo-capillaire. Ceci peut expliquer la dissémination de *L. pneumophila* à d'autres zones pulmonaires et la décompartmentation extrapulmonaire par voie hématogène, un mécanisme mis en évidence *in vivo* (Ader *et al.* 2008; Brieland *et al.* 1997).

1.4 Pertinence du dénombrement de *Legionella* versus détection

L'attention s'est portée sur le genre *Legionella* en 1976, quand 182 personnes logeant dans un hôtel de Philadelphie ont présenté des infections respiratoires provoquant 34 décès. La plupart des malades participaient à la 56^{ème} convention de l'American Legion, d'où le nom "maladie du légionnaire".

La dose infectante chez l'homme est inconnue. Seules sont connues les doses infectantes obtenues sur des modèles expérimentaux animaux reproductibles et validés : cobayes, souris consanguines et primates (Ader *et al.* 2008; Berendt *et al.* 1980; Breiman *et al.* 1990; Brieland *et al.* 1997).

Dans ces différentes études, l'infection se fait par le biais d'un aérosol infecté ou par instillation intratrachéale directe. Dans le cadre de ces études, la biomasse bactérienne nécessaire pour induire une infection *in situ* au contact de l'interface épithéliale alvéolaire de l'animal exposé a pu être évaluée :

- un inoculum de 10⁶ UFC provoque une légionellose de type fièvre de Pontiac, avec une survie de 100% des animaux exposés ;
- un inoculum de 10⁷ UFC provoque une légionellose chez les animaux exposés avec un taux de mortalité proche de celui observé chez de l'Homme soit 10 à 25% ;
- un inoculum supérieur ou égal à 10⁸ UFC est systématiquement létal pour l'animal.

Toutefois, ces observations ne prennent pas en compte certains paramètres tels que :

- le taux de transfert bactérien air-alvéoles ;
- les modifications anatomo-fonctionnelles induites par les pathologies broncho-pulmonaires chroniques, dont le tabagisme est le principal promoteur, qui facilitent l'implantation bactérienne.

Les scientifiques s'accordent sur les points suivants : le développement et la gravité de la maladie sont conditionnés par le niveau d'exposition. Plus l'aérosol véhicule un nombre important de *Legionella* viables, plus l'inoculum atteignant les voies aériennes inférieures serait important et plus cela aurait un impact sur la morbi-mortalité. Au-delà d'une valeur critique d'exposition représentant la quantité minimale de bactéries atteignant l'alvéole nécessaire à l'induction d'une maladie, il existerait une relation dose-réponse¹¹ proportionnelle entre exposition et développement de la maladie traduisant un "effet inoculum". Ainsi, il apparaît par exemple que plus la quantité de *Legionella* rejetée dans les panaches des tours aéroréfrigérantes est importante et plus le risque infectieux pour les populations environnantes est élevé (Berendt *et al.* 1980; Breiman *et al.* 1990; Brieland *et al.* 1997).

Compte tenu de ces éléments, il apparaît important de dénombrer les *Legionella* dans les échantillons d'eau et de ne pas se limiter à leur détection.

1.5 Pertinence de la recherche de *L. pneumophila* versus *L. spp*

En France, les données de l'InVS sur 11147 cas confirmés de légionellose entre 1998 et 2008 montrent que 88 % des cas diagnostiqués par l'ensemble des tests d'antigénurie, de sérologie et de culture, sont dus à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1. Pour 18 % de l'ensemble des cas diagnostiqués, des prélèvements pulmonaires¹² ont permis d'isoler des souches de *Legionella* d'origine clinique. Parmi ces souches, l'espèce *Legionella pneumophila* est identifiée dans 98 % des cas et le séro-groupe 1 dans 93 % des cas (Campese *et al.* 2010).

En Europe, les données sur 10 715 cas déclarés de légionellose en 2007 et 2008 rapportés par 34 pays montrent que 79,6% des cas étaient dus à *L. pneumophila* séro-groupe 1, 15 % à un autre séro-groupe de *L. pneumophila* et 5,4% à une autre espèce de *Legionella*. Sur les 1042 isolats disponibles, 86,0% étaient des *L. pneumophila* séro-groupe 1, 7,5% étaient des *L. pneumophila* séro-groupes 2-16, avec une prédominance du séro-groupe 3 (3,2%) et du séro-groupe 6 (1,2%), et 3,6% étaient des *L. pneumophila* de séro-groupe inconnu ou non identifiées. Dix neuf isolats étaient identifiés comme une espèce *Legionella non pneumophila*: *L. anisa* (n=2), *L. bozemanii* (n=4), *L. dumoffii* (n=1), *L. gormanii* (n=1), *L. longbeachae* (n=9), *L. maceachernii* (n=1), *L. wadsworthii* (n=1). Pour 14 isolats, l'espèce n'a pas été identifiée (Joseph *et al.* 2010).

Dans une étude internationale réalisée par Yu *et al.* (Yu *et al.* 2002) sur 508 cas confirmés par culture, l'espèce *L. pneumophila* constituait 91,5% des isolats et le séro-groupe 1 était responsable de 84,2 % des cas mondiaux.

La prédominance de *L. pneumophila* séro-groupe 1 en pathologie humaine ne semble pas liée à une prédominance environnementale. Une étude française montre que ce séro-groupe représente moins de 30 % des *Legionella* identifiées dans l'environnement (Doleans *et al.* 2004). Elle pourrait être liée à une plus grande infectiosité de ce séro-groupe pour l'homme. Par ailleurs, il est également démontré que la plupart des individus atteints de légionellose due à une espèce autre que *L. pneumophila* souffrent d'une immunodépression préexistante sévère (David *et al.* 2006; Doleans *et al.* 2004; Harris *et al.* 1998; Joly *et al.* 1986; Lee *et al.* 2009; Meenhorst *et al.* 1985; Muder and Yu 2002).

Une étude a été menée sur 217 souches de *Legionella pneumophila* et 32 *Legionella non pneumophila*, à l'aide de puces à ADN. Elle a montré qu'un cluster¹³ de gènes de biosynthèse des lipopolysaccharides¹⁴ (LPS) déterminant le séro-groupe 1 était présent dans des profils génétiques très

¹¹ Relation spécifique d'une voie entre des niveaux d'exposition à un agent dangereux et l'indice observé d'un effet donné.

¹² Prélèvement des sécrétions respiratoires.

¹³ Des gènes appartenant à la même famille peuvent dans certains cas être groupés les uns derrière les autres au niveau d'une même région chromosomique, ils forment alors un *cluster*.

¹⁴ Composant de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif

différents. Cela suggère que le LPS du sérotype 1 joue un rôle dans la haute prévalence de la légionellose humaine (Cazalet *et al.* 2010).

Au total, la littérature rapporte que, dans le monde, une vingtaine d'espèces de *Legionella* autres que *pneumophila* ont été impliquées dans au moins un cas de légionellose. Les plus souvent identifiées chez les patients atteints de légionellose sont *L. longbeachae* (3,9 % des cas) et *L. bozemanii* (2,4 % des cas). Excepté en Australie et en Nouvelle-Zélande où *L. longbeachae* devance *L. pneumophila* et est à l'origine de plus de cas.

En effet, alors que *L. pneumophila* est la principale cause de légionellose en Europe et aux USA, *L. longbeachae* est responsable d'environ 30 % des cas de légionellose en Australie, Nouvelle Zélande, Nouvelle Calédonie (Yu *et al.* 2002) et d'environ 50 % au sud de l'Australie et en Thaïlande (Phares *et al.* 2007). A la différence des autres espèces de *Legionella*, dont le réservoir principal est l'eau environnementale, *L. longbeachae* est fréquemment isolée dans les sols terreux et infecte principalement des individus exposés à ces sols (Fields *et al.* 2002).

L'ensemble des tests de diagnostic disponibles actuellement (culture, sérologie, antigénurie) favorise le diagnostic des cas de légionellose à *L. pneumophila* et notamment du sérotype 1 (détection des antigènes urinaires). Ainsi, le développement des méthodes de détection moléculaires (q-PCR) pour le diagnostic, à partir de prélèvements pulmonaires, pourrait potentiellement augmenter le nombre de cas liés à *Legionella* non *pneumophila* (Diederer *et al.* 2008; Yang *et al.* 2010), sans pour autant en modifier fortement l'épidémiologie.

Compte tenu de ces éléments, les informations nécessaires pour le dénombrement de *Legionella*, dans les différents contextes d'analyses, sont les suivantes :

- pour la gestion des risques sanitaires, concernant la population générale, le dénombrement de *L. pneumophila* peut être suffisant, compte tenu de la rareté des cas de légionelloses attribués à d'autres espèces de *Legionella*. Le dénombrement sélectif des *L. pneumophila* du sérotype 1 peut apporter une information supplémentaire (ce sérotype étant responsable de 85 % des cas de légionellose), mais ne peut remplacer le dénombrement des *L. pneumophila* ;
- dans la mesure où les individus atteints d'une immunodépression sévère peuvent être infectés par *L. pneumophila* mais également par d'autres espèces de *Legionella*, dans le cas particulier de ces patients dits « à haut risque », (au sens de la circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002¹⁵), le dénombrement des *L. spp* apporte une information supplémentaire, notamment lorsqu'elle est associée aux mesures de suivi et de traitement de l'eau spécifiques à ce contexte, déjà envisagées dans la réglementation en vigueur¹⁶ ;
- pour la gestion des installations d'eau chaude sanitaire et des tours aéroréfrigérantes, le dénombrement de *L. spp* apporte des informations relatives à l'écosystème des installations de la même importance que celles apportées par le dénombrement de *L. pneumophila*.

1.6 Signification sanitaire de la présence de *Legionella* viables non cultivables

En préambule à ce chapitre, il est important de poser quelques définitions relatives aux différents états de viabilité des bactéries. Le concept de viabilité des bactéries est difficile à appréhender et de nombreuses définitions sont possibles (Barer *et al.* 2000; Bogosian and Bourneuf 2001; Joux and Lebaron 2000; Kell *et al.* 1998; McDougald *et al.* 1998; Oliver 2005). Pour le présent rapport, le groupe de travail adopte trois définitions basées sur celles proposées par (Ducret 2009).

Viabilité :

La viabilité peut être associée à la capacité d'une bactérie à se multiplier ou à exprimer des caractères physiologiques qui suggèrent l'existence d'une intégrité membranaire ; d'une activité métabolique (activité enzymatique intracellulaire, activité respiratoire, etc.).

¹⁵ Les patients dits « patients à haut risque » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours)

¹⁶ Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire et Circulaire DGS/SD7A/SD5C/DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

Anses

Cultivabilité :

La cultivabilité est la faculté que présente une bactérie à former en un temps donné, et sur un milieu de culture gélosé défini une colonie visible par l'observateur. Cette définition intègre des notions de développement, de temps, de sensibilité, et de qualité du milieu de culture utilisé. Dans les cultures en milieu liquide, la croissance se traduit par une turbidité du milieu.

Viable non cultivable :

L'état viable mais non cultivable (VBNC) caractérise les bactéries qui perdent leur cultivabilité tout en conservant une certaine forme de viabilité se traduisant par la conservation de l'intégrité structurale et/ou des activités métaboliques. La présence de bactéries viables non cultivables est généralement observée en association avec des conditions environnementales particulières ou liée à des stress. La perte de cultivabilité peut être une réaction adaptative à ces conditions ou au contraire un processus dégénératif ou encore inhérent à la méthode de culture utilisée. Dans certaines conditions de culture ou à la suite des modifications de l'environnement les bactéries viables non cultivables peuvent retrouver leur cultivabilité.

Dans le présent rapport, le groupe de travail précise que seront appelées « non viables » ou « mortes », toutes les bactéries qui ne sont pas considérées comme viables ou viables non cultivables selon les définitions précitées.

Différents facteurs chimiques et environnementaux sont soupçonnés de provoquer l'état VBNC d'une bactérie à Gram négatif non sporulante, dont l'indisponibilité des nutriments ou les traitements chimiques et thermiques de l'eau (Oliver 2000; Oliver 2009). L'existence d'un état VBNC a été décrite de longue date pour *L. pneumophila* (Hussong *et al.* 1987; Paszko-Kolvaa *et al.* 1992). En plus de la capacité à survivre dans les biofilms et au sein des protozoaires, l'entrée en état VBNC constitue pour *L. pneumophila* une forme de survie dans des conditions environnementales défavorables. Sa résistance réelle aux traitements chimiques lorsqu'elle est sous cette forme n'est pas connue, mais celle-ci serait potentiellement accrue par rapport à celle de la forme cultivable. En effet, une augmentation de la résistance à des substances chimiques telles que des antibiotiques et une capacité améliorée à surmonter divers stress thermiques ou acides, ont été décrits pour de nombreuses espèces bactériennes lorsqu'elles sont sous forme VBNC (Oliver 2009).

Seules les *Legionella* viables peuvent être à l'origine d'infections humaines et représenter un enjeu sanitaire. Parmi les *Legionella* viables, il est difficile de démontrer l'infectiosité des *Legionella* VBNC, car il n'est actuellement pas possible de démontrer que 100 % des bactéries sont VBNC dans une culture travaillée pour en produire (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Il est toutefois probable que ces dernières puissent représenter un risque sanitaire, car elles peuvent retrouver leur capacité de multiplication lorsque les conditions sont favorables (Bej *et al.* 1991; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Dusserre *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2006). De plus, Steinert *et al.* ont démontré, dès 1997, que les *L. pneumophila* VBNC pouvaient retrouver leur cultivabilité au contact d'amibes de l'espèce *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.* 1997). Garcia *et al.* ont également montré que *L. pneumophila* pouvait retrouver sa cultivabilité, perdue après un traitement de désinfection au chlore, par un passage dans l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (Garcia *et al.* 2007; Oliver 2009).

L'existence de formes VBNC pourrait expliquer en partie les recontaminations rapides parfois observées après le traitement d'un circuit d'eau chaude sanitaire par choc thermique ou chloration (Steinert *et al.* 1998; Thomas *et al.* 2004), alors que la recherche de *Legionella* par culture est négative. Pour évaluer leur rôle exact, il est également nécessaire de prendre en compte une possible présence de *Legionella* (cultivable ou non) dans le biofilm ou dans les amibes (Allegra *et al.* 2008).

Compte tenu de ces éléments, le risque associé à la présence de formes VBNC dans un échantillon d'eau doit être pris en considération dans l'interprétation des résultats.

2 Définitions des paramètres de caractérisation et de choix des méthodes d'analyses

2.1 Paramètres de performances

Les méthodes d'analyse doivent être choisies sur la base de leurs caractéristiques de performances. L'arrêté du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performances et la circulaire DGS/SD7A n° 2003-445 du 17 septembre 2003 concernant les modalités d'application de cet arrêté, apportent des précisions sur ces paramètres de performances. Une analyse des définitions de ces paramètres proposées dans l'annexe III de la directive n°98/83, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, ainsi que dans la norme XP T90-210 de décembre 1999¹⁷, y est notamment proposée pour la justesse, la fidélité et les limites de détection et de quantification.

Depuis, la norme XP T90-210 a été révisée et remplacée par la norme NF T90-210 de mai 2009. Cette norme intègre des définitions concernant les paramètres permettant d'évaluer les performances des méthodes d'analyse physico-chimiques appliquées au domaine de l'eau pour les paramètres chimiques, notamment pour les termes : exactitude, fidélité, justesse, écart-type de répétabilité, écart-type de fidélité intermédiaire, limite de détection, limite de quantification. Certains de ces paramètres sont cités dans les annexes II et V de l'arrêté du 17 septembre 2003. Les paramètres microbiologiques sont évoqués, mais sans précision sur d'éventuelles exigences de performance.

Il existe des lignes directrices pour valider une méthode d'analyse microbiologique (ISO/TR 13843:2000), mais leur application est limitée à la validation de méthodes basées sur le comptage direct de particules microbiennes au microscope ou sur la quantification des cellules capables de se multiplier sur un milieu de culture. Ces lignes directrices ne sont pas applicables pour la validation de méthodes basées sur la détection d'une activité de microorganismes par d'autres principes que celui de la culture. Il semble donc délicat d'en extraire des paramètres de performance permettant de caractériser l'ensemble des méthodes de détection et de quantification de *Legionella* dans l'eau.

Les critères d'ordre mathématique, permettant d'établir l'équivalence de méthodes analytiques microbiologiques, sont à distinguer des paramètres de performances de ces mêmes méthodes. Le présent chapitre ne traite pas de ces critères mathématiques tels que décrit dans la norme ISO 17994:2004(E). Ces critères sont abordés dans le chapitre 8.

Pour chaque paramètre évoqué dans ce chapitre, dans un souci de clarté, une définition a été choisie par le groupe de travail sur la base de la bibliographie et de son expertise.

2.1.1 Justesse

La **justesse**, au sens de la norme XP T90-210 correspond à l'**exactitude** telle que définie dans la directive 98/83 : *"l'erreur systématique égale à la différence entre la valeur moyenne d'un grand nombre de mesures répétées et la valeur exacte"*.

Elle est exprimée en pourcentage de la valeur de référence. Elle se détermine soit par application du paragraphe *"justesse"* de la norme XP T90-210 de décembre 1999 (paragraphe 6.3), soit par l'utilisation de matériaux de référence certifiés ou la participation à des essais inter-laboratoires.

Le projet de norme expérimentale XP T90-465-1 "Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques", du 15 février 2010, définit la notion de **justesse** comme *"l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée."*

Selon la norme NF T90-210 de mai 2009, comme dans le projet de norme expérimentale XP T90-465-1 du 15 février 2010, l'**exactitude** est *"l'étroitesse d'accord entre des résultats et la valeur de référence acceptée. Le terme exactitude, appliqué à un ensemble de résultats, implique une combinaison de composantes aléatoires (fidélité) et d'une erreur systématique commune ou d'un composant biais (justesse)."*

¹⁷ Norme XP T90-210 « Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire » de décembre 1999

Le protocole Afnor "Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence", dans sa version "Révision 0", adoptée le 28 juillet 2008, introduit également la notion d'**exactitude relative**, qui correspond au niveau de correspondance entre la réponse obtenue avec la méthode de référence et la réponse obtenue avec la méthode alternative sur les mêmes échantillons.

La définition retenue est : la **justesse (ou exactitude)** est l'écart entre des résultats et la valeur vraie. L'**exactitude relative** est l'écart entre des résultats et la valeur de référence acceptée.

2.1.2 Fidélité

La **fidélité** au sens de la norme XP T90-210 de décembre 1999 correspond à la **précision** telle que définie dans la directive 98/83 : "L'erreur aléatoire est exprimée en général comme l'écart-type (à l'intérieur du lot et entre les lots) de l'éventail des résultats sur la moyenne".

Dans la norme NF T90-210 de mai 2009, comme dans le projet de norme expérimentale XP T90-465-1 du 15 février 2010, la **fidélité** est définie par "l'écart-type de l'éventail des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées. Elle dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée". La fidélité est **égale à deux fois le coefficient de variation de reproductibilité intra-laboratoire** d'un grand nombre de mesures reproduites sur un échantillon d'eau naturelle présentant une concentration en analytes égale à la valeur paramétrique. Elle est exprimée en pourcentage de la valeur paramétrique.

Le protocole Afnor "Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence", dans sa version "Révision 0", adoptée le 28 juillet 2008, définit :

- la **reproductibilité** comme "l'écart-type de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les conditions de reproductibilité".
- la **répétabilité** comme "l'écart-type de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les mêmes conditions de mesure".

Le projet de norme expérimentale XP T90-465-1 du 15 février 2010, reprend la même définition de la **répétabilité**, en précisant que selon les pratiques du laboratoire, plusieurs techniciens peuvent travailler au sein d'une même série analytique et qu'il n'y a donc pas lieu de restreindre la notion de répétabilité à l'analyse par un seul technicien.

Ce projet de norme propose par contre une définition légèrement différente de la **reproductibilité** : "l'écart-type de l'accord entre les résultats des mesurages de la même quantité, effectués dans des conditions de mesure variables".

Selon la norme XP T90-210 de décembre 1999, la **reproductibilité intra-laboratoire est appréciée en répétant des analyses** dans un seul laboratoire avec la même méthode, en faisant intervenir plusieurs opérateurs ou instruments, et en particulier, en effectuant les mesures à des dates différentes.

La norme NF T90-210 de mai 2009 définit également :

- l'**écart-type de répétabilité** comme "l'écart-type de nombreuses répétitions obtenues dans un seul laboratoire par un même opérateur sur un même instrument, c'est-à-dire dans des conditions de répétabilité."
- L'écart-type de **fidélité intermédiaire** comme "l'écart-type de répétitions obtenues dans un même laboratoire dans des conditions de fidélité intermédiaire, c'est-à-dire avec des changements de conditions, parmi lesquelles : opérateur, étalonnage, équipements, environnement, temps écoulé entre les mesures".

Les définitions retenues sont :

- la **fidélité** (ou précision) est l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus sous des conditions stipulées. Elle dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée ;
- la **répétabilité** est l'étroitesse de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les mêmes conditions de mesurage ;
- la **reproductibilité** est l'étroitesse de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans des conditions de mesurage variables.

2.1.3 Sensibilité

Les deux principaux paramètres qui permettent de mesurer la sensibilité d'une méthode analytique sont ses limites de détection et le cas échant de quantification.

Les limites de détection et de quantification des méthodes dépendent en partie du mode de concentration de l'échantillon qui est souvent le même quelles que soient les techniques de détection utilisées ensuite (les deux techniques de concentration les plus répandues en routine sont la filtration et la centrifugation). Ainsi, pour comparer les limites de détection et de quantification des méthodes analytiques, il est important de savoir si les valeurs affichées tiennent compte de l'étape de concentration ou strictement de la méthode de dénombrement elle-même.

2.1.3.1 Limite de détection

Selon la directive 98/83/CE, la limite de détection correspond à *"3 fois l'écart-type relatif à l'intérieur du lot d'un échantillon naturel contenant une concentration peu élevée du paramètre, soit 5 fois l'écart-type relatif à l'intérieur du lot d'un échantillon vierge"*.

La définition proposée dans la circulaire du 13 septembre 2003 est *"la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente du blanc (avec une probabilité d'erreur donnée), mais non nécessairement quantifiée"*.

Quasi identique à cette dernière, la définition proposée dans la norme NF-T90-210 de mai 2009 est la *"plus petite quantité ou concentration d'un analyte dans l'échantillon d'essai qui peut être distinguée de manière fiable du zéro"*.

Selon le protocole Afnor *"Protocole de validation pour kits de détection et de dénombrement de Legionella et Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par q-PCR"*, dans sa version "Révision 0", adoptée le 26 septembre 2006, *"l'estimation de la limite de détection PCR consiste à connaître le plus petit nombre d'unités génome générant un résultat positif (une amplification) au seuil de confiance de 90 % selon le mode opératoire du laboratoire"*.

Selon le protocole Afnor *"Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence"*, dans sa version "Révision 0", adoptée le 28 juillet 2008, qui se réfère au projet de norme XP T90-465-1, la limite de détection correspond au *"niveau de charge bactérienne le plus faible pour lequel la probabilité¹⁸ d'un résultat positif (observation d'au moins un germe) est supérieur ou égale à 95% ou 99%"*.

La définition retenue est : la **limite de détection** est la plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente du blanc (avec une probabilité d'erreur donnée), mais non nécessairement quantifiée. Pour une limite de détection donnée, il est important de préciser la probabilité d'un résultat positif (observation d'au moins un micro-organisme) dans un échantillon contenant le micro-organisme recherché.

¹⁸ Selon une loi de probabilité théorique de type Poisson ou binomiale négative.

Anses

2.1.3.2 Limite de quantification

Selon la norme XP T90-210, c'est *"la plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé)"*.

La circulaire du 13 septembre 2003 précise qu'elle correspond à *"la plus petite valeur à partir de laquelle un résultat d'analyse peut être rendu avec une fidélité satisfaisante"*.

La définition proposée dans la norme NF-T90-210 de mai 2009 reprend les éléments des ces deux définitions : *"plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une exactitude définie"*.

Elle est exprimée dans l'unité du paramètre et peut être évaluée selon le principe de calcul défini au paragraphe 5.2. de la norme française NF T90-210.

Selon le protocole Afnor *"Protocole de validation pour kits de détection et de dénombrement de Legionella et Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par PCR"*, dans sa version *"Révision 0"*, adoptée le 26 septembre 2006, l'estimation de la limite de quantification q-PCR consiste à connaître le plus petit nombre d'unités génome générant un résultat quantifiable au seuil de confiance de 95 % selon le mode opératoire du laboratoire.

La définition retenue est : la **limite de quantification** est la plus petite valeur à partir de laquelle un résultat d'analyse peut être rendu avec une fidélité satisfaisante. Pour une limite de quantification donnée, il est important de préciser le seuil de confiance auquel la méthode est capable de produire un résultat quantifiable.

2.1.4 Spécificité et sélectivité

Aux quatre paramètres de performance déjà évoqués, particulièrement pour les méthodes d'analyse microbiologiques, il est intéressant, d'ajouter la **spécificité** et/ou la **sélectivité**.

Selon la norme XP T90-210 de décembre 1999, *"la spécificité est la propriété d'une méthode à convenir exclusivement à la détermination de la grandeur à mesurer, avec la garantie que le signal mesuré provient exclusivement de la grandeur à mesurer"*.

Dans le protocole Afnor *"Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence"*, dans sa version *"Révision 0"*, adoptée le 28 juillet 2008 :

- la **sélectivité** est définie comme *"une mesure du degré de non-interférence en présence d'analytes non ciblés. Une méthode est sélective si elle peut être utilisée pour détecter l'analyte recherché et s'il est certain que le signal détecté peut être généré uniquement par l'analyte concerné"* ;
- la **spécificité** relative est définie comme *"la capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas"*.

Une méthode est sélective si elle permet de sélectionner un événement parmi d'autres. C'est une mesure de capacité intrinsèque.

Une méthode est spécifique si elle donne le même résultat que la méthode de référence. C'est une mesure comparative.

L'utilisation de *"spécifique"* à la place de *"sélective"* est de fait un abus de langage courant en biologie. Il est néanmoins consacré par l'usage dans nombres de cas où la spécificité et la sélectivité sont des propriétés requises simultanément (on parle d'anticorps, de sondes, d'amorces, de marqueur spécifiques) et confèrent à la chose désignée une unicité.

Lorsque le terme s'applique strictement aux caractéristiques d'une méthode, les définitions retenues sont :

- la **sélectivité** est une mesure du degré de non-interférence en présence d'analytes non ciblés ;
- la **spécificité** est la capacité de la méthode à ne pas détecter l'analyte lorsqu'il n'est pas présent ;
- la **spécificité relative** est la capacité de la méthode alternative à ne pas détecter l'analyte lorsque la méthode de référence ne le détecte pas.

2.1.5 Rendement

Dans la norme FD ENV ISO 13843, d'octobre 2001 : *"Qualité de l'eau - Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques"*, le rendement est le terme général désignant le nombre de particules estimées dans une prise d'essai ou dans un échantillon, sachant qu'il y a un nombre réel (même s'il est inconnu) de particules dont 100 % ou moins est *"récupéré"* par le détecteur (FD ENV ISO 13843).

Selon la circulaire DGS/SD7A n°2003-445 du 17 septembre 2003 concernant les modalités d'application de l'arrêté relatif aux méthodes d'analyse d'échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performances, *"afin d'être validées, les méthodes utilisées devront faire apparaître un rendement d'extraction compris entre 60 % et 120 %"*. Il est précisé dans ce texte que des techniques quantitatives validées permettent de quantifier les molécules recherchées avec une justesse et une fidélité acceptables par rapport aux exigences de l'arrêté du 17 novembre 2003.

La définition retenue pour le rendement d'une méthode analytique est : l'expression en pourcentage du nombre de particules détectées dans une prise d'essai ou dans un échantillon, rapporté au nombre réel de particules présentes.

2.1.6 Linéarité

Le protocole Afnor *"Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence"*, dans sa version *"Révision 0"*, adoptée le 28 juillet 2008, introduit, dans le cas des méthodes quantitatives, la notion de **linéarité**. Celle-ci correspond à l'aptitude de la méthode, pour une matrice donnée, à fournir des résultats proportionnels à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon, c'est-à-dire qu'à une augmentation de l'analyte correspond une augmentation linéaire ou proportionnelle des résultats.

La définition retenue est : la notion de **linéarité** correspond à l'aptitude de la méthode, pour une matrice donnée, à fournir des résultats proportionnels à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon.

2.2 Autres paramètres de choix d'une méthode analytique

Dans le cadre du choix d'une méthode analytique, sa performance est déterminante. Cependant, d'autres paramètres peuvent également s'avérer déterminants en fonction du contexte. Sans que cette liste ne soit exhaustive, quelques-uns sont signalés dans le présent chapitre.

Pour compléter cette approche, le lecteur pourra également se référer aux normes suivantes :

- NF ISO 3534-1 : Statistique. Vocabulaire et symboles Partie 1 : probabilité et termes statistiques généraux.
- PR EN ISO 16140 : Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives - Partie 1: Terminologie pour la validation des méthodes ; Partie 2: Protocole pour la validation des méthodes propriétaires par rapport à une méthode de référence.

2.2.1 Rapidité

Pour étudier des méthodes analytiques potentiellement utilisables en routine, dans un cadre réglementaire, la **rapidité**, semble être un paramètre de performance important à prendre en compte (FAO 1997).

2.2.2 Champ d'application

Le champ d'application est la gamme de matrices auxquelles s'appliquent les caractéristiques de performance (FAO 1997).

2.2.3 Robustesse

Selon la norme FD ENV ISO 13843, la robustesse est l'insensibilité d'une méthode d'analyse aux faibles modifications de la méthode. Elle correspond également à la "fiabilité" telle que définie par la FAO dans un rapport de 1997, qui la définit comme la "*solidité, non-dépendance relative à l'égard des compétences de l'opérateur*".

2.2.4 Simplicité

Dans le présent document, ce paramètre est regroupé dans les mêmes sous-chapitres que la robustesse (FAO 1997).

3 Attentes relatives à une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

Le premier réflexe pour décrire une méthode analytique est d'examiner ses performances techniques, précédemment évoquées : sélectivité, spécificité, sensibilité, répétabilité intra-laboratoire, reproductibilité inter-laboratoires, justesse, fidélité ou encore rendement. Il est bien sûr souhaitable que les méthodes soient les plus performantes possibles vis-à-vis de l'ensemble de ces paramètres.

Il apparaît également important qu'une méthode analytique destinée au dénombrement de *Legionella* dans l'eau ait été évaluée sur le plan du rendement¹⁹, qu'elle possède une limite de quantification basse et le cas échéant inférieure aux valeurs cibles réglementaires et qu'elle soit sélective de la cible qui sera choisie (*L. pneumophila*, *L. spp*, bactéries cultivables, bactéries viables non cultivables, bactéries intracellulaires, etc.).

Le coût est également un aspect important à prendre en compte pour le choix d'une méthode analytique. Cependant il dépend directement du nombre d'analyses envisagé. Par ailleurs, les analyses de routine sont souvent réalisées par des laboratoires analytiques prestataires, pour le compte de clients gestionnaires d'installations. Ainsi, le prix de vente unitaire des analyses est non seulement fixé en fonction de leur coût de revient, mais également en fonction de la stratégie commerciale du laboratoire. Dans ces conditions, étant donné les objectifs de ce rapport, il ne semble pas opportun de retenir le coût unitaire des analyses comme un critère de choix des méthodes.

D'autres critères peuvent être pris en compte pour évaluer la pertinence d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. Le tableau 1 présente ces critères et les niveaux d'importance qui ont été attribués dans le cadre de ce rapport, au regard de la problématique posée.

Par ailleurs, il est postulé que les utilisateurs des méthodes décrites sont des hommes de métier, qui maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'abordera donc pas les problèmes de sécurité inhérents à l'utilisation des méthodes décrites. Il incombe aux utilisateurs de mettre en œuvre des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité des procédures et des conditions de manipulation aux réglementations nationales en vigueur.

Chaque description de méthode est assortie d'un tableau présentant les avantages et les inconvénients intrinsèques théoriques de la méthode. Ils sont définis en fonction, des critères listés et priorisés dans le Tableau 1, de leur pertinence pour le suivi des installations d'eau chaude sanitaire et des tours aérorefrigérantes, et de leur décontamination après le dénombrement de *Legionella* à des niveaux supérieurs aux valeurs cibles réglementaires.

¹⁹ Fraction de la cible détectée par rapport à la cible présente dans l'échantillon.

Anses

Tableau 1 : Pertinence, pour le contrôle sanitaire et la surveillance, des critères de sélection d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, dans les contextes du suivi des réseaux d'eau chaude sanitaire (ECS), des tours aэрoréfrigérantes (TAR) et des décontaminations.

	ECS	TAR	Décontamination
Critères relatifs aux cibles			
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i>	++++	++++	++++
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1	+++	+++	+/-
Distinction et quantification des sérogroupes autre que sg1	++	++	+/-
Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp	++	++	++
Identification des différentes espèces de <i>Legionella</i> présentes dans l'échantillon	+/-	+/-	+/-
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification	+++	+++	+++
Quantification sélective des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires	+/-	+/-	+/-
Critères relatifs à l'état physiologique des <i>Legionella</i> détectées			
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+++	+++	+++
Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes	+++	+++	+++
Critères relatifs au contexte pratique de mise en œuvre			
Rapidité des résultats (hors crise)	+++	+++	+++
Faisabilité, simplicité	++	++	++
Equipements nécessaires limités	++	++	++
Faibles coûts (global)	++	++	++
Temps technicien faible	++	++	++
Critères relatifs à l'interprétation des résultats			
Interprétation technique simple des résultats bruts	++	++	++
Interprétation pour le risque sanitaire disponible	+++	+++	+++
Critères relatifs aux champs d'application			
Applicable sur des échantillons d'eau chargée	++	++	+/-
Applicable sur des échantillons d'eau traitée	+++	+++	+++
Permet de disposer de souches pour des études complémentaires	++	++	++

++++ indispensable ; +++ priorité élevée ; ++ priorité modérée ; +/- peu ou pas pertinent

4 Description des étapes de préparation et de prétraitement des échantillons préalables à un dénombrement de *Legionella*

Les étapes de prétraitement des échantillons influencent directement les résultats des dénombrements de *Legionella* dans l'eau exigés par la réglementation. Le présent chapitre est consacré à la description de leurs principes et objectifs.

Avant cela, il semble important d'évoquer l'impact que peut avoir l'échantillonnage et la méthode de prélèvement sur les résultats des méthodes de dénombrement mises en œuvre.

4.1 Echantillonnage

Il est clair que l'échantillonnage et la méthode de prélèvement d'un échantillon environnemental influencent le résultat d'analyse obtenu. Différents facteurs peuvent entraîner des pertes de rendement du dénombrement des bactéries réellement présentes dans un échantillon d'eau (Ballard *et al.* 2000; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005) :

- la survie de la bactérie cible dans les échantillons prélevés (conditions de conservation appropriées à la méthode d'analyse) ;
- l'étape de concentration (centrifugation ou filtration) ;
- la décontamination éventuelle de l'échantillon par la chaleur (30 minutes à 50°C) ou par une solution acide (5 minutes à pH = 2) ;
- la sonication et le grattage.

La description des méthodes de prélèvement ne fait pas l'objet du présent document. Cependant, il est important de préciser que la compatibilité de la méthode de prélèvement avec la méthode d'analyse choisie doit être vérifiée.

Il existe une norme ISO 19458 (2006), relative à l'échantillonnage pour les analyses microbiologiques des eaux. Cette norme générale décrit le nombre d'échantillons à analyser pour déterminer la concentration moyenne de bactéries présentes dans l'eau, avec un niveau de confiance donné.

Plus spécifiquement, pour la recherche de *Legionella* dans les eaux, il existe un guide de prélèvement, sous la forme d'un Fascicule de documentation FD T 90-522 (2006). Il est conçu pour l'échantillonnage préalable à la recherche de *Legionella* spp ou de *L. pneumophila* dans les eaux chaudes sanitaires, les eaux d'agrément ou de baignade et les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (IRDEFSA). Ce guide a été élaboré de manière à être compatible avec les deux méthodes de dénombrement de *Legionella* les plus répandues : culture (NF T90-431) et q-PCR (NF T90-471).

Dans les deux cas, les volumes de prélèvement préconisés sont variables en fonction des situations et des méthodes analytiques.

Dans certaines situations, il peut être intéressant que la méthode analytique dans son ensemble ou tout au moins le prélèvement et l'échantillonnage mis en œuvre, permettent la réalisation d'études complémentaires, notamment épidémiologiques.

4.2 Etape de concentration

Trois méthodes de concentration des échantillons ont été répertoriées : la filtration, la centrifugation et la séparation immuno-magnétique. Les deux premières ne sont pas sélectives, contrairement à la séparation immuno-magnétique qui permet théoriquement une concentration sélective de la cible de l'analyse.

4.2.1 Filtration

La filtration peut être utilisée dans le cas d'une eau suffisamment peu chargée en matières en suspension ou en colloïdes pour être filtrable sans problème de colmatage du filtre. Le principe est de faire passer un volume du liquide donné sur un filtre qui va retenir notamment les bactéries cibles de l'analyse et laisser passer le liquide ainsi que les particules plus petites que le seuil de coupure du filtre. Le retentât²⁰ obtenu contient les bactéries recherchées.

²⁰ Ce qui ne traverse pas la membrane de filtration.

Anses

Différentes normes décrivent des méthodes de filtration pour la concentration préalable à une recherche de *Legionella* dans l'eau.

Selon la norme européenne NF EN ISO 11731-2 (juillet 2008), relative à la recherche et au dénombrement de *Legionella* - Partie 2 "Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries", le volume des échantillons prélevés dépend de la nature de l'eau et de la finalité de l'examen effectué. Il est donc préconisé de filtrer 10 mL à 1 000 mL de l'échantillon d'eau sur membrane en nitrate de cellulose de porosité moyenne 0,45 µm. Pour réduire au minimum la croissance des bactéries non *Legionella*, l'échantillon doit être traité avec un tampon acide directement dans l'entonnoir du filtre. Il est important de noter que la filtration de volumes importants d'échantillon peut favoriser la concentration de substances toxiques vis-à-vis de la croissance sur la membrane filtrante. Ainsi, une variation du rendement de récupération des bactéries lorsque les volumes de filtration sont plus importants peut-être liée à la présence de substances inhibitrices, à l'état physiologique des bactéries présentes et à leurs capacités d'agrégation. La membrane ainsi obtenue est directement placée sur la boîte du milieu de culture (milieu BCYE ou GVPC). La méthode décrite dans cette norme, à la suite de cette concentration, correspond à une analyse de l'échantillon par culture. Une correspondance avec la norme française NF T 90-431 est d'ailleurs mentionnée.

Selon la norme NF T90-431 (septembre 2003), relative à la recherche et au dénombrement de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation, 1 L d'eau, ou dans le cas des eaux sales et/ou non filtrables 500 mL, doit être filtré sur une ou plusieurs membrane(s) en polycarbonate de porosité 0,45 µm puis la membrane doit être :

- soit grattée dans 5 mL d'eau purifiée stérile ou d'eau de l'échantillon ;
- soit immergée dans 5mL d'eau purifiée stérile ou d'eau de l'échantillon au sein d'un récipient stérile placé au milieu d'une cuve à ultrasons.

Le concentrât ainsi obtenu peut ensuite être analysé par culture.

Selon la norme NF T90-471 (avril 2010), relative à la détection et quantification de *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, lorsque des membranes filtrantes sont utilisées, elles doivent être en polycarbonate ou tout autre composé ayant une faible capacité d'adsorption des protéines et de l'ADN²¹, de porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm. Le volume d'échantillon filtré doit être si possible compris entre 100 mL et 1 L. Ce volume doit être pris en compte pour l'expression de la limite de quantification et la limite de détection. La réduction du volume filtré a un impact important sur ces valeurs qui augmentent proportionnellement.

Compte tenu de ces éléments il apparaît que le principe et le mode opératoire de la méthode de concentration par filtration sont déjà précisément décrits. Il faut cependant noter que des variantes apparaissent en fonction du type d'analyse que doit subir l'échantillon, notamment en termes de volume d'échantillon avant filtration nécessaire et de remise en suspension ou pas de l'échantillon concentré.

4.2.2 Centrifugation

La centrifugation est utilisée dans le cas des eaux chargées et/ou non filtrables. Le principe est de soumettre l'échantillon à une force centrifuge, qui a pour effet d'accélérer la séparation des particules en suspension dans le liquide. Ainsi, les bactéries recherchées se retrouvent concentrées dans le culot et en théorie absentes du surnageant. Le concentrât à analyser est obtenu après extraction du surnageant.

Selon la norme NF T90-431, après homogénéisation, 500 mL de l'échantillon sont centrifugés dans 1 ou 2 récipients stériles à fond conique à 30 000 m.s⁻² (3000 g), pendant 30 min, à une température comprise entre 15 °C et 25 °C. Le surnageant est ensuite éliminé stérilement par aspiration en laissant le culot dans 5 mL du surnageant. Le concentrât ainsi obtenu pourra être analysé par culture après remise en suspension.

La norme expérimentale XP T90-471 (avril 2006), relative à la détection et quantification de *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, mentionnait la possibilité de réaliser la concentration par centrifugation, sous réserve qu'elle fasse l'objet d'une optimisation, testée par la validation du

²¹ Ne surtout pas utiliser de membrane contenant de la cellulose.

Anses

rendement. Cependant sa version révisée, la norme NF T90-471, n'évoque plus la possibilité d'utiliser une centrifugation comme moyen de concentration.

Ainsi, le principe et le mode opératoire de la méthode de concentration par centrifugation sont également déjà précisément décrits.

4.2.3 Séparation immuno-magnétique (IMS)

Le principe de cette méthode repose sur la capture sélective des bactéries par des anticorps fixés sur des billes magnétiques, à partir d'un échantillon liquide plus ou moins complexe (eau chaude sanitaire, eau de tour aëroréfrigérante, biofilm dissocié, etc.). La méthode permet théoriquement la capture des cellules présentant l'épitope ciblé par l'anticorps utilisé (Riffard *et al.* 2001).

La méthode n'est pas normalisée pour l'application aux *Legionella*. Toutefois, l'utilisation de cette technique est décrite dans la norme NF T90-455 de juillet 2001 "Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* - Méthode de concentration et de dénombrement".

Sans tenir compte de la préparation de l'échantillon, il faut compter au moins 30 minutes d'incubation sous agitation entre le complexe billes magnétiques-anticorps et l'échantillon liquide et prévoir ensuite des lavages avant révélation de la séparation immuno-magnétique (IMS) par la technique d'analyse choisie.

Les anticorps utilisables sont ceux présentant une affinité suffisante pour permettre une capture sélective des *Legionella*, notamment ceux utilisés par les techniques d'immuno-détection appliquées aux *Legionella*.

Dans le contexte *Legionella*, un kit d'immuno-capture est commercialisé avec pour objectif de simplifier et d'augmenter la rapidité d'obtention du résultat de détection de *Legionella* spp. dans des échantillons d'eau ou des échantillons environnementaux. Ce kit est destiné à tester plusieurs espèces de *Legionella* (*Legionella pneumophila* dont le séro-groupe 1, *L. bozemanii*, *L. brunensis*, *L. dumoffii*, *L. micdadei* et *L. anisa*) à partir d'échantillons d'eaux environnementales ou artificiellement contaminées, de biofilms ou de suspension complexes. Selon le fabricant, il permet de récupérer des *Legionella* à partir d'un inoculum d'eau stérile contenant moins de 100 UFC/L.

La limite de détection de l'analyse dépend de la méthode analytique mise en œuvre après la concentration. Les performances de la séparation immuno-magnétique peuvent être évaluées en calculant un rendement de récupération, c'est à dire en comparant le nombre, la quantité ou l'intensité du signal récupéré après la technique d'analyse choisie seule et après combinaison de l'IMS avec la technique d'analyse. Pour les 4 études publiées sur *Legionella*, les rendements de récupération obtenus sur suspensions pures en *Legionella* ou faiblement contaminées sont toujours supérieurs à 50%. Le pourcentage de valeurs prédictives négatives est lié à la spécificité par rapport à la cible de l'anticorps. Ces pourcentages varient extrêmement (de 8 % à plus de 95 %) en fonction de la complexité des échantillons : eaux chaudes sanitaires, eaux de tours aëroréfrigérantes, biofilms (Fuchslin *et al.* 2010; Riffard *et al.* 2001; Sethi *et al.* 2007; Yanez *et al.* 2005). Concernant l'utilisation de l'IMS en combinaison avec la culture, l'efficacité de l'IMS est d'autant plus forte que l'échantillon est complexe. A titre d'exemple, un échantillon rendu non interprétable en culture, à cause d'une importante flore interférente, peut être rendu quantifiable en réalisant une IMS préalablement à la culture (Riffard *et al.* 2001).

5 Description des méthodes de dénombrement sélectives de *Legionella* utilisant un principe unique

Ce chapitre est destiné à décrire le plus exhaustivement possible les méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. Certaines méthodes encore trop peu développées et documentées pour permettre une évaluation de leurs avantages et inconvénients sont succinctement décrites dans les sous chapitres « Evolutions possibles des méthodes ».

Rappelons que l'objectif de ce travail est d'évaluer l'aptitude de ces méthodes à répondre aux besoins du dénombrement de *Legionella* dans le contexte des eaux chaudes sanitaires et des tours aérofrigorifères.

La méthode de prélèvement utilisée doit prendre en compte la compatibilité avec les modes de prélèvement faisant actuellement l'objet de guides techniques ou de norme.

5.1 Méthodes basées sur la croissance.

5.1.1 Culture

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par culture, fait l'objet de la norme Afnor NF°T90-431 (septembre 2003). Actuellement, en France, elle est la seule méthode officiellement reconnue par les autorités sanitaires.

5.1.1.1 Principe

Le principe de la méthode de dénombrement par culture est d'ensemencer un échantillon sur un milieu de culture, pour compter le nombre de colonies qui se forment après une incubation à une température donnée. La sélectivité de la méthode dépend de celle du milieu de culture utilisé et de la température d'incubation.

La méthode de recherche et de dénombrement de *Legionella* spp. et de *Legionella pneumophila* dans l'eau telle que décrite dans la norme Afnor NF T90-431 prévoit une incubation à 36°C, sur milieux de culture sélectifs (milieu GVPC) durant 8 à 10 jours et leur examen au moins à trois reprises à partir de 3 à 4 jours de culture, jusqu'à la fin de la période d'incubation. Ces examens permettent le repérage des colonies potentiellement positives.

Les colonies caractéristiques de *Legionella* sont ensuite repiquées sur différents milieux de culture pour confirmation. Après une période d'incubation de 2 à 4 jours, un examen de ces milieux permet le dénombrement de *Legionella*. Sont considérées comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu GVPC et sur un milieu BCYE riche en L-cystéine, mais ne se développent pas sur le milieu BCYE sans L-cystéine et/ou gélose au sang ou gélose nutritive, deux milieux non sélectifs. Les exigences nutritives des *Legionella* sont précisées dans la description des milieux de culture, présentée dans le sous-chapitre "5.1.1.6. Matériel nécessaire"

Lorsque *Legionella* est dénombrée, un test d'agglutination au latex ou par immunofluorescence directe est pratiqué afin d'identifier l'espèce *L. pneumophila* (NF T90-431). Ces tests permettent également d'identifier le sérotype 1 de *L. pneumophila* bien que cela ne figure pas dans les normes.

La méthode décrite dans la norme ISO 11731-2 reprend le même principe général. Les bactéries, y compris les *Legionella*, sont concentrées par filtration sur membrane. Après filtration, le filtre est traité avec un tampon acide placé directement sur l'entonnoir, pour réduire la croissance des bactéries autres que *Legionella*. La différence essentielle avec la norme NF T90-431, réside dans le fait que le filtre est ensuite transféré sur une boîte de culture et incubé à 36 °C pendant au moins 10 jours (ISO 11731-2). Elle permet une culture de *Legionella* directement sur filtres mais qui contrairement à la NF T90-431 ne permet d'analyser que des eaux à faible teneur en bactéries, qui sont précisément définies dans le sous-chapitre "Matrice d'application". Si une inhibition ou une croissance importante de microorganismes est suspectée, cette norme prévoit le réexamen de volumes plus faibles ou de dilutions de l'échantillon. Cette méthode n'est actuellement pas préconisée par la réglementation française.

5.1.1.2 Informations apportées par les résultats

Les résultats des méthodes de dénombrement par culture sont exprimés en nombre d'unités formant colonies de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* par litre d'eau (UFC/l) (NF T90-431 ; ISO 11731-2).

Anses

Seules les bactéries cultivables sont dénombrées. Ainsi, quand les cellules de *Legionella* perdent leur caractère cultivable (VBNC), même si elles restent viables, elles ne sont plus détectables avec une méthode par culture. (Byrd *et al.* 1991; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Hay *et al.* 1995; Hussong *et al.* 1987; Murga *et al.* 2001; Oliver 2000; Oliver 2009; Yamamoto *et al.* 1996).

Le dénombrement sur milieu de culture de *Legionella* contenues dans des protozoaires ou des vésicules externes de ces protozoaires est peu documenté. Il existe des incertitudes quant à la capacité de la méthode normalisée par culture à les dénombrer (Hay *et al.* 1995).

5.1.1.3 Matrice d'application

La méthode décrite dans la norme NF T 90-431 est applicable à tous les types d'eaux propres (eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles à usage thermal, eaux récréatives, etc.) et d'eaux sales (industrielles, naturelles, etc.). En pratique, le dénombrement de *Legionella* dans des eaux chargées non filtrable reste cependant délicat avec cette technique. La concentration de l'échantillon est réalisée par :

- filtration sur membrane de polycarbonate de 0,45µm de porosité pour une eau filtrable, suivie d'une remise en suspension des bactéries retenues sur la membrane dans 5 mL d'eau stérile, par sonication ou grattage (NF T90-431) ;
- ou par centrifugation pour les échantillons non filtrables, suivie d'une remise en suspension du culot dans 5 mL d'eau stérile (Circulaire DGS 2005/315 ; NFT90-431).

La méthode décrite dans la norme ISO 11731-2 est applicable uniquement aux eaux à usage humain (eau chaude, froide, lavage), eaux destinées à la consommation humaine et eaux de baignade traitées (piscines). Une norme ISO 11731-1, en cours de préparation, devrait être applicable aux sédiments, dépôts et biofilm.

5.1.1.4 Echantillon nécessaire

Selon la norme NF T90-431, le volume de l'échantillon est d'1 L pour une eau filtrable (peu chargée, comme les eaux de consommation humaine) ou de 0,5 L pour une eau chargée (non filtrable) (Circulaire DGS 2005/315).

Selon la norme NF EN ISO 11731-2, l'échantillon est composé de 10 mL à 1 L (pour une eau filtrable).

La plupart des auteurs d'études expérimentales qui mettent en œuvre la culture utilisent des échantillons d'1 L. Ce volume permet un compromis entre sensibilité de la méthode et faisabilité de sa mise en œuvre (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Yaradou *et al.* 2007).

Dans tous les cas l'échantillon doit parvenir au laboratoire dans les 48 heures (stockage à 4°C) (NFT90-431 ; NF EN ISO 11731-2).

5.1.1.5 Paramètres de performance

5.1.1.5.1 Justesse

Cette méthode sous estime le nombre de *Legionella* en présence d'une flore interférente pouvant se développer plus rapidement que *Legionella* sur les milieux de culture non sélectif (BCYE). Pour résoudre ce problème, la norme NF T90-431 impose l'utilisation du milieu sélectif GVPC, censé inhiber la croissance de la flore interférente. Les faux positifs, la méthode en minimise le nombre, du fait de la sélectivité des milieux utilisés. Cependant, cette inhibition n'est pas totale et ce milieu de culture inhibe également la croissance de certaines *Legionella* (Allegra *et al.* 2008).

Concernant les faux négatifs, la méthode ne détecte pas les bactéries viables non cultivables. De ce fait, selon certains auteurs, la concentration en *Legionella* dans les échantillons environnementaux serait largement sous-estimée (Allegra *et al.* 2008; Doleans *et al.* 2004; Fields *et al.* 2002). Pour la méthode normalisée, l'existence de faux négatifs a notamment été démontrée pour des échantillons contenant des amibes. Dans ce cas, elle est interprétée comme une détection ou un dénombrement erroné des *Legionella* présentes dans les amibes (Hay *et al.* 1995).

Concernant la répétabilité, des précisions, basées sur des données d'analyse de routine, sont apportées dans la synthèse des auditions menées par le groupe de travail, présentée au point 10.2 de ce rapport.

5.1.1.5.2 Fidélité, reproductibilité

Concernant la reproductibilité de la méthode, le coefficient de variation maximum observé serait de l'ordre de 10 % (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Sur ce point des précisions, basées sur des données d'analyse de routine, sont apportées dans la synthèse des auditions menées par le groupe de travail, présentée au point 10.2 de ce rapport.

5.1.1.5.3 Sensibilité

Parmi les facteurs qui peuvent entraîner des pertes de rendement au cours des différentes phases aboutissant au dénombrement des bactéries par culture, la présence de microorganismes autres que *Legionella*, peut jouer un rôle majeur en envahissant les milieux nutritifs par un effet bactéricide qui leur est propre (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

Il n'a pas été montré si toutes les espèces de *legionella* ont la même capacité de croissance en culture sur le milieu GVPC (Luck *et al.* 2004).

Le rendement peut également varier en fonction des caractéristiques de l'eau analysée. Pour la méthode par culture, selon certains auteurs, il est de l'ordre de :

- 70 % pour l'analyse d'une eau de réseau hospitalier (Wellinghausen *et al.* 2001) ;
- 10 à 30 % pour l'analyse d'eau environnementale²² (Ballard *et al.* 2000; Boulanger and Edelstein 1995)

La limite de détection est variable en fonction des caractéristiques de l'eau analysée (NFT90-431 ; Circulaire DGS 2005/315) :

- 50 UFC/L pour un échantillon d'eau peu chargée filtrable, comme l'eau du robinet ;
- 100 UFC/L pour un échantillon d'eau chargée non filtrable, comme l'eau d'un circuit de refroidissement, et qui nécessite une centrifugation de l'échantillon.

La limite de quantification est également variable en fonction des caractéristiques de l'eau analysée (NFT90-431 ; Circulaire DGS 2005/315) :

- 250 UFC/L pour un échantillon d'1 L d'eau peu chargée filtrable ;
- 500 UFC/L pour un échantillon d'1 L d'eau chargée non filtrable.

5.1.1.5.4 Spécificité, sélectivité

Selon la norme NF T90-431, la méthode de dénombrement par culture est spécifique de *L. pneumophila* et de *L. spp.* Il faut cependant noter ici que les milieux de culture utilisés permettent parfois la croissance d'autres genres que *Legionella*. Par ailleurs ils sont également susceptibles de limiter la croissance de certaines espèces du genre.

Le milieu de culture sélectif préconisé dans la norme est le milieu GVPC. Il permet une relativement bonne sélectivité du genre *Legionella*, même s'il n'exclut pas totalement la croissance d'autres genres. Les tests complémentaires de croissance et immunologiques imposés dans la norme AFNOR T90-431 permettent de confirmer que les colonies cultivées sont bien du genre *Legionella* et d'augmenter ainsi la spécificité.

5.1.1.5.5 Rapidité

Selon la norme NF T90-431, le temps nécessaire à un dénombrement de *L. pneumophila* par culture est compris entre 8 et 14 jours (à réception au laboratoire) : 1 jour pour le prétraitement de l'échantillon (filtration ou centrifugation, traitement acide ou thermique et ensemencements), 8 à 10 jours d'incubation et 2 à 4 jours de confirmation de l'identification.

En pratique, en cas de présence de *Legionella* dans l'eau en grande quantité, la méthode par culture permet de mettre en évidence un dépassement des valeurs cibles par une pré-lecture après 3 à 5 jours d'incubation. Le cas échéant, une première information peut donc être transmise plus rapidement au gestionnaire que les 14 jours définis par la norme.

5.1.1.6 Matériel nécessaire

Les milieux de culture utilisés dans le cadre d'un dénombrement par culture ont une importance cruciale pour les résultats d'analyse, notamment dans la sélectivité de la méthode. Leur description

²² Eau non préparée artificiellement.

précise et la bonne compréhension de leurs objectifs respectifs est importante. Les milieux dont l'utilisation est prévue dans la norme NF T90-431 sont les suivants :

- BCYE (Buffered charcoal yeast extract) avec et sans L-cystéine:
Ces deux milieux gélosés sont destinés à la confirmation des colonies obtenues sur gélose GVPC (défini ci-dessous). Leur composition est normalisée (NFT90-431, NF EN ISO 11731-2). Les géloses BCYE et BCYE sans cystéine ne diffèrent que par la présence ou non de cystéine dans le milieu. L'extrait autolytique de levure constitue le substrat nutritif permettant une croissance bactérienne. Le charbon actif assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène produit par le métabolisme bactérien, la capture du dioxyde de carbone et modifie la tension superficielle (Feeley *et al.* 1979). Le tampon ACES²³/KOH assure le maintien du pH et permet d'incuber les milieux en aérobiose (Pasculle *et al.* 1980). La cystéine, lorsqu'elle est présente, et le pyrophosphate ferrique, représentent des éléments nutritifs indispensables pour la culture des *Legionella* (Feeley *et al.* 1978), alors que l' α -cétoglutarate est un activateur de leur croissance (Edelstein 1981).
- GVPC (Glycine Vancomycine Polymyxine Cycloheximide) :
La gélose sélective GVPC pour *Legionella* est destinée au dénombrement, à l'isolement et à la culture des espèces de *Legionella*. Sa composition est décrite précisément dans la norme NF T90-431. Elle est quasi identique à la gélose BCYE avec cystéine, à la présence près de glycine, vancomycine, polymyxine B (Wadowsky and Yee 1981) et cycloheximide (Dennis *et al.* 1984), dont l'association peut inhiber la présence d'une possible microflore secondaire²⁴. Les colonies de *Legionella* ont le plus souvent un aspect caractéristique à la loupe binoculaire dit en verre fritté.
- Gélose au sang
Peu sélective, la gélose au sang permet cependant d'apprécier le pouvoir hémolytique de certaines bactéries (Afnor NFT90-431). Ce milieu de culture bien que relativement riche, ne permet pas la culture de *Legionella*, de même que le BCYE sans cystéine. Ainsi une culture positive sur BCYE sans cystéine et sur Gélose au sang exclut une *Legionella*.
- Gélose nutritive
Selon la norme Afnor NFT90-431, « La gélose nutritive est un milieu de culture non sélectif de composition souvent empirique, dont la formulation apporte les éléments nutritifs nécessaires à la croissance d'une grande variété de germes non exigeants. Au stade de la confirmation des colonies caractéristiques obtenues sur le milieu sélectif, la manifestation de cultures sur la gélose nutritive permet d'éliminer les germes non-cibles, infirmant ainsi la présence de *Legionella* dont la croissance est dépendante de la présence de cystéine, acide aminé absent de la composition de ce milieu. »

Le matériel nécessaire à la mise en œuvre de cette méthode comprend également :

- Les kits de test d'agglutination au latex ou les kits de test par immunofluorescence directe pour caractériser l'espèce *pneumophila* et les sérogroupes ;
- L'incubateur à 36°C ;
- La loupe binoculaire ;
- L'unité de filtration et/ou la centrifugeuse ;
- Les cuves à ultrasons ;
- Le bain-marie à 50 +/- 1 °C ;
- Le microscope en fluorescence ;
- Les consommables évoqués dans la norme NF T90-431.

5.1.1.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

La méthode par culture est potentiellement maîtrisée par tout laboratoire de microbiologie pour la recherche et l'analyse de routine en milieu hospitalier, environnemental, etc.)

²³ Tampon ACES : acide N₂-acétamido-2-amino-éthane-sulfonique

²⁴ La vancomycine est une molécule inhibitrice de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Mais, du fait de son poids élevé, elle ne peut emprunter les porines de la membrane externe des Gram négatifs. Elle n'affecte donc que les bactéries Gram positifs. La concentration élevée en glycine inhibe également fortement la flore secondaire Gram+. La polymyxine B est un surfactant cationique affectant la structure de la membrane de la cellule bactérienne en interagissant avec ses phospholipides. Elle possède un effet bactéricide sur les bacilles Gram négatifs. Le cycloheximide est un inhibiteur de la synthèse protéique des cellules eucaryotes. Il est utilisé ici comme antifongique, car il est inhibiteur de croissance des mycètes.

5.1.1.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode par culture

Tableau 2 : avantages et inconvénients de la culture

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ²⁵
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> • Quantification <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1 • Non détection des <i>Legionella</i> mortes • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles • Applicable sur des échantillons d'eau traitée 	<ul style="list-style-type: none"> • Incertitude sur la prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification • Ne détecte pas l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Méthode lente 	
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Distinction et quantification des sérogroupes Lp autre que sg1 • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp • Faisabilité, simplicité • Equipements nécessaires faibles • Interprétation technique simple des résultats bruts • Permet de disposer de souches pour des études complémentaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut ne pas être applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement) • Temps technicien important 	

5.1.2 Direct Viable Count (DVC)

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par DVC, ne fait actuellement pas l'objet d'une norme.

5.1.2.1 Principe

La méthode de dénombrement appelée DVC (direct viable count) (Kogure 1979 ; Joux 1997 ; Singh 1989 ; Peele 1981 ; Altug 2010 ; Barcina 1995) permet en un temps réduit d'estimer la capacité d'une bactérie à se diviser et donc par extrapolation, d'apprécier son potentiel de génération d'une colonie. Il est basé sur l'utilisation d'un cocktail d'antibiotiques capables de bloquer la division bactérienne sans pour autant altérer le métabolisme bactérien. Dans ces conditions, en présence de nutriments et d'antibiotiques quantitativement et qualitativement adaptés, et d'un temps d'incubation à une température optimale, les bactéries viables capables de s'allonger sans pouvoir se diviser vont ainsi s'allonger et atteindre une taille plus importante que celle observée avant incubation. Au stade actuel de développement du DVC, il est encore difficile de fixer une taille de cellule à partir de laquelle elles sont considérées comme plus longues que la normale, d'autant plus pour les *Legionella* qui sont connues pour filamenter dans certaines conditions environnementales stressantes. La détection des bactéries allongées ou non se fait après marquage par des fluorochromes et comptages au microscope à épifluorescence.

En optimisant le choix des antibiotiques, le procédé en lui-même et surtout le milieu de culture, il est possible d'estimer le nombre de *L. pneumophila* viables (capables de se diviser) dans un échantillon, en 12h. Afin de distinguer sélectivement *L. pneumophila* des autres bactéries ou cellules contenues dans un échantillon environnemental, il est nécessaire d'y associer une technique d'identification sélective (ex : hybridation *in situ* FISH).

5.1.2.2 Informations apportées par les résultats

Les résultats de cette méthode sont exprimés en nombre de cellules bactériennes viables capable de se diviser par litre d'eau (cellules/L). La lecture est réalisée au microscope.

En utilisant des milieux de culture adaptés (BCYE), la méthode DVC permet le dénombrement de *Legionella* spp. et *L. pneumophila* dans les eaux. Cette méthode est cependant soumise à des limites

²⁵ Par manque de données

Anses

relativement proches de celle de la méthode par culture telle que décrite dans la norme (NF T90-431), pour l'analyse des eaux chargées (non filtrables).

5.1.2.3 Matrice d'application

Selon certains auteurs, cette méthode permet de détecter sélectivement les bactéries d'une espèce donnée dans un mélange ou un échantillon environnemental (Rudi *et al.* 2005). Cependant les publications relatives à son utilisation sur des échantillons d'eaux environnementales sont rares.

5.1.2.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.5 Paramètres de performance

5.1.2.5.1 Justesse

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.5.2 Fidélité, reproductibilité

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.5.3 Sensibilité

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.5.4 Spécificité, sélectivité

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.5.5 Rapidité

Le temps nécessaire est de 1 à 2 jours, dont 12 heures d'incubation.

5.1.2.6 Matériel nécessaire

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

Aucune donnée répertoriée.

5.1.2.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode DVC

Tableau 3 : avantages et inconvénients de la DVC

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ²⁶
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Non détection des <i>Legionella</i> mortes • Rapidité des résultats 	<ul style="list-style-type: none"> • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du sérotype 1 • Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification • Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Applicable sur des échantillons d'eau traitée
Critères de priorité modérée			<ul style="list-style-type: none"> • Pas de distinction et de quantification des sérogroupes Lp autre que sg1 • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp • Applicable aux eaux très chargées • Faisabilité, simplicité • Equipements nécessaires • Temps technicien important • Interprétation technique simple des résultats bruts • Permet de disposer de souches pour des études complémentaires

5.1.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur la croissance, peu ou pas testées pour rechercher *Legionella* dans l'eau

En s'appuyant sur le principe de la méthode de dénombrement de *Legionella* par culture, telle que décrite dans la norme NF T 90-431, il peut être envisagé des variantes, potentiellement plus performantes ou apportant une information supplémentaire. Différents exemples peuvent être évoqués.

5.1.3.1 Prétraitement des échantillons

Certains prétraitements de l'échantillon, pourraient permettre d'optimiser les performances de la méthode de dénombrement utilisée. L'utilisation des méthodes de concentration sélectives, comme la séparation immuno-magnétique, a déjà été évoquée dans le chapitre "Etapas de concentration". Elle pourrait permettre de réduire la présence d'inhibiteurs de croissance et ainsi amener à une augmentation de la sensibilité de la méthode par culture.

5.1.3.2 Amélioration des milieux de culture

L'utilisation de milieux de culture plus sélectifs ou permettant de meilleurs rendements de culture pourrait également être envisagée. Certaines études évoquent notamment des milieux comme le BMPA²⁷ ou le MWY²⁸ (Bartie *et al.* 2003; Edelstein 1981; Wadowsky and Yee 1981).

5.1.3.3 Amélioration de la justesse

Au niveau de la lecture des résultats, il est envisageable d'identifier plus de colonies que ce qui est actuellement préconisé dans la norme.

²⁶ Par manque de données

²⁷ Extrait de Levure (11.5 g/L), Charbon activé (1,5 g/L), Tampon ACES (6,0 g/L), alpha-Cetoglutarate (1,0 g/L), Agar (14,0 g/L), L-Cysteine HCl (0,4 g/L), Pyrophosphate ferrique (0,25 g/L), Cefomandole (0,004 g/L), Anisomycine (0,01 g/L), Polymyxine B (80 000 IU) pH 6,9 +/- 0,1 à 25° C

²⁸ Extrait de Levure (10 g/L), Charbon activé (2 g/L), Tampon/KOH 10,0 g/L, alpha-cetoglutarate (1,0 g/L), Agar (14,0 g/L), L-Cysteine HCl (0,4 g/L), Pyrophosphate ferrique (0,25 g/L), Glycine (3,0 g/L) Polymyxine B (50,000 IU), Anisomycin (80 mg/L), Vancomycine (1.0 mg/L), Bleu de Bromothymol (10 mg/L), Pourpre de Bromocresol (10 mg/L)

Anses

5.1.3.4 Méthodes complémentaires à la culture par examen de l'intégrité des cellules bactériennes ou détection d'une activité métabolique

Des méthodes complémentaires donnent des informations relatives à l'état de viabilité des *Legionella* isolées. Elles sont basées sur l'examen de l'intégrité *via* de l'activité enzymatique, du potentiel de membrane, etc. (Alonso *et al.* 2002; Hoefel *et al.* 2003; Joux and Lebaron 2000; Nebe-von-Caron *et al.* 2000).

Elles font appel à des marqueurs fluorescents, simples ou doubles, spécifiques des cellules bactériennes viables et, pour certaines méthodes, également à des marqueurs des cellules mortes. L'observation et la quantification des cellules fluorescentes peuvent être réalisées à l'aide d'un fluorimètre, d'un microscope à fluorescence, d'un cytomètre en flux ou d'un cytomètre en phase solide. Les caractéristiques de ces appareils sont décrites dans le chapitre "5.3.1.1.3".

A titre d'exemple, certaines méthodes ont déjà été développées en ce sens pour apporter une information complémentaire aux méthodes de dénombrement de *Legionella* :

- marquage simple sélectif des cellules vivantes (TVC pour « total viable cell ») - activité métabolique :
Classiquement, un précurseur non fluorescent est mis en contact avec l'échantillon à tester. Ce précurseur peut être internalisé par *Legionella* et clivé par des enzymes bactériennes en un produit fluorescent. Les cellules bactériennes dont la membrane est intacte deviennent fluorescentes et ne laissent pas s'échapper le fluorochrome dans le milieu de culture. La fluorescence révèle donc une activité enzymatique et une intégrité membranaire que les auteurs associent à une viabilité (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005; Dusserre *et al.* 2008).
- double marquage sélectif des cellules vivantes et mortes - intégrité membranaire :
Deux fluorochromes spécifiques des acides nucléiques sont utilisés : un marqueur fluorescent vert (Syto9) dont les molécules peuvent pénétrer dans les cellules en traversant la membrane plasmique et un marqueur fluorescent rouge (Iodure de propidium (PI)) dont les molécules ne peuvent pénétrer dans les cellules que lorsque leur membrane est endommagée. Une incubation de 5 minutes seulement permet d'après les auteurs de discriminer la proportion de bactéries viables dans leur ensemble (cultivable et VBNC) et non viables (Allegra *et al.* 2008; Alonso *et al.* 2002; Rudi *et al.* 2005).

Les méthodes basées sur l'examen de l'intégrité des cellules sont applicables aux eaux « propres » filtrables, mais restent limitées pour l'analyse d'échantillons environnementaux non filtrables. Ce sont des outils valables pour analyser, caractériser et décrire les cellules VBNC dans une matrice maîtrisée en laboratoire ou préalablement purifiée et concentrée en *Legionella* (Allegra *et al.* 2008; Dusserre *et al.* 2008). Dans le cas d'un échantillon d'eau environnementale, il est nécessaire de pratiquer un double marquage associant une détection de *Legionella* par un anticorps spécifique (Tyndall and Domingue 1982) à un marquage de viabilité. Les résultats obtenus sont exprimés en nombre d'événements par cytométrie en flux, en nombre de bactéries par microscopie ou cytométrie en phase solide et en intensité de fluorescence par fluorimétrie.

5.2 Méthodes basées sur l'amplification génique

5.2.1 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR)

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par q-PCR²⁹, fait l'objet de la norme 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 (PCR)" (avril 2010).

Actuellement, il n'y a pas d'équivalence officiellement reconnue entre les méthodes par culture (NF T90-431) et par q-PCR (NF T90-471), c'est-à-dire entre les résultats exprimés en UG/L et ceux obtenus par la culture exprimés en UFC/L.

5.2.1.1 Principe

La Polymerase Chain Reaction (PCR), est une méthode de biologie moléculaire basée sur l'amplification génique *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité initiale, par l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase et d'amorces oligonucléotidiques. La sélectivité de la technique vient du fait que les amorces nucléotidiques

²⁹ Egalement appelée par certains auteurs RT (Real Time) PCR

Anses

utilisées sont spécifiques du gène à amplifier. Ces dernières sont constituées d'oligonucléotides de synthèse de taille déterminée (20 à 25 nucléotides), permettant de délimiter la séquence à amplifier (Bej *et al.* 1991; Saiki *et al.* 1988).

La PCR en temps réel (q-PCR ou *Real-time PCR*³⁰) est une évolution de la PCR classique qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à une sonde fluorescente ou un agent fluorescent intercalant de l'ADN (Higuchi *et al.* 1992; Higuchi *et al.* 1993). Elle permet ainsi de faire des mesures quantitatives (q-PCR) en comparant les niveaux de fluorescence à ceux d'un standard externe composé de solutions de concentration calibrée en unités génomes de *Legionella pneumophila* amplifiées (Bej *et al.* 1991; Wellinghausen *et al.* 2001).

La norme NF T 90-471 laisse le choix des amorces, dans la mesure où elles sont spécifiques de *Legionella*. Certaines amorces sont déjà couramment utilisées pour le dénombrement de *Legionella* par q-PCR. Par exemple, une amorce spécifique du genre *Legionella* qui permet l'amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S ou une amorce spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* qui permet l'amplification d'un fragment du gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*), un gène codant pour un potentiateur bactérien à provoquer une infection intracellulaire de protozoaires ou de macrophages humains (Wellinghausen *et al.* 2001). D'autres amorces sont également utilisées, comme des fragments des gènes codant pour l'ARNr 5S (Hayden *et al.* 2001) et l'ARNr 23S (Nazarian *et al.* 2008) ou du gène *rpoB* codant pour l'ARN polymérase (Yong *et al.* 2010). Des amorces spécifiques de *L. pneumophila* de séro groupe 1 sont également en cours de développement et permettraient d'obtenir une information plus précise sur la présence dans l'eau de ce séro groupe, le plus rencontré en pathologie humaine (Luck *et al.* 2009; Mèrault *et al.* 2009).

La norme révisée (NF T 90-471) préconise un étalonnage à chaque changement de lot de réactifs, par le raccordement de la solution de calibration de travail à un étalon primaire. Elle définit ainsi, l'utilisation d'un étalon primaire certifié servant à améliorer la reproductibilité des résultats et leur comparaison entre les différents laboratoires. A la demande de la Direction générale de la santé (DGS), cet étalon a été mis au point et est distribué depuis octobre 2009 par le Centre national de référence des légionelles (CNRL).

5.2.1.2 Informations apportées par les résultats

Les résultats obtenus par cette méthode sont exprimés en nombre d'unités génome de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* par litre d'eau (en UG/L). Les bactéries dénombrées sont celles contenant de l'ADN amplifiable, qu'elles soient intactes ou endommagées. Cette méthode ne permet pas de distinguer les cellules viables des cellules non viables (*a priori* non infectieuses) ou les cellules cultivables des non cultivables (Ballard *et al.* 2000; Behets *et al.* 2007; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Dusserre *et al.* 2008; Joly *et al.* 2006; Wellinghausen *et al.* 2001; Yaradou *et al.* 2007). Elle permettrait en revanche le dénombrement de *Legionella* contenues dans des protozoaires ou dans des vésicules externes de ces protozoaires (Hay *et al.* 1995).

5.2.1.3 Matrice d'application

L'interprétation des résultats d'une quantification de *Legionella* présentes dans un échantillon donné par la méthode q-PCR, dépend largement des caractéristiques de l'eau analysée (Joly *et al.* 2006). Il existe des différences importantes entre les résultats d'une analyse d'eau chaude sanitaire et d'eau de circuit de refroidissement (Behets *et al.* 2007). La norme q-PCR (NF T90-471) est conçue pour être applicable sur tout type d'eau sous réserve de validation préalable de la méthode vis-à-vis des caractéristiques de l'eau à analyser, notamment de charge en particules. Une étude de rendement doit ainsi être réalisée sur les différents types d'eau. Jusque-là, la q-PCR a été utilisée aussi bien pour l'analyse d'eaux chaudes sanitaires que d'eaux de tours aéroréfrigérantes, avec parfois des différences de performances selon le type d'eau.

5.2.1.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Selon la norme NF T90-471, l'échantillon est concentré en filtrant le volume maximal d'échantillon, si possible compris entre 100 mL et 1 L. Comme précédemment évoqué, cet échantillon peut être concentré par filtration. Les échantillons doivent être stockés à 4°C (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009), voire à -20°C (Joly *et al.* 2006).

³⁰ Dans ce rapport la RT-PCR désigne le *reverse transcriptase* PCR et non le *real-time* PCR

Anses

5.2.1.5 Paramètres de performance

Tout laboratoire voulant utiliser la méthode q-PCR selon la norme NF T 90-471 doit caractériser la méthode :

- connaître ou étudier l'inclusivité et l'exclusivité³¹ des sondes et des amorces
- connaître ou estimer la limite de détection
- connaître ou estimer la limite de quantification
- étudier la fonction d'étalonnage de la q-PCR
- ou estimer le rendement optimal de la méthode

Les utilisateurs de kits commerciaux ne réaliseront pas l'étude d'inclusivité et d'exclusivité mais demanderont les informations au fournisseur du kit. Par contre, ils réaliseront toutes les autres étapes de caractérisation. La certification AFNOR d'un kit ne dispense pas de ces étapes.

5.2.1.5.1 Justesse

Concernant les faux positifs, la q-PCR prend en compte aussi bien les bactéries viables que non viables. Ainsi, la surveillance de la présence de *Legionella* dans l'eau par cette méthode pourrait entraîner une surestimation du risque de légionelloses. En effet il est établi que l'ADN de bactéries non viables peut résister dans l'environnement, alors que seules les *Legionella* viables peuvent se multiplier dans les macrophages pulmonaires et provoquer une pneumonie (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Fields 1996; Fields *et al.* 2002; Nocker and Camper 2006). L'ADN bactérien peut être présent dans le milieu aqueux extérieur soit par sécrétion active des cellules viables soit par relargage à partir des cellules mortes et il participe à la constitution du biofilm (Steinberger and Holden 2005). Une bonne partie de l'ADN libéré est probablement également digérée par les protozoaires présents dans l'eau, mais l'efficacité de ce processus est encore mal établie (Nielsen *et al.* 2007). Parce qu'il est difficile de distinguer au sein de l'ADN présent les molécules pures, celles qui sont encapsulées dans des particules virales ou des ultramicrobactéries (<0,2 µm) ou encore celles liées aux colloïdes, le terme d'ADN en solution est fréquemment utilisé pour désigner ces formes tout autant que l'ADN libre. La concentration typique en ADN libre dans l'eau a été estimée entre 1 et 17 UG/L, bien que des niveaux supérieurs aient déjà été retrouvés (Lorenz and Wackernagel 1994; Suida and Gude 1996). La persistance à long terme de fragments d'ADN dans l'environnement mime les résultats obtenus dans les sols où un signal peut être obtenu par PCR des semaines après que l'inoculum ait perdu sa viabilité. La plupart des études actuelles concluent que des molécules d'ADN extracellulaires sont toujours présentes bien que la dégradation d'un ADN nu introduit se produise généralement en quelques heures (Nielsen *et al.* 2007). D'un autre côté, l'analyse sélective de l'ADN extracellulaire associée aux sédiments marins montre que ses teneurs sont voisines de celles observées dans l'eau (comprises entre 7 et 24 UG/L) mais montre que ce dernier est généralement dépourvu d'ADN 16S amplifiable (Corinaldesi *et al.* 2005). Cependant, théoriquement, les résultats de la méthode par q-PCR ne sont pas perturbés par la présence éventuelle d'ADN libre dans l'eau analysée. Celui-ci est normalement éliminé par l'étape de filtration ou de centrifugation et ne peut donc être à l'origine de faux positifs.

Concernant les faux négatifs, la méthode par q-PCR limiterait le nombre de faux négatifs, notamment en permettant la détection des *Legionella* contenues dans les protozoaires, qui sont difficilement détectées par culture (Hay *et al.* 1995). La procédure de préparation de l'échantillon préconisée dans la norme NF T90-471 donne moins de détail quant à l'intensité de la centrifugation préconisée. Sa capacité à permettre l'extraction de l'ADN des bactéries intra amibiennes peut donc se poser. Toutefois, une publication de Wellinghausen *et al.*, décrit la méthode permettant d'extraire l'ADN des bactéries intra amibiennes, pour permettre leur dénombrement par q-PCR, qui impliquerait deux sédimentations par centrifugation à 20 000g (à l'aide d'un kit commercial) (Wellinghausen *et al.* 2001).

Concernant la répétabilité de la méthode, le coefficient de variation de la q-PCR (sans tenir compte de l'extraction des acides nucléiques) serait de l'ordre de 0.02 % (Behets *et al.* 2007). Sur ce point des précisions, basées sur des données d'analyse de routine, sont apportées dans la synthèse des auditions menées par le groupe de travail, présentée au point 10.2 de ce rapport.

³¹ Les amorces et sondes utilisées doivent donner les résultats attendus pour une liste des espèces et de sérogroupes (liste précisés dans la norme), qui ont tous été isolés chez l'homme : résultat positif pour l'inclusivité, et résultat négatif pour l'exclusivité.

5.2.1.5.2 Fidélité, reproductibilité

Concernant la reproductibilité de la méthode, le coefficient de variation de la q-PCR (sans tenir compte de l'extraction des acides nucléiques) serait de l'ordre de 1 % (Behets *et al.* 2007). Sur ce point des précisions, basées sur des données d'analyse de routine, sont apportées dans la synthèse des auditions menées par le groupe de travail, présentée au point 10.2 de ce rapport.

5.2.1.5.3 Sensibilité

Pour l'analyse d'une eau de réseau hospitalier, le ratio de détection de *Legionella* serait de l'ordre de 99 % (Wellinghausen *et al.* 2001). Le taux de récupération moyen dans un échantillon ensemencé avec une quantité de *L. pneumophila* connue (Behets *et al.* 2007) serait de :

- 93 % dans un échantillon d'eau du robinet ;
- 56 % dans un circuit d'eau de tour aéroréfrigérante.

La limite de détection de la méthode est définie comme le plus petit nombre d'UG par essai ayant montré un résultat positif (une amplification) dans au moins 90 % des cas (NF T90-471). Elle est variable selon les auteurs et les conditions expérimentales utilisées :

- entre 30 à 250 UG/L avec la sonde correspondant au gène codant pour l'ARNr 16S (spécifique de *L. spp.*) après 45 cycles de réplication par q-PCR (Joly *et al.* 2006) ;
- entre 250 et 300 UG/L avec la sonde correspondant au gène *mip* (spécifique de *L. pneumophila*) après 45 cycles de réplication par q-PCR (Joly *et al.* 2006) ;
- 60 UG/L avec l'amorce correspondant au gène *mip* (spécifique de *L. pneumophila*) après 50 cycles de réplication par q-PCR et une efficacité d'amplification de 98% (Behets *et al.* 2007) ;
- 170 UG/L avec une sonde correspondant à un gène spécifique de *L. pneumophila* (Dusserre *et al.* 2008) ;
- 167 UG/L avec une sonde correspondant à un gène spécifique de *L. pneumophila* (Yaradou *et al.* 2007).

Par convention, la limite de quantification incompressible compte tenu de la dispersion d'échantillonnage est de 25 UG/puits (NF T90-471). Elle est définie comme le plus petit nombre d'UG par essai dont le coefficient de variation des résultats est inférieur à 25% (Joly *et al.* 2006). En pratique, elle peut être variable selon les auteurs et l'amorce utilisée et le volume filtré :

- 1000 UG/L avec l'amorce correspondant au gène *mip* (spécifique de *L. pneumophila*) après 50 cycles de réplication par q-PCR dans des conditions expérimentales (Ballard *et al.* 2000) ;
- entre 500 et 5000 UG/L avec l'amorce correspondant au gène codant pour l'ARNr 16S (spécifique de *L. spp.*) après 45 cycles de réplication par q-PCR (Joly *et al.* 2006) ;
- entre 1000 et 5000 UG/L avec l'amorce correspondant au gène *mip* (spécifique de *L. pneumophila*) après 45 cycles de réplication par q-PCR (Joly *et al.* 2006) ;
- 833 UG/L avec une amorce correspondant à un gène spécifique de *L. pneumophila* (Yaradou *et al.* 2007).

La standardisation diminue la variabilité entre les limites de détection et de quantification observées. Celle-ci devrait avoir été réduite depuis la mise au point de l'étalon national par le CNRL (octobre 2009). Sur ce point des précisions, basées sur des données d'analyse de routine, sont apportées dans la synthèse des auditions menées par le groupe de travail, présentée au chapitre 10.2. de ce rapport.

Les limites de détection et de quantification peuvent être largement affectées par :

- le volume d'échantillonnage : il doit être pris en compte pour l'expression de la limite de quantification (LQ) et la limite de détection (LD). Les valeurs de LQ et LD augmentent proportionnellement avec la réduction du volume de l'échantillon filtré (NF T90-471) ;
- la présence d'inhibiteurs de la polymérase dans l'échantillon : l'utilisation d'un étalon interne, comme prévu dans la norme NF T90-471, doit, le cas échéant, permettre la mise en évidence de tels inhibiteurs. En cas de présence d'inhibiteurs, il est préconisé dans la norme de diluer l'échantillon jusqu'à ce que les inhibiteurs ne perturbent plus la q-PCR. Cependant cette pratique a pour effet direct une relève des limites de détection et de quantification en rapport avec le facteur de dilution appliqué à l'échantillon.

Selon la norme NF T90-471, par convention, la limite de quantification incompressible, compte tenu de la dispersion d'échantillonnage (loi de Poisson), est de 25 UG/L +/-0,15 log, soit entre 17.7 et 35.3 UG/L.

5.2.1.5.4 Spécificité, sélectivité

Théoriquement, la q-PCR est sélective à 100 % vis-à-vis de 15 sérogroupes de *L. pneumophila* (Behets *et al.* 2007). Il est possible de rechercher sélectivement une espèce, un séro groupe, voire un gène de virulence. Certains gènes de virulence de *L. pneumophila* sont déjà connus (Fields *et al.* 2002). Ainsi, des études de la détection sélective, dans l'environnement, de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Mérault *et al.* 2009) par q-PCR ont déjà été menées. D'autres sérogroupes ont également été amplifiés à partir de cultures (Luck *et al.* 2009). Il devrait être possible, dans un avenir proche, de détecter sélectivement les souches appartenant aux grands clones responsables d'un nombre important de cas de légionellose au niveau international (Cazalet *et al.* 2010).

5.2.1.5.5 Rapidité

Le temps d'analyse global pour une q-PCR, prétraitement compris, est de l'ordre de 2 à 4 h. Il est variable selon le matériel utilisé (CSHPF 2005; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

5.2.1.6 Matériel nécessaire

Le matériel spécifique nécessaire à cette méthode est essentiellement composé d'un kit d'extraction de l'ADN, d'un thermocycler de q-PCR, de kit d'amplification d'ADN et de microplaques de q-PCR. Il faut y ajouter les amorces spécifiques de *Legionella* spp. et *L. pneumophila* et les tampons de lyse bactérienne. Le reste du matériel nécessaire est classiquement présent dans un laboratoire d'analyse : bain-marie, centrifugeuse, congélateur à -20°C, etc. (Behets *et al.* 2007).

Il est important de préciser que la norme NF T90-471 préconise, dans le cas où il est choisi de ne pas utiliser de kits de q-PCR commerciaux validés selon le protocole Afnor « Protocole de Validation pour les kits de détection et de dénombrement de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) », la mise en œuvre d'exigences supplémentaires pour valider le protocole utilisé. Il est notamment préconisé de vérifier l'inclusivité et l'exclusivité des amorces et sondes. Elles doivent donner les résultats attendus pour les espèces et sérogroupes suivants qui ont tous été isolés chez l'homme.

- liste d'inclusivité (micro-organismes testés reconnus comme appartenant au genre *Legionella*) : *L. anisa*, *L. birminghamsis*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumofii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansingensis*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. pneumophila* 1 à 15, *L. sainthelensi*, *L. tucsonensis*, *L. wadsworthii*.
- liste d'inclusivité (micro-organismes testés reconnus comme appartenant à l'espèce *L. pneumophila*) : quinze sérogroupes de l'espèce.
- liste d'exclusivité (micro-organismes testés reconnus comme n'appartenant pas au genre *Legionella* et à l'espèce *L. pneumophila*.) Ces souches doivent préférentiellement être retrouvées dans les mêmes niches écologiques que les *Legionella* et/ou être phylogénétiquement proches. Au minimum, la liste suivante doit être testée : *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Clostridium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Les essais d'inclusivité doivent être réalisés sur des extraits d'ADN de façon à obtenir environ 100 UG/puits. Les essais d'exclusivité doivent être réalisés sur des extraits d'ADN de façon à obtenir au minimum un équivalent de 1000 UG / puits estimé par mesure de la densité optique de la suspension à 620 nm.

Il faut enfin noter que dans le cas d'utilisation de kits, l'utilisateur ne connaît pas la séquence des amorces et sondes utilisées, mais le fabricant assure qu'elles sont sensibles et spécifiques.

5.2.1.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

Les résultats de cette méthode semblent variables en fonction (Joly *et al.* 2006) :

- des caractéristiques des eaux à analyser : charge en particules, en molécules chimiques ;
- des variations dans les pratiques et les équipements des laboratoires. Ce problème a été partiellement réglé avec l'introduction d'un étalon interne commun (l'étalon national).

5.2.1.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode q-PCR

Tableau 4 : avantages et inconvénients de la q-PCR

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ³²
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du sérogroupe 1 (en développement) • Prise en compte des <i>Legionella</i> intra ambieuses ou intra vésiculaires dans la quantification • Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Rapidité des résultats • Applicable sur des échantillons d'eau traitée 	<ul style="list-style-type: none"> • Détecte les <i>Legionella</i> mortes aux membranes intègres • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles 	
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp • Faisabilité, simplicité • Equipements nécessaires de coût modéré • Temps technicien faible • Interprétation technique simple des résultats bruts 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut ne pas être applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement) • Ne permet pas de disposer de souches pour des études complémentaires (mais permet de disposer d'ADN) 	<ul style="list-style-type: none"> • Distinction et quantification des sérogroupe Lp autre que sg1

5.2.2 PCR viable (v-PCR)

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par v-PCR, ne fait actuellement pas l'objet d'une norme.

5.2.2.1 Principe

Cette méthode combine la q-PCR et l'utilisation d'un agent intercalant qui pénètre sélectivement dans les cellules présentant des dommages membranaires, réputées non viables. Les agents intercalants couramment utilisés sont le monoazide d'éthidium (EMA)³³ ou le monoazide de propidium (PMA).

Une photolyse de l'EMA produit des nitrènes qui forment des liaisons covalentes avec l'ADN, tout en le clivant en petits morceaux (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005; Hixon *et al.* 1975; Riedy *et al.* 1991). Cette liaison bloque l'amplification de l'ADN des cellules mortes ou endommagées et réduit le signal q-PCR dû à ces faux positifs.

La membrane intacte des cellules viables interdisant la pénétration de l'EMA, seul l'ADN des cellules intactes, considérées comme viables, est amplifié et quantifié. Parallèlement, une analyse de l'échantillon est menée en utilisant la méthode par q-PCR simple, de manière à pouvoir comparer les résultats de la v-PCR (le nombre d'UG correspondant aux cellules viables) et de la q-PCR (le nombre d'UG correspondant à la totalité des cellules dont l'ADN est intact) et déterminer ainsi le ratio de cellules viables (potentiellement infectieuses) et non viables (Chang *et al.* 2009; Chen and Chang 2010; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Nocker and Camper 2006; Nocker *et al.* 2006; Roth *et al.* 1997; Rudi *et al.* 2005; Soejima *et al.* 2007; Soejima *et al.* 2008).

D'après des études récentes, le monoazide de propidium (PMA) est quasi équivalent à l'EMA pour ses qualités de pénétration dans les cellules endommagées et de clivage de l'ADN génomique. Son utilisation dans le cadre d'une méthode de type v-PCR peut être envisagée, à la place de l'EMA, pour le dénombrement de *Legionella* (Chang *et al.* 2009; Chang *et al.* 2010; Nocker *et al.* 2006).

A noter que cette méthode est brevetée pour son application pour le dénombrement de *Legionella*.

³² Par manque de données

³³ EMA et PMA sont des dérivés du Bromure d'Ethidium, un agent intercalant couramment utilisé en biologie moléculaire pour la visualisation des acides nucléiques.

Anses

5.2.2.2 Informations apportées par les résultats

Les résultats obtenus par cette méthode sont exprimés en unité génome (UG) par litre d'eau. Le nombre d'UG correspond aux cellules intactes contenant de l'ADN amplifiable. Elle permet théoriquement la différenciation des cellules de *Legionella pneumophila* viables et non viables (Chang *et al.* 2009; Chang *et al.* 2010; Chen and Chang 2010; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Rudi *et al.* 2005). La v-PCR ne produit pas les mêmes informations que la culture, mais apporte plus d'informations que la q-PCR au regard de la viabilité des *Legionella* détectées (Chang *et al.* 2009; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

5.2.2.3 Matrice d'application

La méthode a été testée, pour la détection de *Legionella*, sur des échantillons d'eau chaude sanitaire ou d'eaux environnementales (Chang *et al.* 2009; Chang *et al.* 2010; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009). Selon le GT, dans un système fermé, les bactéries mortes restent dans le circuit d'eau et peuvent être dénombrées par la q-PCR sans l'être par la v-PCR. En revanche, dans un système ouvert avec renouvellement de l'eau, les bactéries mortes sont évacuées. La majorité des bactéries restantes étant supposées vivantes, les résultats de q-PCR et v-PCR devraient être beaucoup plus proches. Cela est susceptible de limiter sensiblement les différences de résultats obtenus entre q-PCR et v-PCR.

5.2.2.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Selon la norme NF T90-471, l'échantillon est concentré en filtrant le volume maximal d'échantillon, si possible compris entre 100 mL et 1 L. Comme précédemment évoqué, cet échantillon peut être concentré par filtration ou centrifugation. Les échantillons doivent être stockés à 4°C (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009), voire -20°C (Joly *et al.* 2006).

5.2.2.5 Paramètres de performance

5.2.2.5.1 Justesse

Pour évaluer la proportion de résultats faux positifs produits par la v-PCR, certains auteurs ont comparés la q-PCR et la v-PCR en analysant de l'eauensemencée expérimentalement. Selon eux, la v-PCR ne dénombre pas 99,9% des *L. pneumophila* non viables (faux positifs) prises en compte par la q-PCR (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009). Nocker *et al.* suggèrent que le signal plus faible émis par la v-PCR est due à une perte d'ADN génomique par les cellules mortes pendant l'extraction, plus qu'à l'inhibition de l'amplification par la liaison des molécules d'EMA et de l'ADN des cellules mortes (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Nocker and Camper 2006; Nocker *et al.* 2006). Cependant, Soejima *et al.* ont récemment reporté que le traitement direct de l'ADN avec l'EMA, suivi par une irradiation dans les longueurs d'onde du visible, entraîne une lyse de l'ADN chromosomique des bactéries mortes (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Soejima *et al.* 2007; Soejima *et al.* 2008). Dans les deux hypothèses, la v-PCR devrait minimiser les faux positifs par rapport à la q-PCR.

Le protocole d'analyse d'eau environnementale utilisé par Delgado *et al.* est basé sur celui de la norme NF T90-471, complété par une étape de sonication des bactéries présentes sur le filtre, après concentration de l'échantillon, afin de les remettre en suspension (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009). Cette étape additionnelle est susceptible de tuer des bactéries, ce qui peut être de nature à fausser les écarts observés entre les résultats de v-PCR et de q-PCR. Ainsi, si en système fermé non filtré (sans renouvellement ou filtration de l'eau) l'abattement du signal est démontré, en système ouvert filtré (avec renouvellement et filtration de l'eau), il n'est pas certain que la différence entre les résultats de v-PCR et de q-PCR soit aussi importante.

Concernant les faux négatifs, le signal émis par v-PCR est être réduit de plus de 99,9 % par rapport à la q-PCR. En utilisant du PMA à la place de l'EMA, la diminution de plus de 3 log est linéaire sur des concentrations de 10^3 à 10^8 *Legionella* par filtre. Ainsi, avec 10^6 *Legionella* mortes sur le filtre, la v-PCR ne quantifiera pas les *Legionella* car la quantité sera inférieure à sa limite de quantification (Mérault *et al.* 2009).

Le traitement thermique des échantillons (1h à 70°C) provoque une nette diminution du signal détecté en v-PCR, jusqu'à un signal plancher de l'ordre de 3,2 log d'UG/mL. Cela suggère que des bactéries tuées par la chaleur ne sont plus quantifiées. Le fait que le même traitement thermique entraîne la disparition du signal révélant la présence de *Legionella* dans les échantillons analysés avec la méthode par culture, suggère que le signal détecté par v-PCR correspond à des bactéries VBNC. Cependant, selon cette hypothèse, il est difficile d'interpréter la stabilisation du signal émis par la v-

Anses

PCR aux environs de 3,2 log d'UG/mL, et ce, quelle que soit la durée du traitement thermique (1h, 3h, ou 5h à 70°C). En effet, dans ces conditions il semble étonnant de ne pas observer une diminution progressive du signal de v-PCR au cours du temps, s'il correspond effectivement à des bactéries viables (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

5.2.2.5.2 Fidélité, reproductibilité

Aucune donnée répertoriée.

5.2.2.5.3 Sensibilité

La limite de détection observée en conditions expérimentales (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Rudi *et al.* 2005), elle est de l'ordre de 200 UG/mL pour un échantillon de 1 mL traité par l'EMA.

5.2.2.5.4 Spécificité, sélectivité

La sélectivité de la méthode par v-PCR est liée à celle de l'étape de q-PCR qu'elle intègre (Chang *et al.* 2009). Comme cette dernière, la v-PCR est sélective à 100 % vis-à-vis de 15 sérogroupes de *L. pneumophila* (Behets *et al.* 2007), et permet théoriquement de rechercher sélectivement une espèce, un séro groupe, voire un gène de virulence (Fields *et al.* 2002).

Par ailleurs, contrairement à la q-PCR, la v-PCR donne la possibilité de dénombrer les cellules viables et non viables d'une espèce particulière de bactérie dans un mélange d'espèces différentes (Rudi *et al.* 2005). De la même manière, elle permet de détecter et dénombrer les *L. pneumophila* viables dans un mélange de cellules viables et non viables (Chang *et al.* 2009; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

5.2.2.5.5 Rapidité

Le temps d'analyse global pour une v-PCR, prétraitement compris, est proche de celui d'une q-PCR. En l'état actuel de développement de la méthode, la v-PCR nécessite en plus une incubation de l'échantillon avec un perméabilisant (de l'ordre d'1 heure), et un traitement de l'échantillon par l'intercalant (de l'ordre d'1 heure). Au total, la mise en œuvre de cette méthode nécessite un peu plus de 4 heures. Ce temps est également variable selon le matériel utilisé (Chang *et al.* 2009; CSHPF 2005; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Rudi *et al.* 2005).

5.2.2.6 Matériel nécessaire

L'essentiel du matériel nécessaire à la mise en œuvre d'une v-PCR est commun à celui nécessaire à la réalisation d'une q-PCR (Behets *et al.* 2007).

Il faut y ajouter les éléments nécessaires (Chang *et al.* 2009; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005; Rudi *et al.* 2005) :

- au traitement de perméabilisation des membranes cellulaires : toluène et alcool isopropylique, centrifugeuse ;
- au traitement intercalant : EMA solide commercial, Dimethyl sulfoxide, chambre noire pour faire le mélange des deux sans lumière, congélateur à -20°C, micro-tubes de centrifugation opaques, lampe halogène, centrifugeuse (16000 g).

5.2.2.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

Théoriquement, cette méthode permet de quantifier les cellules viables et non viables d'une espèce bactérienne, directement à partir d'un échantillon complexe, comme une eau environnementale (Chang *et al.* 2009; Rudi *et al.* 2005).

Différents auteurs observent que les résultats obtenus par v-PCR varient en fonction de la concentration en EMA (Chang *et al.* 2009; Chen and Chang 2010).

Les résultats de cette méthode varient également en fonction des mêmes facteurs que la q-PCR (Joly *et al.* 2006) :

- caractéristiques des eaux à analyser : charge en particules, en molécules chimiques ;
- pratiques et équipements des laboratoires. Ce problème a été partiellement résolu avec l'introduction d'un étalon interne commun (l'étalon national).

5.2.2.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode v-PCR

Tableau 5 : avantages et inconvénients de la v-PCR

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ³⁴
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification <i>Legionella pneumophila</i> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1 (en développement) • Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification • Non détection des <i>Legionella</i> mortes • Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Rapidité des résultats • Applicable sur des échantillons d'eau traitée 	<ul style="list-style-type: none"> • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles 	
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp • Faisabilité, simplicité • Equipements nécessaires faibles de coût modéré • Temps technicien faible • Interprétation technique simple des résultats bruts 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut ne pas être applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement) • Ne permet pas de disposer de souches pour des études complémentaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Distinction et quantification des sérogroupes Lp autre que sg1

5.2.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur l'amplification génique, peu ou pas testées pour rechercher *Legionella* dans l'eau

Sans changer le principe de la méthode de dénombrement de *Legionella* par q-PCR, telle que décrite dans la norme NF T 90-471, il est possible d'en envisager des variantes, potentiellement plus performantes ou apportant une information différente. Différents exemples peuvent être évoqués.

5.2.3.1 Amélioration de l'extraction de l'ADN

Les performances des méthodes de dénombrement de *Legionella* basées sur l'amplification génique dépendent fortement de l'étape d'extraction de l'ADN. Cette étape et son rendement sont relativement bien maîtrisés, pour le dénombrement de bactéries libres dans l'eau. En revanche, il subsiste des incertitudes concernant le rendement de l'extraction de l'ADN des bactéries intra amibiennes. Le développement et la validation d'un prétraitement adapté, pour être sûr de les prendre correctement en compte, semblent une piste d'amélioration intéressante. Certains auteurs évoquent par exemple une extraction basée sur une centrifugation à l'aide d'un kit spécifique (Wellinghausen *et al.* 2001).

5.2.3.2 Utilisation de sondes plus sélectives

L'utilisation d'amorces ou de sondes sélectives d'autres espèces que *L. pneumophila*, ou sélectives de sérogroupes ou sous-types particuliers, pourrait permettre de produire des résultats plus précis et plus facilement interprétables d'un point de vue sanitaire. Si des souches sont identifiées comme plus pathogènes que d'autres, il est envisageable théoriquement de les quantifier individuellement.

5.2.3.3 Reverse transcriptase - PCR (RT-PCR)

La RT-PCR est une technique qui associe la transcription inverse (RT) d'un brin d'ARN en ADN complémentaire (ADNc), suivie d'une amplification de l'ADNc par PCR. Le brin complémentaire d'ADNc est généré à partir de l'ARN bactérien grâce à l'adjonction d'ADN polymérase ARN dépendante (Bej *et al.* 1991; Jones and Foulkes 1989). Cette méthode permet de détecter et de quantifier (en UG/l) l'ARN issu de l'expression de gènes spécifiques d'une bactérie, qu'elle soit dans un état viable cultivable ou VBNC (Mahbubani *et al.* 1991; Oliver 2009).

³⁴ Par manque de données

Anses

En 1991, la limite de détection de la méthode était de 1000 UG/mL, cette faible sensibilité étant probablement due à une faible efficacité de l'extraction et à la grande sensibilité de l'ARN à la dégradation (Bej *et al.* 1991). Les recherches bibliographiques n'ont pas permis de mettre en évidence de publication plus récente portant sur l'application de cette méthode à la recherche de *Legionella*.

5.2.3.4 Kits de terrain « tout en un »

Actuellement, l'une des contraintes liées au dénombrement de *Legionella* dans l'eau par amplification génique, est la nécessité de disposer d'un laboratoire proche et capable de faire ce type d'analyse. Le développement de kits permettant la réalisation de ces analyses directement sur le terrain pourrait s'avérer intéressant dans certains contextes.

A titre d'exemple, il existe déjà des systèmes de q-PCR qui permettent une analyse individuelle de chaque échantillon (avec un thermocycleur par échantillon) et qui réalisent la phase d'extraction et d'amplification de manière automatisée dans une seule cartouche. Ces outils "clef en main" existent en routine pour le diagnostic rapide de plusieurs pathogènes dans les prélèvements biologiques mais ne sont actuellement pas disponibles pour dénombrer les *Legionella* dans l'environnement.

5.3 Méthodes basées sur l'affinité moléculaire

5.3.1 Immuno-détection

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par immuno-détection, ne fait actuellement pas l'objet d'une norme.

5.3.1.1 Principe

L'immuno-détection regroupe les méthodes permettant de mettre en évidence une ou plusieurs protéines ou épitopes en utilisant des anticorps spécifiques des *Legionella*. Elle peut être utilisée pour de la détection ou le dénombrement en fonction des modalités de sa mise en œuvre (Coons *et al.* 1942).

La spécificité de la méthode est liée à l'anticorps choisi. Plusieurs anticorps anti-*Legionella pneumophila* ou anti-*Legionella* spp. existent : anticorps polyclonaux ou monoclonaux commercialisés, publiés ou "maison" (Fuchslin *et al.* 2010; Helbig *et al.* 1995; Helbig *et al.* 1997; Riffard *et al.* 2001; Sethi *et al.* 2007; Yanez *et al.* 2005). Des anticorps spécifiques de *L. pneumophila* sg1, sg 2-14, ou des *L. pneumophila* spp sont également décrits. De fortes spécificités peuvent notamment être observées avec certains anticorps dirigés contre certains clones de *L. pneumophila* sg1 ou un marqueur de virulence (Helbig *et al.* 1995; Helbig *et al.* 1997). De fait, la spécificité des anticorps doit être testée et précisée.

L'immunofluorescence regroupe les techniques d'immuno-marquage qui permettent de mettre en évidence une ou plusieurs protéines par l'utilisation d'un anticorps spécifique portant un fluorochrome (Coons *et al.* 1942).

5.3.1.1.1 Immunofluorescence directe

Un anticorps dirigé contre une protéine d'intérêt (ou l'antigène au sens large) est dit anticorps primaire. Lorsqu'il est directement couplé au fluorochrome, on parle d'immunofluorescence directe (Coons *et al.* 1942).

5.3.1.1.2 Immunofluorescence indirecte

Le plus souvent, l'anticorps primaire ne porte pas le fluorochrome. On utilise alors un deuxième anticorps (anticorps secondaire), couplé au fluorochrome, spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire. On parle alors d'immunofluorescence indirecte (Dusserre *et al.* 2008).

5.3.1.1.3 Méthodes de détection des anticorps fluorescents

Le choix de la méthode de détection et la quantification des anticorps marqués par le fluorochrome a un impact sur les performances de la méthode, notamment en termes de rapidité et de robustesse (Cherry and Thomason 1969) :

- La microscopie en fluorescence est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Comme toute technique de microscopie optique, elle est limitée par la diffraction de la lumière. Le pouvoir de résolution est donc de 200 nm environ. La lecture est manuelle et sa qualité dépend de l'entraînement du technicien.
- La cytométrie est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse devant le faisceau d'un laser. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer les populations de particules suivant plusieurs critères et de les trier. Elle permet donc de compter les bactéries marquées par certains fluorochromes, dans un échantillon, de manière automatique et rapide. Il existe des cytomètres en flux (FCM) pour l'analyse d'un échantillon fluide (Riedy *et al.* 1991) et des cytomètres en phase solide (Dusserre *et al.* 2008; Mignon-Godefroy *et al.* 1997) pour l'analyse d'un échantillon présent sur support solide (filtre). Ces derniers donnent un résultat en quelques minutes (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

Anses

5.3.1.2 Informations apportées par les résultats

Ces méthodes permettent de dénombrer des cellules de *L. pneumophila* ou d'autres espèces du genre *Legionella*, sans distinction entre les cellules viables et non viables (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

5.3.1.3 Matrice d'application

De manière générale, les méthodes mettant en œuvre l'immuno-détection sont applicables aux eaux peu chargées pour être filtrables, mais restent limitées pour l'analyse d'échantillons environnementaux non filtrables (Dusserre *et al.* 2008). Cependant la nature des matrices analysables par l'immuno-détection dépend en grande partie de la méthode utilisée pour détecter les cellules marquées par fluorescence. Dans le cas où les cellules à dénombrer sont rares et qu'il est nécessaire de concentrer l'échantillon par filtration, il ne sera pas possible d'utiliser la méthode de détection par cytométrie en flux pour laquelle les échantillons analysés doivent être liquides. Les techniques de détection par cytométrie en phase solide ou par microscopie en fluorescence permettent l'analyse d'échantillons préalablement filtrés. Compte tenu de leurs limites de détection respectives, seule la méthode par cytométrie en phase solide permet de dénombrer les cellules dans un échantillon très peu concentré (Aurell *et al.* 2004; Lemarchand *et al.* 2001).

Des micro-biocapteurs pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les prélèvements environnementaux seraient en cours de développement et d'évaluation.

5.3.1.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Le volume d'échantillon nécessaire dépend de la concentration en cellules marquées, par rapport aux cellules non marquées (ne portant pas l'antigène recherché). Plus la concentration en cellules non marquées est importante et plus il est nécessaire que la concentration en cellules marquées soit importante pour que cette méthode soit applicable.

5.3.1.4.1 Cas d'une détection par microscopie en fluorescence

Dans ce cas, à titre d'exemple, avec une concentration en cellules non marquées de $1,36 \cdot 10^8$ cellules / litre, les volumes nécessaires calculés, dans le cadre d'une étude, étaient de (Lemarchand *et al.* 2001) :

- 1 mL pour une concentration en cellules marquées supérieure ou égale à $10^7/L$;
- 10 mL pour une concentration en cellules marquées supérieure ou égale à $10^6/L$;
- 100 mL pour une concentration en cellules marquées supérieure ou égale à $10^5/L$.

D'après cette étude, la méthode est non applicable si la concentration en cellules marquées est inférieure à $10^5/L$, valeur en dessous de laquelle la distribution des cellules sur la membrane n'est plus homogène.

5.3.1.4.2 Cas d'une détection par cytométrie en flux

Dans ce cas, à titre d'exemple, avec une concentration en cellules non marquées de $1,36 \cdot 10^8$ cellules/L, les volumes nécessaires calculés, dans le cadre d'une étude, étaient de (Lemarchand *et al.* 2001) :

- 100 μL pour une concentration en cellules marquées supérieures ou égale à $10^7/L$;
- 1 mL pour une concentration en cellules marquées supérieures ou égale à $10^6/L$.

La méthode est non applicable pour un échantillon de moins de 100 μL .

Pour garantir un taux de reproductibilité acceptable et parce que l'analyse du volume nécessaire prendrait trop de temps, la méthode est non applicable si la concentration en cellules marquées est inférieure à $10^6/L$, car les volumes à analyser seraient trop importants pour le cytomètre en flux.

5.3.1.4.3 Cas d'une détection par cytométrie en phase solide

Dans ce cas, à titre d'exemple, dans le cadre d'une étude, avec une concentration en cellules non marquées de $1,36 \cdot 10^8$ cellules/L, les volumes nécessaires calculés étaient de (Lemarchand *et al.* 2001) :

- 0,1 μL pour une concentration en cellules marquées supérieures ou égale à $10^7/L$;
à
- 1000 mL pour une concentration en cellules marquées supérieures ou égale à $1/L$.

Anses

5.3.1.5 Paramètres de performance

5.3.1.5.1 Justesse

Concernant les faux positifs, il est difficile d'en évaluer la proportion, pour l'analyse d'échantillons naturels. Ceci est dû d'une part au manque de référence pour les "vrais positifs", d'autre part à la fluorescence endogène. En effet, les méthodes par culture et par immuno-détection ne mesurant pas la même chose, respectivement le nombre de cellules cultivables et le nombre total de cellules, il est difficile de déterminer le nombre de "vrais positifs" avec exactitude dans un échantillon d'eau environnementale (Lemarchand *et al.* 2001).

Concernant les faux négatifs, leur proportion est très faible si l'eau analysée est propre et si l'anticorps spécifique est bien choisi (Lemarchand *et al.* 2001). En revanche, si l'eau est chargée il y a un risque d'adsorption de *Legionella* sur les matières en suspension, ce qui peut rendre les anticorps inaccessibles.

5.3.1.5.2 Fidélité, reproductibilité

Concernant la reproductibilité, selon certains auteurs, avec une détection par cytométrie en phase solide, le coefficient de variation est de l'ordre de quelques pourcents et rarement supérieur à 10 % (Lemarchand *et al.* 2001).

5.3.1.5.3 Sensibilité

Dans le cas de l'immunofluorescence indirecte la limite de détection théorique est d'une bactérie par échantillon filtré (Dusserre *et al.* 2008). En pratique, avec une détection par microscopie en fluorescence, selon certains auteurs, la limite de quantification est de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ cellules marquées par litre d'échantillon. Cette valeur étant inférieure à la limite de détection de la méthode, elle semble donc non applicable.

Les cellules marquées ne peuvent pas être détectées quand elles représentent moins de 0,01 % de la quantité de cellules présentes dans l'échantillon, car leur marquage fluorescent est masqué par les cellules non marquées (Lemarchand *et al.* 2001).

Si l'eau n'est pas trop chargée, dans le cas où les cellules à dénombrer dans l'échantillon sont rares, il est possible de les concentrer par filtration. Avec une détection par cytométrie en flux, la limite de détection avec un marquage de *L. pneumophila* sg1 serait de l'ordre de 2000 cellules/mL d'échantillon passé en cytométrie (Fuchslin *et al.* 2010). La limite de quantification serait de l'ordre de 10^6 cellules marquées par litre d'échantillon. Avec une détection par cytométrie en phase solide (Lemarchand *et al.* 2001), la limite de quantification est de une cellule marquée par litre d'échantillon. Dans le cas où les cellules à dénombrer sont rares cette méthode permet de les concentrer par filtration d'un volume d'échantillon important.

5.3.1.5.4 Spécificité, sélectivité

D'après la bibliographie, la spécificité de l'immunofluorescence directe serait très bonne, si des anticorps monoclonaux spécifiques de *L. pneumophila* sont utilisés. Elle a été testée sur des échantillons d'eau du robinet (Aurell *et al.* 2004).

La microscopie en fluorescence permet de distinguer visuellement les cellules bactériennes marquées par le fluorochrome des éventuels autres éléments fluorescents.

La cytométrie en flux compte l'ensemble des éléments fluorescents, qu'ils correspondent à des cellules bactériennes ou pas.

5.3.1.5.5 Rapidité

La détection des anticorps par cytométrie en phase solide est une méthode relativement rapide qui permet de mener l'analyse complète d'un échantillon par immunofluorescence en moins de 4 heures (Aurell *et al.* 2004; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

5.3.1.6 Matériel nécessaire

Le matériel dédié à cette méthode est principalement constitué de l'appareil de détection : cytomètre en phase solide ou en phase liquide et/ou microscope en fluorescence. Il est également nécessaire de

Anses

disposer des fluorochromes adaptés et des anticorps spécifiques de *Legionella* spp. ou *Legionella pneumophila*.

Le reste du matériel nécessaire est relativement commun dans un laboratoire d'analyse.

5.3.1.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

Peu de données ont été répertoriées concernant la robustesse des méthodes basées sur ce principe.

Il faut cependant noter l'apparition de kits de terrain basés sur l'immuno-détection. Des kits de ce type, notamment commercialisés en Grande Bretagne, sont vendus pour la réalisation d'analyses semi-quantitatives de *L. pneumophila* sg1 ("Méthode de détection : Lateral flow immunochromatographic assay").

5.3.1.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode par immuno-détection

Tableau 6 : avantages et inconvénients de l'immuno-détection

	Avantages	Inconvénients	Non évalué³⁵
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification <i>Legionella pneumophila</i> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1 • Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Rapidité des résultats 	<ul style="list-style-type: none"> • Non prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification • Détecte les <i>Legionella</i> mortes • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> • Applicable sur des échantillons d'eau traitée
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Distinction et quantification des sérogroupes Lp autre que sg1 • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp (théoriquement, mais à développer) • Faisabilité, simplicité (modérée) • Interprétation technique simple des résultats bruts 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement) • Equipements nécessaires importants (dépend fortement de la méthode de détection adoptée) • Temps technicien important 	<ul style="list-style-type: none"> • Permet de disposer de souches pour des études complémentaires (Théoriquement possible)

5.3.2 Fluorescence *In Situ* Hybridation (FISH)

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par FISH, ne fait actuellement pas l'objet d'une norme.

5.3.2.1 Principe

La méthode FISH est une technique de biologie moléculaire utilisant une sonde nucléique spécifique de la cible, couplée à un fluorochrome, qui semble permettre de détecter et quantifier simultanément des *Legionella* spp et des *L. pneumophila* (Amann *et al.* 2001; Amann *et al.* 1995). Après traitement avec une solution contenant des sondes spécifiques de *Legionella* spp et de certains sérogroupes de *L. pneumophila*, l'échantillon est observé ou scanné sous microscope à fluorescence. Les *Legionella* spp apparaissent d'une couleur différente des *L. pneumophila*.

5.3.2.2 Informations apportées par les résultats

En utilisant des sondes adaptées, cette méthode pourrait permettre le dénombrement de *L. pneumophila* (sonde spécifique de l'ARNr 16S pour *L. pneumophila*) ou spp viables, avec comme inconvénient la possibilité de détecter les bactéries mortes intègres, aussi bien cultivables que non cultivables, dans un échantillon d'eau (Amann *et al.* 2001; Amann *et al.* 1995).

5.3.2.3 Matrice d'application

La méthode est théoriquement applicable à tout type d'eau, eau chaude sanitaire comme eaux de tours aérofrigorantes.

³⁵ Par manque de données

Anses

Les résultats sont généralement satisfaisants avec des eaux peu chargées, moins en présence de particules. Cela rend son application aux biofilms (biofilms mis en suspension) problématique : en effet, les *L. pneumophila* situées au sein d'amas de matière organique ont une accessibilité à la sonde diminuée et / ou voient leur fluorescence masquée. Il faut également tenir compte de la fluorescence endogène.

5.3.2.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Le volume d'échantillon filtré doit être adapté à la charge particulaire de la suspension, ce qui diminue la sensibilité de la détection, dans le cas de l'analyse d'une eau très chargée.

5.3.2.5 Paramètres de performance

5.3.2.5.1 Justesse

Aucune donnée répertoriée.

5.3.2.5.2 Fidélité, reproductibilité

Aucune donnée répertoriée.

5.3.2.5.3 Sensibilité

La sensibilité de la méthode est dépendante de la technique de lecture utilisée. Elle est limitée si la visualisation est réalisée à l'aide d'un microscope (événements rares non détectés). Elle peut être améliorée si la visualisation des résultats est réalisée à l'aide d'un scanner automatique.

5.3.2.5.4 Spécificité, sélectivité

Il existe plusieurs sondes "*Legionella*" : LEG226 et LEG705 marquant les *Legionella* spp., tandis que LEGPNE1 est spécifique de *L. pneumophila* séro groupe 1,3,4 et 6 (Grimm *et al.* 1998). Il a été démontré depuis, que cette sonde marque également les sérogroupes 2, 7 et 11 ainsi que certaines *L. pneumophila* de séro groupe 9, 10 et 13. Par contre sa spécificité a également été remise en question car elle marquerait aussi *L. micdadei* séro groupe 1 ; *L. gormanii* séro groupe 1, *L. feeleii* séro groupe 1, *L. jordanis* séro groupe 1, etc. L'une des alternatives serait d'utiliser une sonde PNA (peptide nucleic acid) telle que PLPNE620 (Wilks and Keevil 2006), dans laquelle des liaisons 2-aminoethyl-glycine remplacent les liaisons phosphodiester. Ces sondes sont plus petites et peuvent donc accéder à des zones de l'ARN 16S qui sont inaccessibles aux sondes classiques, ce qui leur donnerait une meilleure spécificité

5.3.2.5.5 Rapidité

Le temps de marquage est de l'ordre de quelques heures et, lecture de chaque lame comprise, les résultats peuvent être obtenus dans la journée. La lecture manuelle des lames est fastidieuse (Wilks and Keevil 2006).

5.3.2.6 Matériel nécessaire

La méthode nécessite un microscope à épifluorescence voire un scanner automatique, équipé d'une caméra pour la prise de photos, car la comparaison du même champ coloré au diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate³⁶ est obligatoire pour éviter des faux-positifs, particulièrement sur les lames chargées en particules.

5.3.2.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

L'un des principaux intérêts de cette méthode est sa simplicité. L'identification de *Legionella* en culture est réservée à du personnel très qualifié alors qu'une détection de fluorescence peut être automatisée. Cette technique ne nécessite aucune étape de culture.

Dans le cas d'une application non automatisée, cette technique nécessite un important temps opérateur.

³⁶ Le diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate (DAPI) est un colorant fluorescent qui appartient au groupe des colorants indol. Le DAPI est utilisé pour la coloration de l'ADN, pour la coloration nucléaire, pour la coloration de cellules vivantes et pour la contre-coloration dans les colorations fluorescentes de matériel botanique et humain et dans la cytométrie de flux.

5.3.2.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode FISH

Tableau 7 : avantages et inconvénients du FISH

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ³⁷
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification <i>Legionella pneumophila</i> • Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes • Rapidité des résultats 	<ul style="list-style-type: none"> • Détecte les <i>Legionella</i> mortes • Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1 • Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification • Applicable sur des échantillons d'eau traitée (Théoriquement oui)
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none"> • Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp • Equipements nécessaires faibles • Interprétation technique simple des résultats bruts • Faisabilité, simplicité 	<ul style="list-style-type: none"> • Distinction et de quantification des sérogroupes Lp autre que sg1 • Temps technicien important • Ne permet pas de disposer de souches pour des études complémentaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Applicable aux eaux très chargées (En développement)

5.3.3 Evolutions possibles des méthodes basées sur l'affinité moléculaire, peu ou pas testées pour rechercher *Legionella* dans l'eau

Toujours sur le principe de l'affinité moléculaire, il est possible d'envisager le développement de méthodes plus performantes, ou apportant des informations supplémentaires par rapport à celles déjà utilisées pour le dénombrement de *Legionella* dans l'eau. Différents exemples peuvent être évoqués.

5.3.3.1 Méthode basée sur l'affinité des groupes d'hydrates de carbone à la surface des cellules

En parallèle de la détection des bactéries par immunocapture, une capture basée sur l'affinité des groupes d'hydrates de carbone (sucres) a été développée récemment (El-Boubbou *et al.* 2007). En effet la première étape de l'infection bactérienne est la fixation de la bactérie sur des groupes d'hydrates de carbone à la surface des cellules. El Boubbou a donc eu l'idée de fixer des sucres sur des billes magnétiques pour capter les bactéries. Il a testé son modèle sur *Escherichia coli* et *Bacillus anthracis*. Il a montré une sensibilité de 10⁴ bactéries par mL. Cette méthode pourra peut-être s'appliquer aux *Legionella*.

5.3.3.2 Méthode basée sur la détection de protéases spécifiques

Une méthode de dosage d'une activité enzymatique spécifique de *Legionella pneumophila* au moyen d'un substrat sélectif à fluorescence réprimée serait également en cours de développement. Elle pourrait permettre leur dénombrement dans l'eau (brevet non publié à ce jour). Aucune publication n'est encore disponible sur le sujet.

5.3.3.3 Méthode mettant en œuvre des biocapteurs

Depuis une vingtaine d'années, des systèmes de dénombrement de bactéries automatisables ont été testés. De nouveaux systèmes dénommés biocapteur, immunocapteur ou nanodecteur, font leur apparition. Un biocapteur peut détecter des composés chimiques et biologiques dans un échantillon environnemental, ceci provoquant un signal suite à la liaison avec un biorécepteur. Ce signal peut être quantifié. La reconnaissance de l'analyte ciblé peut se faire à l'aide d'antigènes, d'anticorps, d'acides nucléiques, de cellules entières ou d'enzymes spécifiques combinés ou non à un transducteur. Le signal produit par la liaison de l'analyte et de son biorécepteur peut être détecté par un système

³⁷ Par manque de données

Anses

optique, électrochimique, calorimétrique, acoustique, piézo-électrique, magnétique, etc. (Nayak *et al.* 2009; Velusamy *et al.* 2010).

Quelques-uns de ces systèmes ont été conçus pour la détection d'évènements rares comme la présence de *Legionella* (Cooper *et al.* 2009; Oh *et al.* 2003; Yoon *et al.* 2003).

Parmi les méthodes sensibles, on peut citer les méthodes électrochimiques : par exemple, Miranda-Castro *et al.* proposent un test permettant la détection de l'ADN de *L. pneumophila* dans les échantillons environnementaux à partir de 10^2 génomes, avec possibilité d'observer une différence significative avec 10^3 et 10^4 génomes (Miranda-Castro *et al.* 2009).

Le développement de puces à ADN, spécifiquement pour la détection, voire le dénombrement de *Legionella* dans l'eau, semble également envisageable (Brevet WO 2008/082290 (A1)).

Wolter *et al.*, proposent quant à eux un système d'anticorps couplés biotine/streptavidine fixé sur un support original permettant la détection en 13 minutes de trois pathogènes simultanément : *S. typhimurium*, *L. pneumophila* et *E. coli* O157:H7, avec respectivement une limite de détection de 3.10^6 , 10^5 et 3.10^3 cellules/mL. Ils précisent également que ce système peut être combiné à des étapes d'enrichissement par filtration ou séparation immuno-magnétiques abaissant la limite de détection à 1 cellule/100 mL d'eau (Wolter *et al.* 2008).

Ces technologies peuvent également être associées à un montage fluïdique (géométrie, rhéodynamique) permettant une recirculation de l'échantillon et optimisant la capture des cellules rares (projet non publié en cours).

6 Description des méthodes de dénombrement sélectif de *Legionella* utilisant plusieurs principes

Certaines méthodes encore trop peu développées et documentées pour permettre une évaluation de leurs avantages et inconvénients sont succinctement décrites dans les sous chapitres « Evolutions possibles des méthodes ».

6.1 Double marquage immunologique (IDS)

La méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, par IDS (Immunological double-staining), ne fait actuellement pas l'objet d'une norme.

6.1.1 Principe

Cette méthode combine la méthode TVC (décrite dans le chapitre "5.1.3.4. Méthode par examen de l'intégrité des cellules bactériennes ou détection d'une activité métabolique") pour compter les cellules vivantes et l'immuno-détection (immunofluorescence directe) pour compter les *Legionella* sélectivement marquées par un autre fluorochrome. La proportion des cellules viables et non viables est déterminée visuellement, sur un échantillon de 100 cellules, par comptage au microscope optique (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.2 Informations apportées par les résultats

Cette méthode permet le dénombrement de cellules de *Legionella* spp. ou de *L. pneumophila* viables. (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.3 Matrice d'application

Cette méthode a été utilisée pour l'analyse d'eau environnementale. Elle est adaptée à des eaux peu chargées, pour lesquelles il est envisageable de concentrer les cellules de *Legionella* par filtration. A titre d'exemple, cette méthode est applicable aux eaux chaudes sanitaires. En revanche, il semble délicat d'analyser de l'eau provenant de tours aéroréfrigérantes avec cette méthode, car leur charge en particules est susceptible d'interférer avec l'analyse microscopique (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Les particules présentes dans les échantillons d'eau environnementale peuvent poser problème pour le comptage et la visualisation des bactéries, en augmentant le bruit de fond (des particules autres que les bactéries peuvent être marquées par les fluorochromes). Ainsi, pour chaque échantillon d'eau environnementale, un volume (50 à 100 mL) est filtré en fonction de sa charge en particules. Pour un échantillon d'eau environnementale, la filtration de plus de 100 mL n'est pas recommandée car les particules présentes dans l'eau sont susceptibles de générer un bruit de fond trop important (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.5 Paramètres de performance

6.1.5.1 Justesse

Aucune donnée répertoriée.

6.1.5.2 Fidélité, reproductibilité

Concernant la reproductibilité, le coefficient de variation maximum observé serait de l'ordre de 1 % (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.5.3 Sensibilité

La sensibilité de la méthode dépend du volume d'échantillon filtré et du nombre de zones microscopiques examinées sur le filtre. Selon Delgado-Viscogliosi, elle est de 176 cellules de *Legionella* par litre, pour un échantillon de 100 mL et 100 zones du filtre examinées. Elle peut théoriquement atteindre 1 cellule de *Legionella* par litre si l'ensemble de la membrane de filtration est examiné. Des essais comparatifs semblent montrer que la méthode par IDS serait plus sensible que la méthode par culture (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

Anses

6.1.5.4 Spécificité, sélectivité

Sélectivité et spécificité de la méthode dépendent des caractéristiques des anticorps vis-à-vis de leur cible. Pour la recherche de *L. pneumophila*, un anticorps spécifique à 100 % est disponible. Pour la recherche de *L. spp.*, l'anticorps disponible serait spécifique à 75 % (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.5.5 Rapidité

Une analyse complète réalisée à l'aide de cette méthode prendrait de l'ordre de quelques heures (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.6 Matériel nécessaire

Le matériel nécessaire pour la méthode IDS est principalement constitué de l'appareil de détection nécessaire à l'immuno-détection (cytomètre en phase solide ou en phase liquide et/ou microscope en fluorescence), des fluorochromes adaptés et des anticorps spécifiques de *L. spp.* ou *L. pneumophila*. A ceci, il faut ajouter le marqueur de viabilité nécessaire à la partie TVC de la méthode : précurseur non fluorescent, qui une fois internalisé par la cellule bactérienne vivante peut être clivé par des enzymes bactériennes en un produit fluorescent (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Le reste du matériel nécessaire est relativement commun dans un laboratoire d'analyse.

6.1.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

La présence de particules accumulées pendant la phase de concentration des échantillons peut parfois interférer avec le comptage des cellules réalisé au microscope (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

L'énumération des cellules au microscope nécessite un entraînement du personnel. Les cellules de *Legionella* présentes dans les échantillons d'eau environnementale sont plus petites que celles présentes dans les cultures *in vitro*. Cette opération peut être à l'origine d'une fatigue de l'opérateur (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

L'automatisation de la méthode par l'utilisation de la cytométrie en phase solide est possible, même si elle ne permettrait pas un gain de temps important. En effet, il est nécessaire de valider chaque échantillon positif par dénombrement au microscope pour éviter les faux positifs (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

6.1.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode IDS

Tableau 8 : avantages et inconvénients de l'IDS

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ³⁸
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none">• Quantification <i>Legionella pneumophila</i>• Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du sérotype 1• Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes• Rapidité des résultats	<ul style="list-style-type: none">• Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles	<ul style="list-style-type: none">• Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification• Applicable sur des échantillons d'eau traitée• Non détection des <i>Legionella</i> mortes
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none">• Distinction et de quantification des sérotypes Lp autre que sg1• Interprétation technique simple des résultats bruts	<ul style="list-style-type: none">• Peut ne pas être applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement)• Equipements nécessaires important (dépend fortement de la méthode de détection)• Temps technicien important	<ul style="list-style-type: none">• Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp (théoriquement, mais à développer)• Faisabilité, simplicité• Permet de disposer de souches pour des études complémentaires (Théoriquement possible)

³⁸ Par manque de données

6.2 Culture-FISH

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par culture-FISH, ne fait actuellement pas l'objet d'une norme. Par ailleurs l'ensemble des éléments relatifs à cette méthode sont issus d'une seule publication.

6.2.1 Principe

Cette méthode fait appel à deux principes distincts : celui de la culture et celui du FISH. Comme le FISH, elle est basée sur l'utilisation de sondes nucléiques spécifiques permettant de détecter et quantifier simultanément *Legionella* spp et *L. pneumophila*. Cette détection est réalisée après une étape de culture. Un volume d'eau est filtré sur membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm. Après traitement acide, les membranes sont déposées sur milieu MWY et incubées à 36°C pendant 3 jours. Après traitement avec une solution contenant des sondes spécifiques des *Legionella* spp et *L. pneumophila*, la membrane est observée ou scannée sous microscope à fluorescence. Les *Legionella* spp apparaissent d'une couleur tandis que les *L. pneumophila* apparaissent d'une autre couleur (Ditommaso *et al.* 2010).

6.2.2 Informations apportées par les résultats

Dans la mesure où la phase de culture dure 3 jours, cette méthode est conçue pour la détection et le comptage des *L. pneumophila* cultivables, plus rapidement que par la méthode par culture conventionnelle.

6.2.3 Matrice d'application

La méthode est, *a priori*, applicable à tout type d'eau, avec les mêmes limites que la culture (flore interférentes, etc.) : eaux de réseaux d'eau chaude sanitaire, eaux de tours aéroréfrigérantes. Cependant, peu de publications faisant l'objet d'une application de cette méthode à des échantillons d'eau chaude sanitaire ou d'eau de tour aéroréfrigérante ont été répertoriées. Ditommaso a utilisé cette technique en réalisant des analyses en culture classique et en culture-FISH en parallèle, sur 79 échantillons d'eau provenant de 10 hôpitaux en Italie (Ditommaso *et al.* 2010).

6.2.4 Echantillon nécessaire / le cas échéant méthode d'échantillonnage préconisée

Basée en partie sur la culture, cette méthode traite *a priori* des volumes équivalents. Cependant Ditommaso a utilisé cette technique en analysant en parallèle des échantillons de 1 L par culture classique et de 50 mL par culture-FISH (Ditommaso *et al.* 2010).

6.2.5 Paramètres de performance

6.2.5.1 Justesse

Aucune donnée répertoriée.

6.2.5.2 Fidélité, reproductibilité

Aucune donnée répertoriée.

6.2.5.3 Sensibilités

La sensibilité du test est estimée à 91%, en utilisant la culture comme standard. Il faut cependant noter que les concentrations trouvées sont systématiquement supérieures avec la technique de culture par rapport à culture-FISH. Cependant les résultats de cette étude sont à prendre avec précaution, car les méthodes sont utilisées sur des volumes différents et les eaux sont filtrées sur des filtres différents (Ditommaso *et al.* 2010).

6.2.5.4 Spécificité, sélectivité

La spécificité est de l'ordre de 82% (Ditommaso *et al.* 2010). Les limites liées aux sondes sont les mêmes que celles déjà évoquées dans le chapitre relatif à la méthode FISH.

Anses

6.2.5.5 Rapidité

Selon la seule étude répertoriée sur le sujet, l'analyse d'un échantillon par cette méthode demande environ 3 jours (Ditommaso *et al.* 2010).

6.2.6 Matériel nécessaire

La méthode nécessite : des sondes moléculaires spécifiques de *Legionella* spp et des *L. pneumophila* ; du milieu MWY (milieu BCYE supplémenté de glycine, polymyxine B, anisomycine, vancomycine), une étuve à 36°C, un microscope à fluorescence voire un scanner automatique.

6.2.7 Robustesse, compétences nécessaires, simplicité

Cette méthode, plus rapide que la culture classique, présente l'intérêt d'être relativement simple à mettre en œuvre. Elle peut de surcroît être automatisée.

6.2.8 Avantages et inconvénients théoriques intrinsèques de la méthode Culture FISH

Tableau 9 : avantages et inconvénients de la culture FISH

	Avantages	Inconvénients	Non évalué ³⁹
Critères de priorité élevée	<ul style="list-style-type: none">• Quantification <i>Legionella pneumophila</i>• Non détection des <i>Legionella</i> mortes• Applicable sur des échantillons d'eau traitée• Rapidité des résultats	<ul style="list-style-type: none">• Pas de prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification• Ne détecte pas l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes• Critères d'interprétation pour le risque sanitaire non disponibles	<ul style="list-style-type: none">• Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du séro groupe 1
Critères de priorité modérée	<ul style="list-style-type: none">• Distinction et quantification des sérogroupes Lp autre que sg1• Quantification de l'ensemble des <i>Legionella species</i>• Equipements nécessaires faibles• Interprétation technique simple des résultats bruts• Permet de disposer de souches pour des études complémentaires• Faisabilité, simplicité	<ul style="list-style-type: none">• Peut ne pas être applicable à certaines eaux très chargées (biologiquement, chimiquement ou physiquement)• Temps technicien important	

³⁹ Par manque de données

6.3 Evolutions possibles des méthodes utilisant plusieurs principes, peu ou pas testées pour rechercher et identifier *Legionella* dans l'eau

Toujours en combinant plusieurs principes d'analyse, le développement d'autres méthodes plus performantes ou apportant des informations supplémentaires est envisageable. Différents exemples sont évoqués ci-après, cette liste n'étant pas exhaustive.

6.3.1 DVC-FISH

6.3.1.1 Principe

Ce procédé consiste à : mettre l'échantillon en contact avec une source nutritive de cellules et un inhibiteur de la division cellulaire, cet échantillon est ensuite mis en contact avec au moins une sonde oligonucléotidique marquée par fluorescence, sélective de *L. pneumophila*, dont le signal est détectable et amplifiable (Brevet WO2009EP53299 20090320 ; Abrégé WO 2009/121727 (A1).

Aucune publication relatant l'application de cette méthode au dénombrement de *Legionella* n'a été répertoriée.

6.3.1.2 Informations apportées par les résultats

Cette méthode est conçue pour permettre la détection et le dénombrement de microorganismes viables dans un échantillon.

6.3.1.3 Matrice d'application

Aucune donnée répertoriée.

6.3.2 Désorption-ionisation laser assistée par matrice (Spectrométrie de masse MALDI-TOF)

6.3.2.1 Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, couplée ou non à une amplification génique, permet l'identification et le typage des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) à partir des colonies ou des prélèvements. L'identification repose sur l'analyse des protéines totales ou d'une fraction amplifiée de l'ADN, généralement un amplicon de l'ADN 16 S. Cette analyse consiste en l'ionisation des molécules avec la technique de désorption laser assistée par la matrice d'inclusion de l'échantillon (MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). Le produit à identifier (souche ou prélèvement) est inclus dans une matrice et immobilisé sous forme de cristaux sur un support inerte. Le complexe produit-matrice est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique et l'analyseur permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol libre (TOF : Time-Of-Flight). Selon le rapport masse/charge (m/z), les molécules les plus petites sont les premières à arriver au détecteur. Les molécules qui ont le même rapport m/z sont séparées grâce à un miroir électrostatique. Les spectres sont lus dans la gamme de masse 2000 – 20000 daltons. La qualité de l'identification est fonction de la richesse de la banque de spectres enregistrés (Courcol 2009).

Seules 3 publications internationales concernant la spectrométrie de masse appliquée à l'identification⁴⁰ des *Legionella* (Moliner *et al.* 2010) et le typage (Fujinami *et al.* 2011) étaient disponibles en mai 2010.

La spectrométrie de masse permet de détecter de l'ADN de bactéries amplifié par PCR. Cela a été décrit pour *Legionella* (Hurt *et al.* 2010). La méthode permet, après avoir dessalé⁴¹ les amplicons et éliminé les résidus non amplifiés, l'identification de fragments de 40 à 168 résidus (Courcol 2009; Hurt *et al.* 2010). Cette méthode a été appliquée aux gènes de l'ADNr 16 S en y associant des améliorations pour la lecture de fragments de plus grande taille (Von Wintzingerode *et al.* 2002). Les modifications de séquence nucléotidique sont déterminées selon les modifications de la masse. Les signaux de masses obtenus sont comparés à ceux générés par les séquences publiées de l'ADNr 16 S. Cette technique permet de caractériser aussi bien les bactéries cultivées que non cultivables.

⁴⁰ Identification de l'ADN de bactéries amplifiées

⁴¹ Purification des amplicons pour éliminer les résidus non amplifiés.

Anses

Dans le cas de l'analyse des protéines totales, la méthode ne peut s'appliquer à un mélange bactérien complexe. Elle nécessite de disposer d'une colonie isolée ou d'un mélange composé d'un faible nombre d'espèces distinctes. L'éclatement du protéome de la colonie constitue une signature spécifique permettant l'identification de la bactérie par comparaison avec une banque de signatures. Le mélange des signatures rend l'analyse des résultats d'autant plus complexe que les souches en présence sont nombreuses.

6.3.2.2 Informations apportées par les résultats

Cette méthode est robuste pour l'identification de *Legionella* au niveau de l'espèce. Elle ne permet pas de discriminer les *Legionella* au niveau des sérogroupes et notamment les sérogroupes de *Legionella pneumophila* (Moliner *et al.* 2010).

Aucune donnée répertoriée ne concerne la quantification de bactéries par cette approche.

6.3.2.3 Matrice d'application

L'identification de *Legionella* à partir d'un échantillon complexe est encore à l'étude. Très peu de données sont disponibles concernant l'application de la spectrométrie de masse aux prélèvements environnementaux. Récemment, Penannec *et al.* (2010) ont décrit un protocole appliqué à 2 échantillons d'eau (TAR) (Penannec *et al.* 2010). Les résultats sont encore très préliminaires et ne permettent pas de conclure. Cette technique d'identification, très rapide, pourrait permettre d'augmenter la sensibilité et la sélectivité de la méthode par culture (cela est détaillé dans la paragraphe 5.1.3.3).

6.3.3 La chromatographie liquide haute pression en condition dénaturante (dHPLC) couplée à la PCR

6.3.3.1 Principe

La dHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) est une méthode chromatographique par couplage d'ions en phase inverse permettant la détection rapide de polymorphismes de l'ADN. Initialement mise au point pour la recherche des mutations ponctuelles (Frueh and Noyer-Weidner 2003), c'est une méthode d'analyse qualitative et semi-quantitative qui fait normalement suite à une réaction d'amplification par PCR et permet de déterminer la teneur en espèce(s) moléculaire(s) de l'amplicon généré et éventuellement leur identité par comparaison avec une banque de signatures moléculaires. L'amplicon peut être simple (espèce moléculaire unique) ou complexe (mélange d'espèces). L'amplification par PCR permet à la fois de disposer d'une quantité suffisante de matériel, d'homogénéiser la taille de l'ADN analysé et d'introduire, grâce à l'une des amorces, une séquence GC riche (GC-clamp) afin de créer une zone à haute température de fusion (donc plus résistante à la dénaturation) à une des extrémités du produit PCR (Wurzburger *et al.* 2003).

Le système d'analyse se compose d'un appareil HPLC, d'une cartouche de phase stationnaire constituée de billes non poreuses de styrène-divinylbenzène alkylé et une phase mobile comprenant de l'acétate de triéthylammonium (TEAA) et de l'acétonitrile. La cartouche de phase stationnaire est placée dans un four à température constante afin d'obtenir une dénaturation partielle de l'amplicon. La neutralisation par le TEAA des charges négatives permet l'adsorption de l'ADN sur la phase stationnaire. Cette adsorption varie en fonction de la température de fusion (TM), laquelle est liée à la composition en base des espèces moléculaires présentes dans l'échantillon. L'éluion progressive est obtenue par un gradient linéaire d'acétonitrile. La teneur en ADN de l'éluât est analysée à 260 nm par un détecteur UV et retranscrite sous forme d'un chromatogramme.

6.3.3.2 Informations apportées par les résultats

La position des pics obtenus sur le chromatogramme correspond à la signature de l'espèce ou des espèces moléculaires représentée(s) dans l'échantillon. L'aire des pics reflète leur abondance relative. Dans le cas d'un amplicon simple, cette abondance peut être précisée en utilisant lors de l'étape initiale une q-PCR, au lieu d'une PCR simple, la quantification étant alors en UG/L. Le système permet aussi bien de rechercher une espèce particulière en utilisant un couple d'amorces hautement spécifiques que d'évaluer la composition d'un mélange en utilisant des amorces génériques.

Même si elle a été utilisée pour l'analyse d'échantillon d'eau (Barlaan *et al.* 2005), la méthode n'a pas encore été testée sur *Legionella*. Elle devrait théoriquement être capable d'apporter une réponse rapide à des questions complexes comme la composition de mélanges d'espèces différentes de *Legionella* dans une installation, en permettant d'identifier lesdites espèces et leurs proportions

Anses

relatives dans le mélange sans passer par la culture. Chaque variation de séquence se traduisant par un déplacement de la position du pic dans le chromatogramme.

6.3.3.3 Matrice d'application

Les matrices d'applications sont théoriquement les mêmes que celles utilisables pour la q-PCR et la v-PCR. Les limites sont identiques, en particulier vis-à-vis des inhibiteurs de la PCR. Cependant, à ce jour, aucune publication répertoriée ne relate l'utilisation de cette méthode pour le dénombrement de *Legionella* dans l'eau.

6.3.4 IMS - ATP-métrie

6.3.4.1 Principe

Cette méthode associe la séparation immuno-magnétique, (décrite dans le chapitre 4.3.1.) pour concentrer les bactéries cibles à l'aide d'anticorps sélectifs, et l'évaluation du taux de bactéries cibles vivantes par ATP-métrie (décrite dans le chapitre 7.1.2.) (Bushon *et al.* 2009; Lee *et al.* 2010).

6.3.4.2 Informations apportées par les résultats

Cette méthode pourrait théoriquement permettre d'évaluer spécifiquement le taux de *Legionella* spp ou *L. pneumophila* dans un échantillon d'eau. Il n'existe cependant actuellement aucune publication relatant sa mise en œuvre pour la détection de *Legionella* vivantes.

6.3.4.3 Matrice d'application

Les matrices d'applications sont théoriquement les mêmes que celles utilisables avec la séparation immuno-magnétique et l'ATP-métrie, l'eau environnementale en faisant partie. Cependant, à ce jour, aucune publication répertoriée ne relate l'utilisation de cette méthode pour le dénombrement de *Legionella* dans l'eau.

La combinaison de l'IMS et de l'ATPmétrie ne présente pas de difficulté de mise en œuvre majeure et il pourrait être envisageable de l'utiliser sur le terrain.

7 Analyses susceptibles d'apporter une information décisionnelle complémentaire.

Les méthodes évoquées dans le présent chapitre ne sont pas des méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. A ce titre, elles sortent du champ de la saisine et font l'objet d'une description succincte. Cependant, le groupe de travail a estimé important d'examiner les principes et objectifs de méthodes susceptibles d'apporter une information complémentaire aux dénombrements de *Legionella* dans l'eau, notamment dans les contextes particuliers de gestion des installations d'eaux chaudes sanitaires et de tours aéroréfrigérantes.

7.1 Recherche de flore totale

7.1.1 Culture

La flore mésophile aérobie totale est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un échantillon. Ce dénombrement se fait à 30°C ce qui permet de dénombrer la flore mésophile (entre 20°C et 40°C) et de la distinguer des flores thermophile (température optimale de croissance supérieure à 40-45°C) et psychrophile (température optimale de croissance inférieure à 20°C).

La croissance s'effectuant sur gélose nutritive standard, la plupart des micro-organismes cultivables peuvent se développer, à l'exception de ceux qui sont exigeants (tel que *Legionella*) et les micro-organismes anaérobies stricts. Il est donc plutôt préférable de parler de "flore mésophile aérobie" à 30 C que de « flore totale ».

Dans le contexte des eaux chaudes sanitaires ou des eaux de tours aéroréfrigérantes, le dénombrement de la flore mésophile aérobie à 30°C peut, dans certaines situations, apporter une information supplémentaire, à interpréter en parallèle des résultats de dénombrement de *Legionella*. Le dénombrement de la flore mésophile aérobie est réalisable sur tout type d'eau.

7.1.2 ATP-métrie

Le principe est de détecter un indicateur de l'activité métabolique des bactéries pour prouver la présence de bactéries vivantes dans l'échantillon. L'indicateur d'activité métabolique recherché est l'ATP. L'ATP-métrie peut être appliquée pour la détection et la quantification d'une activité bactérienne totale, en laboratoire ou sur le terrain. Elle peut être intéressante dans le cadre de suivi de désinfection, pour aider à la prise de décision (Lee and Deininger 2004; Trudil *et al.* 2000).

L'objectif est de détecter et éventuellement quantifier une activité métabolique dans un échantillon, qui peut témoigner d'une contamination biologique. A titre d'exemple, l'ATP-métrie peut être utilisée pour évaluer la biomasse et donc le niveau d'encrassement d'une tour aéroréfrigérante (Van der Kooij *et al.* 2005). Cette méthode peut venir en complément d'une autre méthode plus spécifique. Elle permet la quantification de l'ATP et la détection des bactéries viables cultivables et non cultivables.

L'ATP-métrie est *a priori* utilisable sur tout type d'eau.

7.2 Recherche d'amibes

Le principe le plus répandu pour la recherche d'amibes est la culture. En laboratoire, les amibes sont généralement cultivées à 25°C sur milieu d'agar non nutritif⁴² ensemencé avec des bactéries (e.g. *E. coli*) servant de substrat nutritif. La température de culture doit cependant être adaptée spécifiquement à chaque espèce. Ce milieu permet également leur isolement (Srikanth and Berk 1993). Le typage des amibes peut se faire sur une base morphologique ou par une approche moléculaire avec l'utilisation de la q-PCR (Behets *et al.* 2006; Pelandakis and Pernin 2002) à partir d'ADN (Myjak *et al.* 1997; Pilcher *et al.* 2007a) ou d'ARN ribosomique 18S purifié (Pilcher *et al.* 2007b).

A noter que les recherches d'amibes sont relativement lourdes à mettre en œuvre et coûteuses

⁴² Gélose qui ne sert que de support

Dans le contexte des eaux chaudes sanitaires ou des eaux de tours aéroréfrigérantes, la recherche des amibes peut, dans certaines situations, apporter une information supplémentaire, à interpréter en parallèle de résultats de dénombrement de *Legionella*.

7.3 Analyse du biofilm

L'analyse nécessite l'accès aux surfaces des réseaux d'eau et circuits de refroidissement, suivi d'une récupération du biofilm. Une fois le biofilm récupéré, la présence, la quantification de *Legionella* ou la quantification de biomasse peuvent être déterminées par toutes les techniques de dénombrement de *Legionella* précédemment évoquées, en adaptant les protocoles aux spécificités du biofilm. Les microorganismes du biofilm n'échappent pas aux notions de viabilité, cultivabilité.

Dans le contexte des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, l'analyse du biofilm peut avoir au moins deux objectifs :

- la recherche de *Legionella* ;
- le suivi d'une installation.

Dans les deux cas, la difficulté repose principalement sur le mode et le lieu du prélèvement, si l'on veut qu'il soit représentatif du circuit et reproductible. C'est sans doute ce qui freine aujourd'hui son utilisation. On peut citer quelques points critiques du prélèvement, qui peuvent avoir une grande influence sur les résultats d'analyse obtenus (Ditomaso *et al.* 2010; Stout and Yu 2010) :

- écouvillonnage direct sur une surface accessible de bassin de TAR, au robinet ou dans la pomme de douche ;
- utilisation de manchettes témoins placées sur le circuit, avec récupération du biofilm par écouvillonnage, ultrasons, décapage chimique ou autre technique, en vue d'analyses ultérieures
- utilisation de manchettes témoins placées sur le circuit avec extraction des supports en vue de mesures directes sans enlèvement du biofilm : microscopie, goniométrie ;
- mesure directe, « capteur de biofilm » : capteur thermique, capteur électrochimique (électrode à disque tournant) ; ces capteurs ne sont cependant pas spécifique du biofilm, mais d'un encrassement, dans lequel le biofilm a un rôle variable.

Les recherches de *Legionella* dans le biofilm peuvent permettre de confirmer leur présence latente dans une installation, alors que les analyses d'eau présentent des résultats négatifs. Les expériences de gestion d'installation ou de prévention du risque lié aux *Legionella* basées sur l'analyse du biofilm sont rares (Farhat *et al.* 2010).

7.4 Analyse des aérosols

La structure des aérosols est de nature complexe. Les gouttelettes le composant comportent aussi bien des éléments viables (cellules ou spores bactériens, fragments de mycélium et spores fongiques, cellules et kystes de protozoaires, etc.) que des virus et des éléments non viables (fragments cellulaires et composants de la paroi, en particulier des endotoxines). Ces éléments peuvent se présenter sous la forme d'éléments biologiques individualisés (cellules, spores, kystes) ou d'assemblages complexes d'éléments biologiques entre eux (agrégats, vésicules, etc.) ou avec des éléments non-biologiques.

La composition des aérosols est extrêmement variable en fonction de la source d'origine. Elle diffère également sensiblement de cette dernière par l'état des éléments qui le compose. Ainsi certains auteurs ont montré, en réalisant des essais comparatifs d'appareil de collecte et de méthode de dénombrement, que *L. pneumophila* était affectée par l'aérosolisation et le prélèvement d'air et en particulier que sa cultivabilité était fortement diminuée en dépit d'une composition en bactéries viables et infectieuses quasi inchangée (Berthelot *et al.* 2009; Deloge-Abarkan *et al.* 2007). Par ailleurs, les conditions environnementales (température, hygrométrie, etc.) impactent fortement sa composition.

La mesure des microorganismes dans les aérosols a été envisagée dans son aspect réglementaire pour l'évaluation et la surveillance des microorganismes sur les lieux de travail et des règles à appliquer dans ce domaine sont définies depuis 2000 par la norme NF EN 13098. Toutefois, à l'heure actuelle, il n'existe pas de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) pour les bioaérosols microbiens en milieu professionnel, car on ne dispose que de peu d'éléments sur la relation dose-effet de ces agents. Il existe seulement des valeurs-guides (encore appelées critères d'action) établies sur la base des publications existantes (Goyer *et al.* 2001). Les rares recommandations de valeur limite existantes concernent les activités qui produisent de grandes quantités de moisissures, comme

Anses

certaines postes de salaison et charcuterie. D'une manière générale, plus l'aérosol est chargé en micro-organismes, plus son pouvoir pathogène est considéré comme élevé (Géhin *et al.* 2009).

Les méthodes de détection et de quantification des microorganismes dans les aérosols sont calquées sur celles utilisées pour la détection et la quantification dans l'eau (culture, amplification génique, méthodes immunologiques hybridation, etc.). Elles présentent donc exactement les mêmes limites et avantages que celles décrites dans le présent document. Mais elles sont de plus très fortement impactées par le mode de prélèvement des échantillons, lequel dépend de l'appareillage de collecte pour lequel il n'existe ni norme, ni standard. Cet appareillage peut faire appel à trois principes fondamentaux : l'impaction (où le flux d'air aspiré traverse une grille avant de venir impacter une surface cible servant de support de collecte, généralement un milieu gélosé), la filtration (où le flux d'air traverse un média filtrant de type capillaire ou poreux retenant les éléments en suspension) et l'impingement (une variante de l'impaction dans laquelle la collecte se fait par contact entre le flux d'air entrant et un liquide de collecte, le plus souvent de l'eau ou du sérum physiologique) (Duquenne and Greff-Mirguet 2005).

Certains de ces appareils revendiquent une possibilité de quantification de *Legionella*. Cependant, la prise de décision sur la base de résultats obtenus avec ces appareils reste compliquée, notamment en cas d'une détection à un taux élevé. En effet, aucune référence bibliographique n'a été répertoriée concernant les concentrations dans l'air présentant un risque pour la population. Par ailleurs, le pouvoir pathogène véhiculé par les aérosols diminue normalement en fonction de l'augmentation de la distance à la source d'émission. Mais cette décroissance nécessite d'être pondérée ainsi le paramètre éolien qui modifie fortement le rayon d'action potentiel, rend l'évaluation de la dangerosité plus délicate.

Dans le cas des *L. pneumophila*, l'évaluation du pouvoir infectieux d'un aérosol nécessite également la prise en compte d'autres paramètres que la stricte quantité des bactéries dénombrées. Ainsi la taille des gouttelettes véhiculées a un impact important sur l'infectiosité. Un aérosol contenant des *L. pneumophila* est considéré comme possédant un pouvoir infectieux élevé si les gouttelettes d'eau qui le composent sont comprises entre 2 et 5 μm (Baron and Willeke 1986; Bollin *et al.* 1985; Girod *et al.* 1982). Ce paramètre essentiel n'est que difficilement évaluable avec les appareils de collecte actuels. Plusieurs auteurs ont montré la relation étroite existant entre amibes et *L. pneumophila*, et en particulier la capacité des amibes à générer des vésicules chargées en *L. pneumophila* d'une taille compatible avec l'inhalation (entre 2 et 5 μm) (Berk *et al.* 1998; Rowbotham 1980). La présence de ces vésicules à l'état libre dans le milieu source pourrait être facteur de dangerosité supplémentaire lors de la formation d'aérosols. En effet, ces vésicules sont résistantes aux désinfections. Elles peuvent rester intactes au delà de 6 mois sans que les bactéries qu'elles hébergent perdent leur pouvoir infectieux (Bouyer *et al.* 2007). Selon certains auteurs, cet assemblage complexe pourrait rendre les *L. pneumophila* hébergées susceptibles d'être facilement transportés lorsque des aérosols sont émis. L'existence de ces vésicules pourrait expliquer certains paradoxes au regard de la dose infectieuse, tels que le fait que certaines tours aéroréfrigérantes avec un relativement faible nombre de *L. pneumophila* puissent être des sources de Légionellose, ou encore que des tours restent des sources d'infection 24 heures après un traitement par des biocides ou encore que des cas de légionelloses ait été identifiés à des kilomètres d'une source, distance à laquelle les bactéries libres sont normalement affectées par la dessiccation (Berk *et al.* 1998). De fait, le cas des aérosols constitue un problème de complexité supérieure à celui de l'eau qui mériterait à lui seul un traitement à part.

8 Comparaison des différentes méthodes

8.1 Critères d'équivalence de méthodes de dénombrement de microorganismes

Les critères d'ordres mathématiques permettant d'établir une équivalence entre différentes méthodes de dénombrement de microorganismes, doivent être distingués des paramètres de performances intrinsèques à chaque méthode.

En application de la directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil, la décision de la Commission du 21 janvier 2009 désigne la norme ISO 17994:2004(E) en tant que norme pour l'équivalence des méthodes microbiologiques (CE 2009). Cette norme définit une procédure d'évaluation qui permet de comparer deux méthodes visant à détecter ou à quantifier le même groupe cible ou la même espèce de micro-organisme. Elle fournit les bases mathématiques pour évaluer les performances relatives moyennes des deux méthodes par rapport à des critères d'équivalence déterminés⁴³.

Dans son avis de 2008, relatif à l'équivalence des méthodes alternatives par rapport aux méthodes de référence dans le domaine des eaux destinées à la consommation humaine (Saisine 2007-SA-0192), l'Afssa (AFSSA 2008), recommande, dans le cadre d'une évaluation d'équivalence de deux méthodes analytiques, d'ajouter aux principes de la norme EN ISO 17994 :2004, une étude préalable visant à vérifier ou même évaluer l'équivalence de la méthodologie alternative par rapport à la méthode de référence. Cette évaluation se ferait sur des critères classiques de validation et dans le domaine de l'eau de consommation (sélectivité, linéarité, exactitude relative, répétabilité...).

L'Afssa pointe également une ambiguïté de la norme EN ISO 17994 :2004 d'un point de vue statistique. Contrairement au titre de la norme, le test d'égalité par lequel elle se conclue n'est pas réellement un test d'équivalence, car il exclut la notion de tolérance. En effet c'est l'hypothèse nulle qui est testée, et plus l'écart type des différences entre les résultats est élevé, plus il est facile de valider l'équivalence, alors qu'un écart-type faible entre les résultats de la méthode alternative rend la validation plus difficile, en comparaison avec la méthode de référence. L'un des risques majeurs de cette pratique est la possibilité de rejeter, sur cette base statistique, les méthodes les plus performantes selon les critères classiques de caractérisation des méthodes analytiques.

Dans le cadre du présent rapport, il est souligné deux difficultés supplémentaires pour l'application de la norme EN ISO 17994 :2004 à l'évaluation de l'équivalence de méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau.

En premier lieu, l'application de cette norme implique l'existence d'une méthode de référence donnant des résultats avec une justesse satisfaisante. Dans le cas du dénombrement de *Legionella* dans l'eau, la méthode de référence d'un point de vue réglementaire (culture - norme NF T90-431), dénombre les seules bactéries cultivables. Comme évoqué précédemment, la question de l'intérêt sanitaire de détecter certaines bactéries non cultivables reste posée. Ainsi, la pertinence d'utiliser la méthode par culture comme référence dans le cadre d'une éventuelle étude d'équivalence peut être discutée. Dans le cas où la méthode par culture ne serait pas retenue comme méthode de référence pour une telle étude, le choix d'une autre méthode de référence semble problématique.

En second lieu, selon la norme EN ISO 17994 :2004, celle-ci est applicable à "deux méthodes quelconques de dénombrement fondées sur des comptages (de colonies ou de tubes positifs) ou deux méthodes quelconques de détection (méthodes présence/absence) visant au même objectif...".

⁴³ Pour évaluer le résultat de la comparaison, "l'intervalle de confiance" de l'incertitude élargie autour de la moyenne se calcule en évaluant :

- la limite inférieure : $L = m - U$
 - la limite supérieure : $H = m + U$
- ou m = moyenne arithmétique de la différence relative en %
 et U = incertitude élargie, calculée à partir de l'incertitude-type de la moyenne des différences relatives (issue de l'écart-type de la différence relative), avec un facteur d'élargissement = 2
 $U = 2 \times (\text{écart-type}) / \text{racine}(\text{nombre d'échantillons})$

Un écart maximal admissible est choisi en fonction du contexte et des objectifs fixés (par exemple $D=10\%$).

Deux méthodes sont dites "sans différence" lorsque : $-D \leq L \leq 0$ et $0 \leq H \leq D$

Cette procédure permet de comparer deux méthodes visant au même objectif.

Anses

En d'autres termes, cette norme est applicable à des méthodes de dénombrement microbiologique donnant des résultats à partir de boîtes ou de tubes de culture, dans les mêmes unités. Elle ne prévoit pas d'application à la comparaison de méthode donnant des résultats dans des unités différentes.

Pour ces différentes raisons, l'utilisation de la norme EN ISO 17994 :2004 pour établir une équivalence entre les différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* semble peu pertinente.

Toujours dans le cadre du dénombrement de *Legionella* dans l'eau, l'application du protocole Afnor "Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence", dans sa version "Révision 0", adoptée le 28 juillet 2008 (Afnor 2008), semble se heurter aux mêmes difficultés que celles évoquées pour la norme EN ISO 17994 :2004, avec la même conclusion concernant sa pertinence.

Dans le domaine alimentaire, il semble intéressant de signaler la norme NF EN ISO 16140, d'octobre 2003. Elle est utilisée pour valider des méthodes alternatives, et utilisant des principes de détection des microorganismes très variables (impédancemétrie, PCR, etc.), par rapport à des méthodes de références, généralement la culture sur boîtes gélosées. Elle peut s'appliquer à des méthodes qualitatives ou quantitatives. Ses principes reprennent les paramètres de description et de choix des méthodes d'analyses déjà listées dans ce rapport, en y associant des calculs d'exactitude relative et des biais. Il pourrait être envisagé d'utiliser cette norme pour tenter de comparer différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. Cependant, aucun exemple de son application à des méthodes d'analyse d'eau n'a été répertorié. De surcroît, elle n'aborde pas du tout le problème de la diversité des unités d'expression des résultats.

Aucune méthode normalisée n'ayant fait ses preuves pour établir l'équivalence entre différentes méthodes de dénombrement microbiologique dans l'eau n'a été identifiée. De surcroît, les publications revues par le groupe de travail qui décrivent des comparaisons de résultats obtenus à partir de plusieurs méthodes n'utilisent pas les normes citées ci-dessus. En conséquence, pour la suite de ce chapitre, la discussion relative à la comparabilité des unités et des méthodes ne tient pas compte des normes précitées.

8.2 Comparabilité des unités

Les unités dans lesquelles les résultats de dénombrement de *Legionella* sont exprimés sont liées au type de méthode mise en œuvre. Ainsi, les résultats peuvent être exprimés en UG/L (méthode par biologie moléculaire), UFC/L (méthode par culture) ou cellules/L (cytométrie ou microscopie), avec pour conséquence des difficultés de comparaison.

Pour rappel, l'unité des résultats obtenus par culture est l'UFC (Unité formant colonie), qui correspond à une colonie observée sur un milieu de culture lors du dénombrement, et l'unité des résultats obtenus par q-PCR ou v-PCR est l'UG (Unité génome), qui correspond chez les bactéries à un réplicon⁴⁴ (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

Le fait que la concentration bactérienne d'un même échantillon évaluée par amplification génique (en UG/L) soit sensiblement supérieure à la concentration de ce même échantillon évalué par culture (en UFC/L), peut avoir différentes explications :

- une part importante des *Legionella* de l'échantillon peut être composée de cellules mortes mais contenant encore leur ADN ;
- de la même manière, l'échantillon peut contenir beaucoup de VBNC (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Joly *et al.* 2006) ;
- s'agissant de la culture, certaines publications évoquent l'hypothèse selon laquelle plusieurs cellules de *Legionella* pourraient être agrégées et n'être à l'origine que d'une colonie, minimisant ainsi le résultat (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009). La norme ISO 8199:2005 indique cependant que "Pour des raisons pratiques, chaque colonie est considérée comme provenant d'un seul micro-organisme ou d'un agrégat de micro-organismes...". Aucune référence bibliographique

⁴⁴ Molécule d'ADN ou d'ARN, ou une région d'ADN ou d'ARN pouvant se répliquer à partir d'une seule origine de réplication. Le réplicon est l'unité de réplication de l'ADN bicaténaire.

permettant de confirmer cette hypothèse n'ayant été trouvée, notamment pour *Legionella*, le groupe de travail ne peut se positionner sur ce point ;

- certaines souches de *Legionella* sont susceptibles de contenir un nombre de copies de la zone génomique à amplifier plus important que la souche utilisée pour établir la courbe étalon servant à la quantification (Joly *et al.* 2006). L'étalon national maintenant disponible pour le dénombrement de *Legionella* par q-PCR prend en compte cette possibilité ;
- la croissance de *Legionella* sur un milieu de culture peut être inhibée par la présence d'autres microorganismes, qui n'influencent pas les résultats de la q-PCR ou de la v-PCR (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009) ou à cause des prétraitements (acide ou thermique) appliqués à l'échantillon avant l'ensemencement (Joly *et al.* 2006; Yaradou *et al.* 2007) ;
- les méthodes mettant en œuvre la q-PCR peuvent être simplement plus sensibles que les méthodes par culture (Dusserre *et al.* 2008), même si les résultats des deux méthodes et leurs unités ne sont pas strictement comparables (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

Pour les méthodes dont les données disponibles permettent d'envisager une comparaison, il est constaté que les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats ne sont pas strictement comparables. Toutefois, il semble intéressant de tenter d'établir des corrélations entre les résultats exprimés dans différentes unités.

8.3 Comparabilité des limites de détection et de quantification

La comparaison des limites de détection et de quantification doit être modulée en fonction des cibles de la méthode et des ajustements que permettent par les prétraitements.

Selon la norme NF T90-431, la limite de détection théorique de la culture est de 50 UFC/L et sa limite de quantification est de 250 UFC/L. Ces données ne tiennent pas compte du rendement. Toujours pour la culture, selon la norme ISO 11731-2, la limite de détection est de 1 UFC/L, pour un rendement de 100 %.

Joly *et al.* ont conduit une étude qui amène plus d'informations sur le cas du dénombrement de *Legionella* par q-PCR dans les eaux chaudes sanitaires (223 échantillons) ou les tours aéroréfrigérantes (37 échantillons). Les cibles choisies étaient le gène *mip* pour le dénombrement des *L. pneumophila* (Cloud *et al.* 2000) et le gène codant pour l'ARNr 16S pour le dénombrement des *L. spp.* (Wellinghausen *et al.* 2001). Deux laboratoires ont participé à l'étude. Dans les conditions de cette étude, les limites de détection et de quantification de la q-PCR étaient comprises entre 250 et 300 UG/L et entre 1000 et 5000 UG/L pour *L. pneumophila*, et entre 30 et 250 UG/L et 500 et 5000 UG/L pour *L. spp.*, selon le laboratoire. Il est à noter que cette étude ne prend pas en compte la présence éventuelle de désinfectants dans les eaux analysées (Joly *et al.* 2006).

Morio *et al.*, ont mené une étude par q-PCR sur des eaux chaudes sanitaires traitées et non traitées (68 échantillons issus d'eau traitée au chlore, 6 à l'acide peracétique et 15 filtrés). La cible choisie pour le dénombrement des *L. pneumophila* était le gène *mip*. Les limites de détection et de quantification mesurées dans ces conditions étaient respectivement de 100 UG/L et 800 UG/L. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Joly *et al.* Les auteurs n'apportent pas de commentaires concernant l'influence des traitements de l'eau sur les résultats des méthodes par q-PCR et culture testées (Morio *et al.* 2008).

Selon Dusserre *et al.* la méthode par q-PCR (limite de détection : 170 GU/L) est moins sensible que les méthodes TVC (limite de détection : 1 cellule par échantillon filtré) et par immuno-détection avec lecture par cytométrie d'image (limite de détection : 1 cellule par échantillon filtré) (Dusserre *et al.* 2008). Cette indication reste cependant à prendre avec précaution, d'autant plus que l'expérimentation a été réalisée sur de l'eau distillée dopée en *Legionella*, ce milieu n'étant pas nécessairement représentatif des eaux environnementales.

Selon Lemarchand *et al.*, la limite de quantification des méthodes par immuno-détection serait comprise entre 10 et 5.10^7 cellules/L, cependant l'étude réalisée par cette équipe ne porte pas sur le dénombrement de *Legionella* mais sur *E. coli*. Cette limite est peut-être extrapolable, mais de fait non avérée (Lemarchand *et al.* 2001).

Pour envisager la comparaison des limites de détection et de quantification relatives à différentes méthodes il est nécessaire que celles-ci soient éprouvées et stabilisées, par exemple par l'introduction d'une norme. Des méthodes de dénombrement alternatives apparaissent prometteuses, mais elles n'ont pas encore été validées par une application sur un grand nombre d'échantillons d'eau naturelle et par un grand nombre d'utilisateurs.

8.4 Comparaison des méthodes en fonction des différents types d'eau

L'évaluation ou la comparaison des méthodes de dénombrement de *Legionella* peuvent être réalisées sur différents types d'eaux : eauxensemencées expérimentalement, eaux chaudes sanitaires, eaux de tours aéroréfrigérantes. Le présent chapitre porte sur les principales études de comparaison répertoriées dans la littérature.

8.4.1 Eauxensemencées expérimentalement

La plus grande partie des études destinées à comparer des méthodes de dénombrement de *Legionella* a été menée avec des eauxensemencées expérimentalement.

Selon plusieurs auteurs, l'analyse d'un échantillon d'eau non traitée,ensemencé expérimentalement avec 10^6 UFC/L de *L. pneumophila*, donne des résultats comparables, quelle que soit la méthode utilisée : q-PCR (avec ou sans filtration préalable de l'échantillon), TVC, immuno-détection, ou culture. Les résultats obtenus sont tous proches de 10^6 , qu'ils soient exprimés en CFU /L, UG/L ou cellules/L (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005; Dusserre *et al.* 2008).

Une étude récente mettant en jeu d'autres méthodes, menée sur une eau du robinet stérilisée, puis artificiellement contaminée par *L. pneumophila* sg 1, semble parvenir aux mêmes conclusions. L'objectif était de comparer la méthode d'analyse par culture (9 échantillons analysés) à deux méthodes de détection après marquage immuno-fluorescent des cibles : détection par cytométrie en flux (6 échantillons analysés) et détection par microscopie (30 échantillons analysés). Les trois méthodes semblent corrélées. Cependant, le faible nombre d'échantillons empêche de tirer des conclusions significatives de cette étude (Fuchslin *et al.* 2010).

L'analyse d'un échantillon d'eau traitée par des concentrations croissantes de chlore libre, dopée en éléments organiques (peptones), puisensemencée expérimentalement avec 10^6 CFU/L de *L. pneumophila* (incubation de 24h), abouti à des résultats très différents en fonction de la méthode utilisée (Dusserre *et al.* 2008) :

- la méthode par culture, que ce soit sur milieu BCYE ou GVPC, ne permet plus de détecter la présence de *L. pneumophila* dès 0,5 mg/L de chlore, indiquant que la croissance de *L. pneumophila* est inhibée ;
- la méthode TVC détecte de moins en moins de cellules de *L. pneumophila* à partir de 0,5 mg/L de chlore jusqu'à une détection nulle à 30 mg/L ;
- la méthode par immuno-détection détecte une quantité identique de cellules jusqu'à 3 mg/L puis n'en détecte plus à 30 mg/L ;
- la méthode par q-PCR détecte la même quantité de cellules jusqu'à 1 mg/L et n'en détecte plus à 3 mg/L.

Par ailleurs, d'après Delgado-Viscogliosi *et al.* (2009), les signaux émis par culture et par v-PCR diminuent dès 0,4 mg/L de chlore libre, alors que celui émis par la q-PCR ne diminue qu'à partir de 0,6 mg/L de chlore libre (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

D'après Dusserre *et al.* (Dusserre *et al.* 2008) :

- le chlore affecte la viabilité (mesurée par TVC ou v-PCR) et la cultivabilité (mesurée par culture) de *L. pneumophila*, à des concentrations moindres que celles qui affectent l'ADN bactérien (mesuré par q-PCR) et les protéines cibles de l'immuno-détection ;
- dans un échantillon d'eau traitée par le chlore, la méthode par culture se révèle être la moins sensible pour la détection de la présence de *L. pneumophila* ;

Anses

- les méthodes par q-PCR et par immuno-détection détectent à la fois les *L. pneumophila* viables (cultivables ou non cultivables) et non viables, alors que les méthodes par culture et TVC mesurent respectivement les bactéries cultivables et viables ;
- un petit nombre de bactéries, incluant probablement quelques cellules viables, sont présentes dans certains échantillons traités avec 3 mg/L de chlore, dans lesquels la q-PCR ne détecte rien alors que les méthodes par TVC et par immuno-détection révèlent un signal.

Ces résultats confirment ceux d'une étude (Bej *et al.* 1991) menée sur des eaux stérilisées puis ensemencées expérimentalement, avec les méthodes de dénombrement par q-PCR (cible : gène *mip*, selon Mahubani, 1987) et par culture (culture sur milieu BCYE). Ces méthodes sont utilisées en parallèle sur des échantillons traités par le chlore (10^{-4} mg/L pendant différents temps) ou par la chaleur (70°C pendant différents temps). Le traitement de l'eau par la chaleur semble avoir le même effet sur les résultats obtenus avec les deux méthodes : après 10 minutes à 70°C, les *L. pneumophila* ne sont plus détectées. En revanche, il semble que le traitement de l'eau par le chlore fasse diminuer le signal obtenu par culture plus vite que celui obtenu par q-PCR. Après 2 minutes de traitement par le chlore, les résultats obtenus par culture sont inférieurs à la limite de détection de la méthode, alors que ceux obtenus par q-PCR révèlent la présence de *Legionella* après 10 minutes de traitement. Les auteurs expliquent cela comme le passage de *Legionella* dans un état viable mais non cultivable sous l'effet du chlore, en prenant comme hypothèse discutable que la q-PCR ne détecte que les bactéries viables.

Une méthode par immuno-détection a également été testée sur ce type d'eau. Une équipe de recherche a testé des échantillons d'eaux stériles artificiellement contaminées, à partir de différentes souches de *Legionella* déjà isolées, à l'aide de la cytométrie en flux, après un marquage spécifique des cellules cibles par deux fluorochromes. Douze souches de *Legionella* ont été testées : 7 souches de *L. pneumophila* sg 1 (Philadelphia, "Paris, 044, 066, BAC, MAR et VAR), une souche de *L. pneumophila* sg 4, une souche de *L. pneumophila* sg 6, une souche de *L. pneumophila* sg 13, une souche de *L. anisa* et une souche de *L. micdadei*. Après un choc thermique de 30 minutes à 70°C, tel que préconisé par les autorités françaises pour la décontamination des circuits d'eau des établissements de santé (Circulaire DGS du 22 avril 2002), pour 6 de ces souches, 10 à 25 % des cellules restent viables (Allegra *et al.* 2008) ce qui peut paraître inquiétant.

Les méthodes de dénombrement de *Legionella* par q-PCR sont susceptibles de surestimer le nombre de bactéries infectieuses. En effet, la détection d'un gène ou d'une protéine spécifique d'une bactérie ne renseigne pas sur son état de viabilité et d'infectiosité (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Selon Yaradou *et al.*, cela rend les résultats de dénombrement de *Legionella* obtenus par q-PCR difficiles à interpréter d'un point de vue sanitaire (Yaradou *et al.* 2007).

A contrario, la culture conduirait à sous-estimer la concentration de *Legionella* présentes dans les échantillons, d'autant plus dans des conditions environnementales susceptibles de stresser les *Legionella*, comme les traitements chimiques ou thermiques de l'eau (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

Il est établi que l'ADN de bactéries non viables peut résister dans l'environnement (Nocker and Camper 2006). Cependant, au-delà d'une certaine concentration de chlore, l'intégrité de l'ADN semble affectée, au point d'empêcher toute amplification par PCR, aussi bien par q-PCR que par v-PCR. Selon Delgado-Viscogliosi *et al.*, cette concentration en chlore est de l'ordre de 1 mg/L (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009), alors que Dusserre *et al.*, qui utilisent un tampon phosphate, dans le cadre de leurs analyses, la situent entre 1 et 3 mg/L (Dusserre *et al.* 2008). Une étude de Chang *et al.*, menée avec une méthode très proche, combinant l'utilisation de l'EMA et la q-PCR, semble confirmer les résultats de Dusserre *et al.* (Chang *et al.* 2009).

Concernant les traitements susceptibles d'affecter différemment les résultats des différentes méthodes, 3 méthodes d'analyse (culture, q-PCR et v-PCR) ont été testées pour évaluer leur pertinence dans le cadre du suivi de l'efficacité de traitements d'eau (eaux domestiques artificiellement ensemencés).

- Traitement thermique :
D'après une expérimentation menée par Delgado *et al.*, sur un échantillon contenant avant traitement environ 7,5 log d'UG ou UFC/mL de *L. pneumophila*, après 1h à 70°C (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009) :
 - la méthode par q-PCR révèle une concentration en *L. pneumophila* en UG/L inchangée : environ 7,5 log d'UG/mL ;

Anses

- la méthode par v-PCR révèle une forte diminution de la concentration en *L. pneumophila* en UG/L : une réduction du signal q-PCR proche de plus de 99,9 % (environ 3,2 log d'UG/mL restant) ;
- la méthode par culture (norme Afnor NFT90-431), révèle une absence de *L. pneumophila* cultivables (UFC).

Une étude de Chang *et al.*, menée avec une méthode très proche, combinant l'utilisation d'EMA et de la q-PCR, semble confirmer les résultats de l'étude précédente (Chang *et al.* 2009).

- Traitement par le chlore :

Dans le cadre d'une expérimentation menée avec un échantillon d'eau contenant avant traitement 10^5 UFC/L de *L. pneumophila*, les analyses sont réalisées après 24 h d'exposition aux différentes concentrations en chlore testées (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009) :

- le signal émis par la culture décroît à partir d'une concentration en chlore de 0,2 mg/L et n'est plus détecté à partir de 0,5 mg/L. Cela signifie qu'à partir de cette concentration, il n'y a plus de *L. pneumophila* cultivable.
- le signal émis par la méthode q-PCR est de l'ordre de 10^6 UG/L de *L. pneumophila* avant traitement (10^5 UFC/L mesurés par culture). Ce signal diminue fortement à 1 mg/L de chlore.
- le signal émis par la méthode v-PCR est de l'ordre de 10^6 UG/L de *L. pneumophila* en avant traitement (10^5 UFC/L mesurés par culture). Ce signal commence à diminuer à partir à 0,5 mg/L de chlore et n'est plus détecté à 1 mg/L.

Pour expliquer l'absence de signal par la méthode par culture dès 0,2 mg/L de chlore alors que les méthodes par q-PCR et v-PCR ne révèlent pas de diminution des concentrations en UG/L, deux hypothèses sont formulées par les auteurs :

- soit la présence de chlore à cette concentration stresse les cellules de *Legionella* au point de les rendre non cultivables, mais sans pour autant avoir un effet sur leur intégrité membranaire,
- soit le chlore, à cette concentration, ne permet pas une perméabilisation suffisante des membranes pour laisser pénétrer les molécules d'EMA dans les cellules, la trop faible quantité d'EMA au contact de l'ADN ne pouvant pas, dans ce cas, affecter l'intensité du signal v-PCR.

A partir de 0,5 mg/L de chlore, les membranes des cellules commenceraient à laisser passer les molécules d'EMA qui se lie avec l'ADN des cellules endommagées, en empêchant son amplification PCR. Ainsi, à cette concentration, il semble que le signal de la v-PCR représente les cellules de *Legionella* viables ou conservant une bonne intégrité membranaire, alors que le signal q-PCR représente l'ensemble des cellules, viables et non viables (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

- Traitement par le glutaraldehyde :

D'après une expérimentation menée par Delgado *et al.*, avec un échantillon d'eau contenant avant traitement $10^{5,3}$ UFC/L de *L. pneumophila* (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009) :

- le signal émis par culture disparaît après 30 minutes de traitement avec 500 mg/L de glutaraldéhyde. Cela signifie qu'à partir de ce couple temps/concentration, il n'y a plus de *L. pneumophila* cultivable.
- le signal émis par la méthode q-PCR, de l'ordre de 10^6 UG/L de *L. pneumophila* ($10^{5,3}$ UFC/L mesurés par culture), varie peu au cours de l'expérimentation.
- le signal émis par la méthode v-PCR, de l'ordre de 10^6 UG/L de *L. pneumophila* (pour $1 \cdot 10^5$ UFC/L mesuré par culture), diminue fortement (4,5 log) pendant les 30 premières minutes du traitement, ce qui semble indiquer une forte baisse du nombre de *L. pneumophila* viables. La concentration en *L. pneumophila* viable remonte ensuite progressivement (de 1 log en 48h).

Sur la base de ces résultats, Delgado-Viscogliosi *et al.* estiment le signal de v-PCR plus représentatif du potentiel pathogénique d'une eau chaude sanitaire contenant des *L. pneumophila*, que celui mesuré par q-PCR. Des essais doivent encore être menés pour vérifier que cette méthode est utilisable dans le contexte des tours aérorefrigérantes (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

D'après les études menées sur des eaux préparées en laboratoire, dans des conditions idéales de croissance maîtrisée et sans stress ajouté (désinfectant, traitement thermique, etc.), certaines méthodes (culture, q-PCR, TVC, immuno-détection) apparaissent équivalentes. Tout écart par rapport à ces conditions idéales, notamment un traitement thermique de l'eau ou la présence de chlore, affecte les résultats de façon différente selon les méthodes et perturbe leur équivalence.

8.4.2 Eaux environnementales

Aussi intéressants que soient les résultats d'études menées avec des eaux expérimentales, dans le cadre d'un travail portant sur des méthodes d'analyse d'eaux environnementales en routine, les études qui génèrent le plus d'informations pertinentes sont celles réalisées avec des eaux environnementales.

L'analyse réalisée en système fermé consécutivement à un traitement (thermique, chlore, glutaraldehyde) semble confirmer que la méthode par culture est susceptible de sous-estimer et la q-PCR de surestimer le nombre de bactéries viables. Ce dernier élément doit toutefois être pondéré car il est directement issu de la comparaison entre la q-PCR et la v-PCR dans des conditions différentes de celles appliquées aux échantillons réels, les auteurs étant partis du principe que les résultats de culture et v-PCR sont très proches, sans le démontrer (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009).

En effet, une partie des résultats de v-PCR a été générée en système fermé. Ces résultats ne tiennent pas compte du fait qu'en conditions réelles, le traitement d'une installation est généralement suivi d'un rinçage du système, lequel élimine une grande partie des bactéries en circulation, notamment les bactéries mortes.

Une grande partie des études destinées à comparer des méthodes de dénombrement de *Legionella*, menées avec des eaux environnementales, portaient sur les méthodes par culture et par q-PCR.

Ainsi, Wellinghausen *et al.* ont étudié le rapport entre les résultats de dénombrement de *Legionella* obtenus par culture et par q-PCR, sur 77 échantillons d'eaux chaudes sanitaires (46°C +/- 9°C), provenant de 3 hôpitaux, sans prendre en compte les éventuels produits de traitement résiduels présents dans ces échantillons. Les cibles (*L. spp.*, *L. pneumophila* et *L. pneumophila* sg1) ont été dénombrées par culture (milieu GVPC) et par q-PCR (gène codant pour l'ARNr 16S pour *L. spp* et *mip* pour *L. pneumophila*). Dans ces conditions, le coefficient de corrélation observé entre les résultats de culture et ceux de q-PCR a été de 0,57 (Wellinghausen *et al.* 2001).

Toujours concernant les méthodes par culture et par q-PCR, Joly *et al.* ont réalisé une étude sur 223 échantillons d'eaux chaudes sanitaires et 37 échantillons d'eau de tours aéroréfrigérantes. Là encore, les éventuels traitements, appliqués à ces eaux avant les analyses, n'ont pas été pris en compte. *L. spp.*, *L. pneumophila* et *L. pneumophila* sg1 ont été dénombrées par culture (selon la norme Afnor NF T90-431) et par q-PCR. Pour les analyses par biologie moléculaire, la cible était le même gène codant pour l'ARNr 16S que celui utilisé par Wellinghausen pour *L. spp* et le gène *mip* pour *L. pneumophila* utilisé par Cloud *et al.*(2000). La présence d'inhibiteur de PCR a été observée dans 2,7% des échantillons de tours aéroréfrigérantes et dans 0 et 2,3 % des échantillons d'eaux chaudes sanitaires selon les deux laboratoires ayant participé à l'étude.

Dans cette étude, concernant les eaux de tours aéroréfrigérantes, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les résultats de q-PCR et de culture, aussi bien pour les dénombrements de *L. spp* que de *L. pneumophila*. Dans ce type d'eau, il est fréquent d'observer après l'analyse d'un échantillon, un résultat de q-PCR très élevé et un résultat de culture inférieur au seuil de détection.

Concernant les résultats d'analyse des eaux chaudes sanitaires, les coefficients de corrélation observés entre les résultats de culture et ceux de q-PCR pour *L. spp* et *L. pneumophila* sont respectivement :

- de 0,1267 et 0,2369 dans le laboratoire 1 ;
- de 0,5259 et 0,7295 dans le laboratoire 2.

A noter que les eaux chaudes sanitaires analysées par le laboratoire 1 provenaient de multiples origines, alors que celles analysées dans le laboratoire 2 provenaient d'un même hôpital, ce qui peut expliquer partiellement les différences observées (Joly *et al.* 2006).

Yaradou *et al.* (2007) ont réalisés une étude portant sur 136 échantillons d'eaux chaudes sanitaires (provenant de 55 sites) et 49 échantillons d'eau de tour aéroréfrigérantes (provenant de 20 sites). Là encore, les éventuels traitements, appliqués à ces eaux avant les analyses, n'ont pas été pris en compte. *L. pneumophila* a été dénombrée par q-PCR (selon la norme XP T 90-471) et par culture (selon la norme Afnor NF T90-431). Les analyses par biologie moléculaire ont été réalisées avec des kits commerciaux. Les gènes cibles n'étaient donc pas précisés dans la publication. La présence d'inhibiteur de PCR a été observée dans 6,1 % des échantillons de tours aéroréfrigérantes et 2,9 % des échantillons d'eaux chaudes sanitaires.

Concernant les eaux de tours aéroréfrigérantes, le coefficient de corrélation observé entre les résultats de culture et ceux de q-PCR est de 0,187. Pour ce type d'eau, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de la q-PCR sont respectivement de 53,6 % (53,6 % des résultats positifs en q-PCR le sont aussi en culture) et 100 % (100 % des résultats négatifs en q-PCR le sont aussi en culture).

Concernant les résultats d'analyse des eaux chaudes sanitaires, le coefficient de corrélation observé entre les résultats de culture et ceux de q-PCR est de 0,732. Pour ce type d'eau, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative de la q-PCR sont respectivement de 57,5 % et de 80 %. Ces résultats pourraient s'expliquer par une différence de composition des eaux chaudes sanitaires et des eaux de tours aéroréfrigérantes (Yaradou *et al.* 2007).

Toujours concernant les eaux des tours aéroréfrigérantes, une étude comparative, menée pendant 13 mois, sur 104 échantillons, montre que la corrélation entre les résultats obtenus par q-PCR et par culture restent faibles, aussi bien pendant que en dehors des périodes de traitements de décontamination de l'eau réalisés avec le biocide HOBr-isothiozalone (Yaradou *et al.* 2007).

Par ailleurs, quelque soit le type d'échantillon, un résultat de q-PCR non-quantifiable est très souvent associé à une concentration en *Legionella* inférieure à 250 UFC/L (Joly *et al.* 2006).

Pour l'eau des tours aéroréfrigérantes, il semble ne pas y avoir de corrélation (Joly *et al.* 2006) ou une corrélation très faible ($r^2 = 0,19$) (Yaradou *et al.* 2007) entre les résultats obtenus par q-PCR et par culture.

En revanche, pour certaines eaux chaudes sanitaire, selon différents auteurs, même si le signal émis par q-PCR (en UG/L) est le plus souvent supérieur à celui émis par culture (en UFC/L), il semble exister une relation linéaire entre les résultats de dénombrement de *Legionella* en UG/L obtenus par q-PCR et ceux en UFC/L obtenus par culture (Joly *et al.* 2006; Wellinghausen *et al.* 2001; Yaradou *et al.* 2007).

D'autres méthodes de dénombrement de *Legionella* ont également fait l'objet d'études de comparaison, menées avec des eaux environnementales.

La méthode culture-FISH a été récemment comparée à la culture classique (NF T90-431), pour l'analyse d'eaux chaudes sanitaires. La concordance des deux méthodes est de 82% (pourcentage des résultats positifs avec les deux méthodes ou négatifs avec les deux méthodes). La sensibilité du test a été estimée à 91% (Ditomaso *et al.* 2010).

La méthode IDS a également été comparée à la méthode par culture, en analysant plusieurs types d'eaux environnementales (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Les résultats montrent que :

- les échantillons d'eaux froides du robinet ou d'eaux souterraines ne révèlent pas la présence de *Legionella*, ni par IDS, ni par culture ;
- certains échantillons d'eaux environnementales génèrent un signal avec la méthode IDS et une absence de signal par culture. L'inverse n'est jamais observé. Pour leur grande majorité, ces résultats correspondent à des échantillons d'eau chaude (plus de 45°C). Ces résultats pourraient être le fait de la présence de cellules VBNC dans les échantillons.

Ainsi les résultats des deux méthodes ne semblent pas pouvoir être directement comparés, l'une mesurant les cellules viables (IDS) et l'autre les cellules cultivables (culture). Une analyse plus fine des résultats montre que ceux obtenus avec la méthode IDS (en cellules viables/L) présentent une relation linéaire avec ceux obtenus par culture (en UFC/L) quand la concentration en *Legionella* est supérieure ou égale à 1000 UFC/L (mesurée par culture). En deçà de cette concentration, il n'y a pas de corrélation entre les résultats des deux méthodes. Cependant, dans tous les cas les résultats obtenus par IDS (en cellules viables/L) sont systématiquement supérieurs à ceux obtenus par culture (UFC/L), parfois de plus de 2 log. Cela semble montrer que la méthode IDS est plus sensible que la méthode par culture sur ce type d'eau.

Anses

De même, l'immuno-détection a également été comparée à la culture. Aurell *et al.* (2004), ont réalisé une étude sur 26 échantillons d'eaux chaudes sanitaires. *L. spp.* et *L. pneumophila* ont été dénombrées par culture (selon la norme ISO 11731 modifiée⁴⁵) et par immunofluorescence, couplée à une détection par cytométrie en phase solide (cellules/L). Les anticorps utilisés pour les analyses par immunofluorescence étaient : un anticorp polyclonal de lapin anti-Lpsg1 (élaboré par l'équipe à l'aide de différents anticorps conjugués), 1 anticorp polyclonal commercial anti-Lpsg1 FITC, 3 anticorp monoclonaux commerciaux anti-Lpsg(1-14), 1 anticorp monoclonal anti-Lpsg1, 1 anticorp monoclonal anti-Lpsg(2-6,8-10,12-15) (Helbig *et al.* 1997) et 1 anticorp monoclonal anti-Lspp (lp inclus) (Helbig, 1997).

Les résultats obtenus, par immunofluorescence avec détection par cytométrie en phase solide ($1,4 \cdot 10^3$ et $4,1 \cdot 10^6$ cellules/L de *L. pneumophila*), sont systématiquement supérieurs à ceux obtenus par culture ($1,2 \cdot 10^2$ et $1,1 \cdot 10^4$ UFC/L). Cependant, une faible corrélation est mise en évidence ($r^2 = 0,46$).

Pour certains échantillons, la présence de *Legionella* est révélée par immunofluorescence et non par culture. Les échantillons correspondants ayant été prélevés à des températures plus élevées que la moyenne (55°C), cette différence de résultats pourrait s'expliquer par la présence d'une plus grande proportion de *L. pneumophila* sous formes viables non cultivables ou non viables (Aurell *et al.* 2004).

Concernant les traitements susceptibles d'affecter les résultats des différentes méthodes, seul le traitement au chlore a été testé sur des eaux environnementales naturelles.

Actuellement, comme le confirme la circulaire DGS/SD7A n°174, du 19 février 2007, il est préconisé, en France, le maintien d'une concentration en chlore libre de 0,3 mg/L (ou en bioxyde de chlore de 0,15 mg/L) en sortie des réservoirs et de 0,1 mg/L (ou en bioxyde de chlore de 0,05 mg/L) en tout point du réseau de distribution d'eau.

D'après une expérimentation menée sur 6 échantillons d'eaux environnementales (douches, fontaines, eaux chaudes sanitaires, puits) soumises à 10 mg/L de chlore, après 24h de traitement, aucune *Legionella* viable n'a pu être mise en évidence, ni par IDS, ni par culture (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005). Cela semble indiquer que ce traitement est efficace pour tuer les *Legionella* dans une eau environnementale (Kilvington and Price 1990). Delgado *et al.* estiment par ailleurs que les valeurs pertinentes à prendre en compte, pour évaluer le risque lié aux *Legionella*, d'un point de vue sanitaire, doivent se situer entre les valeurs du signal émis par la méthode par culture (normalisée) et celles du signal émit par la méthode IDS (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

Sur des eaux environnementales, dont la qualité est très variable en termes de charge en particules, de composés chimiques et de microorganismes, les méthodes de dénombrement de *Legionella*, qui ont fait l'objet de comparaisons, apparaissent rarement équivalentes. Néanmoins, les corrélations observées entre les résultats des méthodes comparées sont sensiblement meilleures lorsque les eaux sont relativement peu chargées, comme celles des réseaux domestiques, par comparaison avec des eaux chargées, comme celles des tours aéroréfrigérantes.

De manière plus détaillée, concernant la comparaison des méthodes par culture et par q-PCR :

- le signal émis par q-PCR (exprimé en UG/L) est le plus souvent supérieur à celui émis par culture (exprimé en UFC/L) ;
- quelque soit le type d'échantillon analysé, un résultat non-quantifiable par la méthode q-PCR est très souvent associé à une concentration en *Legionella* inférieure à 250 UFC/L ;
- dans le cas des eaux de tours aéroréfrigérantes, il n'apparaît pas ou peu de corrélations entre les résultats obtenus des deux méthodes ;
- en revanche, dans le cas des eaux chaudes sanitaires, des corrélations sont observées entre les résultats des deux méthodes ;
- les corrélations observées sont meilleures dans le cas de dénombrement de *L. pneumophila* comparé à celui de *L. spp.*

Concernant la comparaison des méthodes par culture et par v-PCR :

- le signal émis par la v-PCR (exprimé en UG/L) est le plus souvent compris entre les signaux émis par culture (exprimé en UFC/L) et par q-PCR ;

⁴⁵ Norme ISO 11731 modifiée : 200 µL d'échantillon ensemencé en direct sur milieu GVPC ; 1 litre filtré à 0,2 µm, remis en suspension dans 5 mL et traité par sonication (35 kHz), 100 µL ensemencé sur milieu GVPC ; traitement thermique ou acide appliqué sur un bruit de fond est observé.

Anses

- des corrélations sont observées entre les résultats obtenus avec les deux méthodes utilisées sur des eaux chaudes sanitaires ;
- D'après les éléments du paragraphe "5.2.2.5.1.", il apparaît important de vérifier si les résultats préliminaires obtenus par v-PCR sont confirmés en conditions réelles, en particulier lorsque le circuit a été purgé et que la norme NF T90-471 est utilisée sans aucune modification après l'étape de concentration.

Concernant la comparaison des méthodes par culture et par la méthode FISH, une corrélation est observée entre les résultats des deux méthodes : 82 % (double positifs ou double négatifs).

Concernant la comparaison des méthodes par culture et par la méthode IDS :

- le signal émis par l'IDS est systématiquement plus fort que celui émis par la culture ;
- la plupart des eaux dont la température est supérieure à 45°C génèrent un signal avec la méthode IDS et une absence de signal par culture. L'inverse n'est jamais observé ;
- une corrélation entre les deux méthodes est observée pour les eaux fortement chargées en *Legionella*, alors qu'elle n'est pas observée pour les concentrations faibles ;
- la valeur prédictive négative de l'IDS par rapport à la culture est faible.

Concernant la comparaison des méthodes par immuno-détection et par culture :

- le signal émis par immunofluorescence (exprimé en cellules/L) est systématiquement plus fort que celui émis par culture (en UFC/L) ;
- certains échantillons d'eau prélevés à une température supérieure à 55°C génèrent un signal par immunofluorescence et une absence de signal par culture. L'inverse n'est jamais observé ;
- une faible corrélation est observée entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

Concernant la comparaison des méthodes par culture et par culture-FISH :

- des corrélations peuvent être observées entre les résultats obtenus sur des eaux chaudes sanitaires. Les données disponibles ne concernent pas les eaux de tours aéroréfrigérantes.

9 Réflexion sur la signification des résultats et des valeurs cibles

9.1 Éléments à prendre en compte dans l'interprétation des résultats des méthodes de dénombrement de *Legionella*

9.1.1 Conséquence de l'existence de *Legionella* viables non cultivables et non viables vis-à-vis des méthodes de dénombrement

Comme indiqué précédemment, le groupe de travail ne peut écarter le risque associé à la présence de VBNC dans un échantillon d'eau. Ainsi, l'interprétation des résultats des méthodes de dénombrement de *Legionella* qui ne prennent pas en compte les *Legionella* VBNC est délicate, particulièrement quand les résultats de telles méthodes ne mettent pas en évidence la présence de bactéries cultivables.

Par conséquent, pour être en mesure d'apporter une information complète d'un point de vue sanitaire, le groupe de travail estime important qu'une méthode de dénombrement de *Legionella* comptabilise aussi bien les *Legionella* viables cultivable que VBNC.

Par ailleurs, pour vérifier l'efficacité d'une désinfection, l'information intéressante est la quantité de *Legionella* restant vivantes.

Ainsi, pour vérifier l'efficacité d'une désinfection, il peut être intéressant de disposer d'une méthode de dénombrement de *Legionella* prenant en compte les seules *Legionella* viables, qu'elles soient cultivables ou non.

Il peut être nécessaire de vérifier dans quelle mesure le renouvellement de l'eau, affecte le taux des bactéries viables par rapport aux non viables.

Or actuellement, aucune des méthodes utilisées sur le plan réglementaire ou pour le suivi d'installation ne permet de dénombrer uniquement les *Legionella* viables. Il existe des méthodes expérimentales susceptibles de présenter cette caractéristique. Cependant elles n'ont pas encore été testées dans les conditions réelles, et leur utilité, comme leur applicabilité en analyse n'ont pas encore été démontrées.

Il faut noter qu'il peut être envisagé d'utiliser des méthodes de dénombrement de *Legionella* différentes en fonction de l'objectif de leur mise en œuvre et du contexte de leur utilisation.

9.1.2 Conséquence de l'association de *Legionella* avec les amibes

Comme évoqué précédemment, la corrélation entre les résultats obtenus par q-PCR et par culture est souvent faible. L'analyse de certains échantillons produit des signaux de q-PCR relativement importants alors que les signaux obtenus par culture à partir du même échantillon sont relativement faibles (inférieur à 1000 UFC/L). Les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si ces échantillons sont plus infectieux que ceux présentant des signaux faibles avec les deux méthodes. Une incertitude persiste quant à la signification sanitaire de tels résultats. L'une des hypothèses avancées pour les expliquer est la présence dans l'eau d'amibes contenant de grandes quantités de *Legionella* (qui seraient détectables par q-PCR mais pas par culture) et de faibles quantités de *Legionella* sous formes libres dans l'eau (qui seraient détectables aussi bien par q-PCR que par culture). Dans cette hypothèse, ces résultats pourraient révéler un plus grand risque sanitaire qu'en cas de signaux similaires obtenus par q-PCR et par culture (Joly *et al.* 2006). A noter cependant que les recherches bibliographiques menées par le groupe de travail n'ont pas permis de mettre en évidence de référence qui confirme ou infirme la capacité des différentes méthodes existantes à dénombrer les *Legionella* contenues dans des amibes.

Certaines études remettent en question l'importance que la virulence intrinsèque de *Legionella* joue dans les processus d'infection chez les protozoaires et les humains. Ces études évoquent par ailleurs l'hypothèse d'une relation préalable nécessaire entre un protozoaire et une *Legionella* pour le développement d'une infection chez l'homme (Berk *et al.* 1998; Fields *et al.* 2002; Philippe *et al.*

Anses

2006). Certains pathogènes intracellulaires des vertébrés, seraient susceptibles d'acquérir leur virulence en réponse à une prédation par des protozoaires, pour faciliter leur survie intracellulaire et l'infection de l'hôte (Abu Kwaik *et al.* 1998; Fields 1996; Fields *et al.* 2002).

L'association de *L. pneumophila* et d'*Acanthamoeba polyphaga* semble par ailleurs leur procurer à toutes deux un avantage en termes de résistance aux traitements de désinfection au chlore (Kilvington and Price 1990). En effet, la concentration en chlore nécessaire pour rendre *L. pneumophila* non cultivable est moins importante pour les bactéries présentes dans la phase planctonique que pour celle en endosymbiose avec *A. polyphaga*. De la même manière *A. polyphaga* résiste mieux au chlore en présence de *L. pneumophila* (Garcia *et al.* 2007). *L. pneumophila* semble également plus résistante à des traitements de désinfection au cuivre ou à l'argent quant la bactérie est en endosymbiose avec *A. polyphaga* (Hwang *et al.* 2006).

Garcia *et al.* suggèrent, pour disposer de résultats plus facilement interprétables d'un point de vue sanitaire, de rechercher les protozoaires dans les eaux à risque en parallèle de *L. pneumophila*. Ils estiment que pour être considéré efficace pour la lutte contre les *Legionella*, un traitement doit également permettre l'élimination des protozoaires. Ils suggèrent donc de mener cette double recherche pour vérifier l'efficacité des traitements mis en œuvre en cas de contamination d'eau avérée par *L. pneumophila* (Garcia *et al.* 2007).

Les différentes études citées ici mettent en évidence l'importance des interactions entre amibes et *Legionella*, dans l'écologie microbienne de ces dernières. Les amibes sont des réservoirs avérés de *Legionella* et les protégeraient des facteurs environnementaux, notamment vis-à-vis des traitements de désinfection. Le groupe de travail souligne donc l'intérêt de recherches d'amibes en complément des dénombrements de *Legionella* dans l'eau, particulièrement dans certains contextes, comme le suivi de l'efficacité de traitement. Il est cependant important de noter ici la relative complexité de la mise en œuvre, en routine, de méthodes de recherche d'amibes dans l'eau et les développements encore nécessaires pour en améliorer et homogénéiser les performances.

9.1.3 Conséquence de l'association de *Legionella* avec le biofilm

Actuellement, dans le cadre du contrôle sanitaire, les *Legionella* sont recherchées dans des prélèvements d'eau planctonique, que ce soit dans les réseaux d'eau chaude sanitaire ou dans les tours aérorefrigérantes.

Comme précédemment indiqué *L. pneumophila* est capable de survivre dans le biofilm des canalisations (Fields *et al.* 2002; Frère 2009; Kuiper *et al.* 2004), de s'y multiplier en présence d'amibes comme *Hartmannella vermiformis* (Abu Kwaik *et al.* 1998; Kuiper *et al.* 2004; Murga *et al.* 2001), voire peut-être de s'y multiplier en dehors de cellules de protozoaires hôtes (Fields *et al.* 2002; Rogers and Keevil 1992).

Ainsi *L. pneumophila* peut avoir été éliminée de l'eau libre et persister dans les biofilms à la surface des canalisations. L'absence de *L. pneumophila* dans un prélèvement d'eau ne signifierait donc pas nécessairement que *L. pneumophila* est totalement absente du réseau dans lequel le prélèvement a été effectué.

Fields *et al.* suggèrent de rechercher les *Legionella* dans les biofilms des réseaux d'eaux chaudes, pour une meilleure efficacité des contrôles sanitaires et pour faciliter l'interprétation de leurs résultats (Fields *et al.* 2002).

Bien qu'étant à la marge du champ de la présente saisine, la recherche de *Legionella* dans le biofilm apporterait probablement une information intéressante aussi bien d'un point de vue sanitaire que pour la gestion des installations. Toutefois, la complexité d'un tel dénombrement, particulièrement en ce qui concerne le prélèvement, est soulignée à cause du caractère expérimental des méthodes proposées jusqu'ici et de la nécessité de mener un important travail de développement de ces méthodes dans l'hypothèse où leur mise en œuvre à grande échelle serait envisagée. En l'état actuel des connaissances, il n'est envisageable de les utiliser que dans le cadre de recherches ou d'études spécifiques.

9.2 Seuils de gestion et mesures préconisées par la réglementation en vigueur

Les éléments rassemblés dans ce chapitre ne concernent que la surveillance de routine des installations à risque, hors cas de légionellose déclaré. Les investigations environnementales menées pour tenter d'identifier l'origine des cas de légionellose déclarés sont réalisées au cas par cas.

Certains auteurs (Lee and Joseph 2002) ou groupes d'experts (CSHPF 2005) proposent, des guides pour mener ces investigations, mais ces derniers ne sont pas décrits ici.

9.2.1 Cas général des eaux chaudes sanitaires

La Direction générale de la santé a fixé des *"prescriptions techniques applicables aux installations collectives de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire qui alimentent les établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux, les établissements pénitentiaires, les hôtels et résidences de tourisme, les campings et les autres établissements recevant du public qui possèdent des points d'usage à risque"*⁴⁶ (Arrêté du 1er février 2010) :

- *"Les dénombrements en Legionella pneumophila doivent être inférieurs à 1 000 unités formant colonie par litre (UFC/L) au niveau de tous les points d'usage à risque.*
- *Dans les établissements de santé, les dénombrements en Legionella pneumophila doivent être inférieurs au seuil de détection au niveau de tous les points d'usage à risque accessibles à des patients identifiés par le comité de lutte contre les infections nosocomiales ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose.*
- *Lorsque ces seuils ne sont pas respectés, le responsable des installations prend sans délai les mesures correctives nécessaires au rétablissement de la qualité de l'eau et à la protection des usagers."*

9.2.2 Cas des eaux chaudes sanitaires dans les établissements de santé

La Direction générale de la santé, préconise différents types d'actions en fonction des concentrations en *Legionella* mesurées aux points d'usages des installations d'eau chaude des établissements de santé (Circulaire DGS 2002/243). Ces préconisations sont adaptées à la majeure partie de la population hospitalière. Pour les patients dits "à haut risque"⁴⁷, les mesures de prévention particulières nécessaires sont précisées à la fin de ce chapitre.

L'objectif cible est de maintenir la concentration en *Legionella pneumophila* à un niveau inférieur à 10³ UFC/L d'eau. Cela suppose un *"entretien régulier des réseaux et des équipements"*, et une *"surveillance régulière des paramètres physiques (température) et microbiologiques de l'eau"*. Des actions sont préconisées dès que la concentration en *L. pneumophila* atteint 10³ UFC/L d'eau, en commençant par une alerte des autorités et la mise en place de mesures pouvant aller jusqu'à des restrictions d'usages et des actions curatives :

"Mesures de base :

- *s'assurer que l'information est adressée sans délai à l'ensemble des personnels en charge de la gestion de l'eau, du Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales (CCLIN), de l'équipe opérationnelle d'hygiène et des services concernés ;*
- *comprendre l'origine des écarts avec les résultats des analyses antérieures et rechercher les causes de la prolifération ;*
- *évaluer l'étendue de la contamination du réseau ;*
- *mettre en œuvre les mesures nécessaires à la maîtrise de la concentration en Legionella (détartrage, purge, réglage de la température, travaux) ;*
- *renforcer la surveillance des paramètres physiques et microbiologiques.*

Selon l'importance de la prolifération :

⁴⁶ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

⁴⁷ La Circulaire DGS 2002/243 définit les patients dits "**patients à haut risque**" sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours).

Anses

- *mettre en œuvre les actions curatives nécessaires (nettoyage et désinfection, purge, montée en température) ;*
- *assurer une information adaptée des malades accompagnée de conseils ;*
- *en fonction de l'analyse bénéfique/risque faite au cas par cas, supprimer les usages à risque (bains bouillonnants, douches) et mettre en œuvre des moyens permettant de limiter l'exposition aux aérosols (lavage au gant, bain) ;*
- *suivre l'efficacité des mesures mises en œuvre."*

Les actions doivent être appliquées jusqu'à un retour à des niveaux de contamination inférieurs à cette valeur (Circulaire DGS 2002/243). La Circulaire DGS 2005/315 précise que :

- *"si le bulletin d'analyse porte un résultat chiffré inférieur ou égal à 10^3 UFC/L de *L. pneumophila* ou indique le résultat "< 250 UFC/L", quelle que soit la mention complémentaire apportée, le prélèvement respecte l'objectif cible de qualité ;*
- *si le bulletin d'analyse porte la mention "ininterprétable" ou "présence d'une flore interférente empêchant la détection des *L. pneumophila*" ou "présence de *L. pneumophila* non quantifiables en raison de la présence d'une flore interférente", la conformité du résultat d'analyse par rapport à l'objectif cible ne peut être estimée et un prélèvement de contrôle doit être reprogrammé."*

Pour les patients "à haut risque", la Circulaire DGS 2002/243 indique que "des mesures de prévention particulières sont précisées. L'eau soutirée au niveau des points d'usage à risque doit respecter en permanence une concentration en *Legionella pneumophila* inférieure au seuil de détection (50 UFC/L mesurés par culture). Les points d'usage à risque pour les patients à haut risque correspondent aux points d'usage susceptibles d'exposer ces patients à un aérosol ; il s'agit en particulier des douches. Chaque établissement devra définir, en liaison avec le CCLIN, des mesures spécifiques pour les patients à haut risque lorsqu'il n'est pas possible d'assurer en permanence une concentration en *Legionella pneumophila* inférieure au seuil de détection dans l'eau du réseau alimentant les points d'usage à risque". La Circulaire DGS 2005/315 précise que :

- *"si le bulletin d'analyse mentionne un résultat chiffré ou porte la mention "présence de *L. pneumophila* non quantifiables" ou la mention "présence de *L. pneumophila* non quantifiables en raison de la présence d'une flore interférente", des restrictions d'usage et des actions curatives doivent être mises en œuvre par l'établissement de santé.*
- *si le bulletin d'analyse porte la mention "ininterprétable" ou "présence d'une flore interférente empêchant la détection des *L. pneumophila*" (quel que soit le résultat exprimé < 25 000 UFC/L ou < 2 500 UFC/L, etc.), la conformité du résultat d'analyse ne peut être estimée et un prélèvement de contrôle doit être reprogrammé. Les modalités de gestion du risque devront être appréciées au cas par cas en fonction des éléments de contexte."*

9.2.3 Cas des tours aéroréfrigérantes et autres installations à risque

Actuellement, des règles édictées par les ministères en charge de l'environnement et de la santé existent pour la surveillance et les niveaux d'intervention en fonction des concentrations en *Legionella* dans les installations à risque.

L'arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique (numéro 2921) précise :

- article 8 (Arrêté du 13 décembre 2004) :

*"La fréquence des prélèvements et analyses de *Legionella spp* selon la norme NF T90-431 est au minimum mensuelle pendant la période de fonctionnement de l'installation.*

*Si, pendant une période d'au moins 12 mois continus, les résultats des analyses mensuelles sont inférieurs à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau, la fréquence des prélèvements et analyses des *Legionella spp* selon la norme NF T90-431 pourra être au minimum trimestrielle.*

*Si un résultat d'une analyse en légionelles est supérieur ou égal à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau, ou si la présence de flore interférente rend impossible la quantification de *Legionella spp*, la fréquence des prélèvements et analyses des *Legionella spp* selon la norme NF T90-431 devra être de nouveau au minimum mensuelle"*

- article 9 (Arrêté du 13 décembre 2004) :

"1. Les actions à mener si la concentration mesurée en *Legionella spp* est supérieure ou égale à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau selon la norme NF T90-431 :

a) *l'exploitant arrête, dans les meilleurs délais, l'installation de refroidissement, (...), et réalise la vidange, le nettoyage et la désinfection de l'installation de refroidissement. (...)*

Dès réception des résultats selon la norme NF T90-431, l'exploitant en informe immédiatement l'inspection des installations classées (...)

b) Avant la remise en service de l'installation, il procède à une analyse méthodique des risques de développement des légionelles dans l'installation, telle que prévue à l'article 6.1, ou à l'actualisation de l'analyse existante, en prenant notamment en compte la conception de l'installation, sa conduite, son entretien et son suivi. (...)

L'exploitant met en place les mesures d'amélioration prévues et définit les moyens susceptibles de réduire le risque. Les modalités de vérification de l'efficacité de ces actions avant et après remise en service de l'installation sont définies par des indicateurs tels que des mesures physico-chimiques ou des analyses microbiologiques.

c) Après remise en service de l'installation, l'exploitant vérifie immédiatement l'efficacité du nettoyage et des autres mesures prises selon les modalités définies précédemment. **Quarante-huit heures après cette remise en service, l'exploitant réalise un prélèvement, pour analyse des légionelles selon la norme NF T90-431.** (...)

d) **Les prélèvements et les analyses en Legionella spp selon la norme NF T90-431 sont ensuite effectués tous les quinze jours pendant trois mois.** En cas de dépassement de la concentration de 10 000 unités formant colonies par litre d'eau sur un des prélèvements prescrits ci-dessus, l'installation est à nouveau arrêtée dans les meilleurs délais et l'ensemble des actions prescrites ci-dessus sont renouvelées.

e) Dans le cas des installations dont l'arrêt immédiat présenterait des risques importants pour le maintien de l'outil ou la sécurité de l'installation et des installations associées, la mise en œuvre de la procédure d'arrêt sur plusieurs jours pourra être stoppée, sous réserve qu'il n'y ait pas d'opposition du préfet à la poursuite du fonctionnement de l'installation de refroidissement, si le résultat selon la norme NF T90-431 d'un prélèvement effectué pendant la mise en œuvre de la procédure d'arrêt est inférieur à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau. La remise en fonctionnement de l'installation de refroidissement ne dispense pas l'exploitant de la réalisation de l'analyse de risques, de la mise en œuvre d'une procédure de nettoyage et désinfection, et du suivi de son efficacité. **Les prélèvements et les analyses en Legionella spp selon la norme NF T90-431 sont ensuite effectués tous les huit jours pendant trois mois.**

En fonction des résultats de ces analyses, l'exploitant met en œuvre les dispositions suivantes :

- en cas de dépassement de la concentration de 10 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant réalise ou renouvelle les actions prévues au point 1.b (...);

- en cas de dépassement de la concentration de 100 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'installation est arrêtée dans les meilleurs délais et l'exploitant réalise l'ensemble des actions prescrites aux points 1 a à 1 c du présent article.

Le préfet pourra autoriser la poursuite du fonctionnement de l'installation, (...)

2. Actions à mener si la concentration mesurée en Legionella spp est supérieure ou égale à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau et inférieure à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau.

(...) l'exploitant prend des dispositions pour nettoyer et désinfecter l'installation de façon à s'assurer d'une concentration en Legionella spp inférieure à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau. **La vérification de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection est réalisée par un prélèvement selon la norme NF T90-431 dans les deux semaines consécutives à l'action corrective. Le traitement et la vérification de l'efficacité du traitement sont renouvelés tant que la concentration mesurée en Legionella spp est supérieure ou égale à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau et inférieure à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau.**

A partir de trois mesures consécutives indiquant des concentrations supérieures à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant devra procéder à l'actualisation de l'analyse méthodique des risques de développement des légionelles dans l'installation, prévue à l'article 6, en prenant notamment en compte la conception de l'installation, sa conduite, son entretien, son suivi. (...)

3. Actions à mener si le résultat de l'analyse selon la norme NF T90-431 rend impossible la quantification de Legionella spp en raison de la présence d'une flore interférente.

(...) l'exploitant prend des dispositions pour nettoyer et désinfecter l'installation de façon à s'assurer d'une concentration en Legionella spp inférieure à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau."

- dans son article 9 (Arrêté du 13 décembre 2004) :

"L'eau d'appoint respecte au niveau du piquage les critères microbiologiques et de matières en suspension suivants

Legionella spp < seuil de quantification de la technique normalisée utilisée.

Numération de germes aérobies revivifiables à 37° C < 1 000 germes/mL.

Matières en suspension : < 10 mg/L.

Lorsque ces qualités ne sont pas respectées, l'eau d'appoint fera l'objet d'un traitement permettant l'atteinte des objectifs de qualité ci-dessus. Dans ce cas, le suivi de ces paramètres sera réalisé au moins deux fois par an dont une pendant la période estivale."

L'arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement **soumises à déclaration** sous la rubrique n° 2921, précise dans son annexe I, Titre II, 7. "Actions à mener en cas de prolifération de légionelles" :

"7.1. Actions à mener si la concentration mesurée en Legionella specie est supérieure ou égale à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau selon la norme NF T90-431

a. Si les résultats des analyses en légionelles selon la norme NF T90-431, réalisées en application de l'ensemble des dispositions qui précèdent, mettent en évidence une concentration en Legionella specie supérieure ou égale à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant arrête dans les meilleurs délais l'installation de refroidissement, (...) et réalise la vidange, le nettoyage et la désinfection de l'installation de refroidissement. (...)

Dès réception des résultats selon la norme NF T90-431, l'exploitant en informe immédiatement l'inspection des installations classées par télécopie avec la mention « urgent & important – tour aéroréfrigérante - dépassement du seuil de 100 000 unités formant colonies par litre d'eau ». (...)

b. Avant la remise en service de l'installation, il procède à une analyse méthodique des risques de développement des légionelles dans l'installation, (...) ou à l'actualisation de l'analyse existante, en prenant notamment en compte la conception de l'installation, sa conduite, son entretien, son suivi. Cette analyse des risques doit permettre de définir les actions correctives visant à réduire les risques de développement des légionelles et de planifier la mise en œuvre des moyens susceptibles de réduire ces risques. (...) L'exploitant met en place les mesures d'amélioration prévues et définit les moyens susceptibles de réduire le risque. Les modalités de vérification de l'efficacité de ces actions avant et après remise en service de l'installation sont définies par des indicateurs tels que des mesures physico-chimiques ou des analyses microbiologiques.

c. Après remise en service de l'installation, l'exploitant vérifie immédiatement l'efficacité du nettoyage et des autres mesures prises selon les modalités définies précédemment. Quarante huit heures après cette remise en service, l'exploitant réalise un prélèvement, pour analyse des légionelles selon la norme NF T90-431. Dès réception des résultats de ce prélèvement, un rapport global sur l'incident est transmis à l'inspection des installations classées. (...)

d. Les prélèvements et les analyses en Legionella specie selon la norme NF T90-431 sont ensuite effectués tous les 15 jours pendant trois mois. En cas de dépassement de la concentration de 10 000 unités formant colonies par litre d'eau sur un des prélèvements prescrits ci-dessus, l'installation est à nouveau arrêtée dans les meilleurs délais et l'ensemble des actions prescrites ci-dessus sont renouvelées.

e. Dans le cas des installations dont l'arrêt immédiat présenterait des risques importants pour le maintien de l'outil ou la sécurité de l'installation et des installations associées, la mise en œuvre de la procédure d'arrêt sur plusieurs jours pourra être stoppée, sous réserve qu'il n'y ait pas d'opposition du préfet à la poursuite du fonctionnement de l'installation de refroidissement, si le résultat selon la norme NF T90-431 d'un prélèvement effectué pendant la mise en œuvre de la procédure d'arrêt est inférieur à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau. La remise en fonctionnement de l'installation de refroidissement ne dispense pas l'exploitant de la réalisation de l'analyse de risques, de la mise en œuvre d'une procédure de nettoyage et désinfection, et du suivi de son efficacité. Les prélèvements et les analyses en Legionella specie selon la norme NF T90-431 sont ensuite effectués tous les 8 jours pendant trois mois. En fonction des résultats de ces analyses, l'exploitant met en œuvre les dispositions suivantes :

- En cas de dépassement de la concentration de 10 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant réalise ou renouvelle les actions prévues au point 7.1.b du présent titre (...);

- En cas de dépassement de la concentration de 100 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'installation est arrêtée dans les meilleurs délais et l'exploitant réalise l'ensemble des actions prescrites aux points 7.1.a à 7.1.c du présent titre. Le préfet pourra autoriser la poursuite du fonctionnement de l'installation, sous réserve que l'exploitant mette immédiatement en œuvre des mesures compensatoires (...).

7.2. Actions à mener si la concentration mesurée en *Legionella* specie est supérieure ou égale à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau et inférieure à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau selon la norme NF T90-431

*Si les résultats d'analyses réalisées en application de l'ensemble des dispositions qui précèdent mettent en évidence une concentration en *Legionella* specie selon la norme NF T90-431 supérieure ou égale à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau et inférieure à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant prend des dispositions pour nettoyer et désinfecter l'installation de façon à s'assurer d'une concentration en *Legionella* specie inférieure à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau. La vérification de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection est réalisée par un prélèvement (...) dans les deux semaines consécutives à l'action corrective. Le traitement et la vérification de l'efficacité du traitement sont renouvelés tant que la concentration mesurée en *Legionella* specie est supérieure ou égale à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau et inférieure à 100 000 unités formant colonies par litre d'eau*

A partir de trois mesures consécutives indiquant des concentrations supérieures à 1 000 unités formant colonies par litre d'eau, l'exploitant devra procéder à l'actualisation de l'analyse méthodique des risques de développement des légionelles dans l'installation, (...). L'exploitant tient les résultats des mesures et des analyses de risques effectuées à la disposition de l'inspection des installations classées.

7.3. Actions à mener si le résultat définitif de l'analyse rend impossible la quantification de *Legionella* specie en raison de la présence d'une flore interférente

*Sans préjudice des dispositions prévues aux points 7.1 et 7.2, si le résultat définitif de l'analyse rend impossible la quantification de *Legionella* specie en raison de la présence d'une flore interférente, l'exploitant prend des dispositions pour nettoyer et désinfecter l'installation de façon à s'assurer d'une concentration en *Legionella* specie inférieure à 1000 unités formant colonies par litre d'eau."*

9.3 Signification sanitaire des valeurs cibles actuelles

9.3.1 Cas général

La plupart des méthodes de dénombrement de *Legionella* donnent peu d'information sur le niveau d'infectiosité des bactéries dénombrées. Par ailleurs, actuellement les informations sur la dose infectante et la relation concentration dans l'eau/concentration dans les aérosols restent parcellaires. Cela rend les résultats de dénombrement de *Legionella* difficiles à interpréter d'un point de vue sanitaire (Yaradou *et al.* 2007).

Cependant, des *Legionella* infectieuses présentes dans un environnement ont une probabilité d'autant plus grande de provoquer une infection, qu'elles sont présentes en grand nombre. En effet, plus elles sont nombreuses, plus leurs chances de résister aux conditions environnementales sont élevées (Delgado-Viscogliosi *et al.* 2005).

9.3.2 Cas des eaux chaudes sanitaires

Pour la population générale, les auteurs admettent que *Legionella pneumophila* présente un risque pour la santé humaine, quand la densité de cellules est supérieure à 10^4 ou 10^5 UFC par litre (mesurée par culture) d'eau chaude sanitaire, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme. Les données épidémiologiques montrent que le risque de survenue de légionellose est accru à partir de ces concentrations (Bauer *et al.* 2008; Delgado-Viscogliosi *et al.* 2009; Meenhorst *et al.* 1985; Patterson *et al.* 1994). Ceci n'est pas valable pour les patients dits à "haut risque", lesquels sont plus sensibles aux infections et susceptibles de contracter une légionellose avec des densités en *Legionella* bien inférieures.

Selon les données de la littérature, la valeur sanitaire en dessous de laquelle le risque de légionellose est négligeable ou acceptable pour la population générale est comprise entre 10^4 ou 10^5 UFC/L en *L. pneumophila*, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme.

Pour la population générale, la réglementation française actuelle relative aux eaux chaudes sanitaires, est plus exigeante d'un facteur 10 et fixe la concentration à ne pas dépasser à 10^3 UFC/L *L. pneumophila*. Cela permet de conserver une marge de sécurité par rapport au risque estimé. Compte tenu des connaissances actuelles, le groupe de travail estime qu'il n'est pas justifié de proposer une modification des seuils réglementaires actuellement utilisés pour exploiter les résultats de dénombrement obtenus par culture (selon la norme NF T90-431).

En revanche, pour les patients à "haut risque" (immunodéprimés), l'examen de la littérature, n'a pas permis de mettre en évidence une concentration en *Legionella* dans une eau chaude sanitaire en dessous duquel il ne serait plus observé de cas de légionelloses. De surcroît, contrairement à la population générale, les patients à "haut risque" sont susceptibles d'être infectés par d'autres espèces de *Legionella* que *L. pneumophila*. Pour ces patients, il est préférable de conserver une valeur cible inférieure au seuil de quantification en *L. pneumophila* (selon la norme NF T90-431) et d'analyser le risque vis-à-vis de *Legionella* élargie à toute espèce (*Legionella* spp.).

9.3.3 Cas des tours aéroréfrigérantes

La concentration en *Legionella* (incluant *L. pneumophila*) dans les tours aéroréfrigérantes peut varier considérablement en très peu de temps. Ces oscillations reflètent le caractère dynamique de ces écosystèmes dans lesquels de nombreuses espèces de bactéries ou de protozoaires adhèrent entre eux pour former des biofilms dans les installations. Comme indiqué précédemment, cette association peut contribuer à la moindre sensibilité aux biocides utilisés pour le nettoyage et la désinfection des installations ou à la modification de certaines caractéristiques de *Legionella*, comme leur virulence. Les fluctuations de densité en *Legionella* observées peuvent compliquer l'établissement de valeurs cibles réglementaires et de règles spécifiant la fréquence minimum des mesures nécessaires pour maintenir les tours aéroréfrigérantes sous contrôle et éviter des dispersions importantes de *Legionella* dans leur voisinage (Ragull *et al.* 2007).

A ce jour, aucune épidémie liée à une tour aéroréfrigérante n'a été attribuée à une autre espèce de *Legionella* que *L. pneumophila*. Pour la population générale, le risque étant lié à *L. pneumophila* et non *Legionella* spp, il semble plus opportun de dénombrer *L. pneumophila* plutôt que *L. species*, tout en conservant les mêmes valeurs de seuils d'action et d'arrêt (respectivement 10^3 et 10^5 UFC/L).

Toutefois, dans le cadre de la gestion des installations, la recherche de *L. spp* reste un indicateur pertinent de dysfonctionnement.

9.4 Détermination de valeurs cibles pour les méthodes alternatives à la culture.

Un examen de la littérature a permis de mettre en évidence quelques tentatives destinées à proposer des valeurs cibles, pour des méthodes alternatives, qui correspondent aux valeurs cibles utilisés pour l'interprétation des résultats obtenus par culture (selon la norme Afnor NF T90-431). L'essentiel de ces tentatives portent sur la q-PCR. Le présent chapitre a pour but d'en faire un bilan.

9.4.1 Cas des eaux chaudes sanitaires

Dans leur étude portant sur 223 échantillons d'eaux chaudes sanitaires, déjà évoquée dans le chapitre relatif à la comparaison des méthodes de ce rapport, Joly et *al.*, ont mis en évidence des valeurs de corrélations entre les résultats de culture et ceux de q-PCR ($r^2 = 0,1267$ et $0,2369$ respectivement de pour *L. spp* et *L. pneumophila* dans le laboratoire 1 de l'étude ; $r^2 = 0,5259$ et $0,7295$ respectivement pour *L. spp* et *L. pneumophila* dans le laboratoire 2 de l'étude). Sur la base de cette observation, Joly et *al.*, ont tenté de déterminer une valeur seuil en q-PCR correspondant à des eaux contenant plus de 10^3 UFC/L *Legionella* mesurées par culture (seuil utilisé pour l'interprétation des résultats en culture), à l'aide d'une courbe de ROC⁴⁸ pour obtenir un maximum de sensibilité et de spécificité. Il en ressort que (Joly et *al.* 2006) :

- pour le dénombrement de *L. spp* :
 - o une valeur cible en q-PCR de $2,9 \cdot 10^4$ UG/L permettrait d'obtenir 78,9% de correspondance entre les actions déclenchées par q-PCR et par culture (101 échantillons sur 128), dans le laboratoire 1 ;
 - o une valeur cible en q-PCR de $2,5 \cdot 10^3$ UG/L permettrait d'obtenir 87% de correspondance entre les actions déclenchées par PCR et par culture (80 échantillons sur 91), dans le laboratoire 2 ;
- pour le dénombrement de *L. pneumophila* :
 - o une valeur cible en q-PCR de $2,6 \cdot 10^4$ UG/L permettrait d'obtenir 86,9% de correspondance entre les actions déclenchées par PCR et par culture (106 échantillons sur 122), dans le laboratoire 1 ;
 - o une valeur cible en q-PCR de $5,6 \cdot 10^3$ UG/L permettrait d'obtenir 94,5% de correspondance entre les actions déclenchées par q-PCR et par culture (86 échantillons sur 91), dans le laboratoire 2.

Les valeurs du signal q-PCR sont significativement différentes (de l'ordre de 1 log) d'un laboratoire à l'autre, malgré l'utilisation d'une même méthode d'extraction et du même protocole de q-PCR. Les auteurs de l'étude en concluent à une nécessité, pour chaque laboratoire, de déterminer sa propre valeur cible de signal q-PCR permettant de correspondre à 1000 UFC/L (Joly et *al.* 2006). Toutefois, les eaux chaudes sanitaires analysées par le laboratoire 1 proviennent de multiples origines, alors que celles analysées dans le laboratoire 2 proviennent d'un même hôpital. Par ailleurs, les laboratoires ne disposaient pas d'un étalon commun.

Concernant la détermination de valeurs cibles pour les méthodes d'analyse des eaux chaudes sanitaires alternatives à la culture, une seule étude publiée a été répertoriée. Cette étude fait état de correspondances non homogènes entre les seuils de déclenchement d'actions spécifiques de la culture et ceux de la q-PCR. Ces correspondances apparaissent meilleures pour la cible *L. pneumophila* que pour *L. spp*.

Aucune étude portant sur la détermination de valeurs cibles n'a été répertoriée pour les autres méthodes alternatives, hormis la q-PCR.

9.4.2 Cas des tours aéroréfrigérantes

Dans leur étude portant sur 37 échantillons d'eaux de tours aéroréfrigérantes, Joly et *al.*, n'ont pas mis en évidence de corrélations entre les résultats de culture et ceux de q-PCR. Ils n'ont donc pas pu déterminer de valeur cible en q-PCR correspondant à des eaux contenant plus de 10^3 UFC/L *Legionella* mesurées par culture, comme ce qu'ils ont tenté de faire pour les eaux chaudes sanitaires (Joly et *al.* 2006).

Compte tenu du peu de résultats publiés sur le sujet, il est difficile de conclure sur la base de la bibliographie.

⁴⁸ Courbe de ROC (Receiver Operating Characteristics) : outil graphique, destiné à tracer des valeurs de la sensibilité (Se) en fonction de 1-Sp (spécificité).

10 Synthèse des éléments recueillis

10.1 Synthèse sur la base des éléments bibliographiques

10.1.1 Éléments à prendre en compte pour choisir une méthode de dénombrement de *Legionella*

La **saisine portait sur** les méthodes de **détection** de *Legionella* dans l'eau adaptées aux contextes des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes. En préambule, il est important d'insister sur **l'importance de dénombrer les *Legionella***. L'information fournie par la simple détection paraît insuffisante dans ces contextes.

Le genre *Legionella* est composé de multiples espèces, elles-mêmes subdivisées en sérogroupes et sous-types. Il apparaît nécessaire de préciser la cible la plus pertinente des dénombrements, en fonction de l'objectif poursuivi : gestion des risques sanitaires ou gestion des installations.

Pour la population générale, compte tenu de la rareté des cas de légionellose attribués à d'autres espèces de *Legionella* que *L. pneumophila*, le dénombrement de cette espèce peut suffire à fournir l'information nécessaire à la gestion du risque sanitaire. Le dénombrement spécifique des *L. pneumophila* du séro groupe 1, principal responsable des cas de légionellose, peut apporter une information supplémentaire. Cependant, il ne peut remplacer le dénombrement des *L. pneumophila*.

Pour les individus atteints d'une immunodépression sévère, également dits "patients à haut risque"⁴⁹, qui peuvent être infectés par *L. pneumophila* comme par d'autres espèces de *Legionella*, le **dénombrement des *L. spp* apporte une information supplémentaire**, notamment lorsqu'il est associé aux mesures de suivi et de traitement de l'eau spécifiques à ce contexte, déjà envisagées dans la réglementation en vigueur⁵⁰ ;

Pour la gestion des installations d'eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, le dénombrement de *L. spp* apporte des informations relatives à l'écosystème des installations de la même importance que celles apportée par le dénombrement de *L. pneumophila*.

L'état de viabilité des *Legionella* dénombrées est une information complémentaire intéressante pour interpréter les résultats, quel que soit la cadre de leur utilisation. **Le risque associé à la présence de bactéries viables non cultivables doit notamment être pris en considération.**

Le biofilm et les protozoaires constituent un réservoir avéré de *Legionella*. Ils contribuent à leur protection contre les stress environnementaux (traitement de désinfection), favorisent leur multiplication. Par ailleurs, les protozoaires semblent contribuer à la revivification des *Legionella* et accroître leur pathogénicité pour l'homme. Compte tenu de ces éléments, la **présence de biofilm et de protozoaires sont des facteurs à prendre en considération** lors du suivi des installations et pourraient également contribuer à la recontamination plus rapide de l'installation, après un traitement de désinfection.

10.1.2 Attentes relatives à une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau

Il apparaît important qu'une méthode analytique destinée au dénombrement de *Legionella* dans l'eau soit spécifique et sélective de la cible choisie, qu'elle ait été évaluée sur le plan du rendement⁵¹, qu'elle possède une limite de quantification basse et le cas échéant inférieure aux seuils réglementaires.

Par ailleurs, **le groupe de travail a identifié des critères spécifiques à l'évaluation d'une méthode de dénombrement de *Legionella***, en routine, dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes.

⁴⁹ Les patients dits « patients à haut risque » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisone pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours)

⁵⁰ Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire et Circulaire DGS/SD7A/SD5C/DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

⁵¹ Fraction de la cible détectée par rapport à la cible présente dans l'échantillon.

Anses

Des critères identifiés comme de priorité élevée :

- Quantification de *Legionella pneumophila* ;
- Quantification de *Legionella pneumophila* avec distinction du sérotype 1 ;
- Prise en compte des *Legionella* intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification ;
- Non détection des *Legionella* mortes ;
- Détection de l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes ;
- Rapidité des résultats ;
- Applicable sur des échantillons d'eau traitée ;
- Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles.

Des critères identifiés comme de priorité modérée :

- Distinction et de quantification des sérotypes Lp autre que sg1 ;
- Quantification de l'ensemble des *Legionella* spp ;
- Applicable sur des échantillons d'eau chargée (biologiquement, chimiquement ou physiquement) ;
- Faisabilité, simplicité ;
- Equipements nécessaires faibles ;
- Temps technicien faible ;
- Interprétation technique simple des résultats bruts ;
- Permet de disposer de souches pour des études complémentaires.

Chaque méthode décrite dans ce rapport a été examinée au regard de ces critères. Le résultat de cet exercice est présenté dans les chapitres de description des méthodes, et synthétisé dans le tableau 10.

Il est important de souligner que le choix d'une méthode de dénombrement ne peut reposer que sur ses avantages et ses inconvénients intrinsèques. En effet certains de ces éléments théoriques positifs doivent être confrontés aux réalités du terrain où ils peuvent être alors pris en défaut. **Il apparaît également essentiel, pour un tel choix, de prendre en compte les niveaux de développement des différentes méthodes :** stabilisation d'un protocole précis, validation des caractéristiques et performances par différents laboratoires et sur différents types d'échantillons environnementaux, robustesse, existence de standards et d'étalons, etc.

Tableau 10 : Critères identifiés pour le choix des méthodes de dénombrement de *Legionella*

Méthodes	Culture	DVC	q-PCR	v-PCR	Immuno-détection	FISH	IDS	Culture-FISH
Critères à priorité élevée								
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i>	+	?	+	+	+	+	+	+
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i> avec distinction du sérotype 1	+	?	+	+	+	?	+	?
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification	-	?	+	+	-	?	?	-
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+	+	-	+	-	-	?	+
Détection notamment de l'ensemble des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes	-	?	+	+	+	+	+	-
Rapidité des résultats	-	+	+	+	+	+	+	+
Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles	+	-	-	-	-	-	-	-
Applicable sur des échantillons d'eau traitée	+	?	+	+	?	?	?	+
Critères à priorité modérée								
Distinction et quantification des sérotypes Lp autre que sg1	+	?	?	?	+	-	+	+
Quantification de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp	+	?	+	+	+	+	?	+
Applicable sur des échantillons d'eau chargée	-	?	-	-	-	?	-	-
Faisabilité, simplicité	+	?	+	+	+	+	?	+
Equipements nécessaires faibles	+	?	+	+	-	+	-	+
Temps technicien faible	-	?	+	+	-	-	-	-
Interprétation technique simple des résultats bruts	+	?	+	+	+	+	+	+
Permet de disposer de souches pour des études complémentaires	+	?	-	-	?	-	?	+

(+) Avantages ; (-) inconvénients ; (?) critères non évalués

10.1.3 Tentatives de comparaison des différentes méthodes de dénombrement de *Legionella*

Certaines méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, généralement les plus utilisées, ont fait l'objet de tentatives de comparaison. Les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats des méthodes considérées ne sont souvent pas strictement comparables. Toutefois, l'existence de corrélations entre des résultats de dénombrement exprimés dans différentes unités, semble intéressante pour alimenter la réflexion relative à l'élaboration de règles d'interprétation pour les méthodes alternatives à la culture.

Pour l'analyse d'eaux préparées en laboratoire, dans des conditions idéales de croissance maîtrisées et sans stress ajouté (désinfectant, traitement thermique, etc.), certaines méthodes (culture, q-PCR, TVC, immuno-détection) produisent des résultats équivalents. Tout écart par rapport à ces conditions idéales affecte différemment les résultats de ces méthodes et perturbe leur équivalence.

Ainsi, **sur des eaux environnementales, dont la qualité et la charge en particules, composés chimiques et microorganismes sont très variables, les différentes méthodes de dénombrement de *Legionella*, apparaissent rarement équivalentes.** Néanmoins, les corrélations observées entre les résultats des méthodes comparées sont sensiblement meilleures, pour l'analyse d'eaux

Anses

relativement peu chargées, comme les eaux de réseaux domestiques, que pour l'analyse d'eaux chargées, comme les eaux de tours aérorefrigérantes.

Pour envisager la comparaison des limites de détection et de quantification relatives à différentes méthodes il est nécessaire que celles-ci soient éprouvées et stabilisées, par exemple par l'introduction d'une norme. Ce n'est pas le cas pour la majorité des méthodes alternatives répertoriées.

10.1.4 Réflexion sur la signification des résultats et des valeurs cibles

Pour être en mesure d'apporter une information complète d'un point de vue sanitaire, il semble important qu'une méthode de dénombrement de *Legionella* comptabilise aussi bien les *Legionella* viables cultivables que VBNC.

Dans le cas particulier d'un suivi de désinfection, les méthodes qui semblent être les plus adaptées sont celles qui prennent en compte les seules *Legionella* viables, qu'elles soient cultivables ou non. Dans ce contexte, il peut également être nécessaire de vérifier dans quelle mesure le renouvellement de l'eau, affecte le taux des bactéries viables par rapport au taux de bactéries non viables.

L'écologie microbienne des *Legionella* est largement influencée par leurs interactions avec les amibes et les biofilms. Ces derniers peuvent jouer un rôle de réservoirs de *Legionella* et les protégeraient des facteurs environnementaux, notamment des traitements de désinfection. Ainsi, **dans certaines situations, la recherche d'amibes ou de *Legionella* dans les biofilms, semble pouvoir apporter des informations intéressantes**, en complément du dénombrement de *Legionella* dans l'eau. **Ces recherches restent cependant encore complexes à mettre en œuvre en routine.**

En termes de signification sanitaire des valeurs cibles actuelles, il est important de distinguer le cas des eaux chaudes sanitaires de celui des tours aérorefrigérantes.

Concernant les eaux chaudes sanitaires, selon les données de la littérature, la valeur sanitaire en dessous de laquelle le risque de légionellose est négligeable ou acceptable pour la population générale est comprise entre 10^4 ou 10^5 UFC/L en *L. pneumophila*, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme. La réglementation actuelle est plus exigeante d'un facteur 10. Ainsi, **il ne semble pas opportun de modifier les seuils réglementaires relatifs aux *L. pneumophila* dans les eaux chaudes sanitaires**, pour l'interprétation des résultats de dénombrement par culture.

En revanche, pour les patients à "haut risque" (immunodéprimés), l'examen de la littérature, n'a pas permis de mettre en évidence une concentration en *Legionella* dans une eau chaude sanitaire en dessous de laquelle il ne serait plus observé de cas de légionelloses. Pour ces patients, **il est préférable de conserver une valeur cible inférieure au seuil de quantification en *L. pneumophila* et d'analyser le risque vis-à-vis de *Legionella* élargie à toute espèce.**

Concernant les tours aérorefrigérantes, pour la population générale, le risque étant lié à *L. pneumophila* et non *Legionella* spp, **il semble plus opportun de dénombrer *L. pneumophila* plutôt que *L. spp***, tout en conservant les mêmes valeurs cibles (10^3 et 10^5 UFC/L). Toutefois, dans le cadre de la gestion des installations, la recherche de *L. spp* reste un indicateur pertinent de dysfonctionnement.

10.1.5 Détermination de valeurs cibles pour les méthodes alternatives à la culture

Dans le cas des eaux chaudes sanitaires, bien peu de laboratoires se sont risqués à déterminer des valeurs cibles pour les méthodes alternatives en tentant de les faire correspondre aux valeurs cibles utilisées pour l'interprétation de la méthode par culture. Une seule étude publiée a été répertoriée sur le sujet. Elle concerne les seules eaux chaudes sanitaires. Elle fait état de **correspondances entre des seuils de déclenchement d'actions spécifiquement établies pour la méthode par culture et des valeurs cibles établies pour la méthode par q-PCR**. Ces correspondances apparaissent meilleures pour la cible *L. pneumophila* que pour *L. spp*. Aucune tentative de détermination de valeurs cibles impliquant une autre méthode que la q-PCR n'a été répertoriée.

Dans le cas des tours aérorefrigérantes, compte tenu de l'absence de résultats d'études concluantes publiés sur le sujet, **aucune conclusion** ne peut être faite sur la base de la bibliographie.

10.2 Synthèse sur la base des auditions

Le présent chapitre est une synthèse des informations issues des présentations et des discussions menées avec les différents acteurs auditionnés par le groupe de travail. Ces données proviennent d'observations de terrain ou d'études en cours mais ne sont pas publiées. Elles ne peuvent être considérées au même titre que des éléments bibliographiques cités précédemment, dans la mesure où elles ne sont pas passées au crible d'une procédure de validation par les pairs. Leur intérêt réside dans leur comparaison avec les tendances et hypothèses déjà publiées dans la littérature. La liste des personnalités auditionnées et la méthode utilisée pour mener à bien ces auditions sont présentées page 4, dans le chapitre « Auditions ».

La prise en compte et l'interprétation des résultats présentés par les différents acteurs nécessitent une remarque préliminaire, soulignée par l'un d'entre eux. Les essais inter-laboratoires ont montré que **même sur une technique aussi rodée et robuste que la culture, il pouvait exister une grande disparité des performances analytiques**, liée pour partie aux rendements des différentes étapes de l'analyse, ainsi qu'au matériel utilisé (ex : milieu de culture). Les fluctuations pouvaient influencer les résultats à hauteur de 20%. Il a fallu du temps pour que ces disparités soient mieux maîtrisées. De fait, il n'est pas étonnant de trouver entre les différents acteurs des fluctuations des niveaux de fidélité des méthodes et des avis divergents sur l'efficacité de techniques non totalement rodées.

Cette disparité de performance analytique a été identifiée et partiellement réduite pour la culture (actuellement de l'ordre de 1 log sur la moyenne des résultats, selon les essais inter-laboratoires), elle est en cours de maîtrise pour la q-PCR, et n'est ni connue ni évaluée pour les autres méthodes. La grande majorité des acteurs centrent leur activité sur la culture, avec parfois une seconde technique en appui, celle-ci étant la plupart du temps la q-PCR. Les autres techniques sont peu ou pas utilisées, sauf dans le cas d'eaux très chargées.

Les prises de positions des différents acteurs concernant ces techniques doivent être considérées au regard de l'évolution positive tendant à diminuer cette disparité au fil du temps. Des travaux anciens, pour lesquels cette évolution des pratiques n'a pas encore été prise en compte peuvent présenter des différences marquées, alors qu'elles seront moindres pour des travaux récents. A titre d'exemple, **la reproductibilité et la répétabilité de la q-PCR sont désormais voisines de celles de la culture.** La mise en place d'un étalon national pour le dénombrement de *Legionella* par q-PCR va également dans ce sens, dans l'hypothèse d'un raccordement fiable entre étalon primaire et étalons secondaires. L'utilisation de la q-PCR qui reste relativement faible, du fait de la non reconnaissance de ses résultats d'un point de vue réglementaire, fait que le nombre de participants à des essais inter-laboratoires pour la q-PCR est très insuffisant (environ 30 en France) par rapport au nombre de participants pour la culture (environ 300 en France). Sur la base des éléments communiqués, on peut toutefois affirmer que les recherches de *Legionella* par culture (selon la norme NF T90-431) et par q-PCR (selon la norme NF T90-471) restent deux méthodologies distinctes dont la corrélation n'est pas formellement établie.

Le second facteur considéré comme une source de disparités entre les résultats est l'efficacité de la phase d'extraction. L'existence d'une norme devrait contribuer à améliorer ce point, mais le contrôle de cette condition nécessite également un standard de référence, encore à développer. La variabilité entre la q-PCR et la culture n'est en revanche pas influencée par l'échantillonnage qui est identique.

Un autre élément à l'origine de disparités est l'état de cultivabilité des bactéries. La question des bactéries viables non cultivables (VBNC) n'a que peu été évoquée dans les auditions car de l'avis des acteurs leur évaluation quantitative directe pose encore un problème.

Les acteurs principaux traitent chacun de l'ordre de 25 000 échantillons par an. Si la culture est exploitée par tous pour des raisons réglementaires évidentes, les autres méthodes peuvent représenter entre 10 % et moins de 1% de l'activité globale d'analyse, ce qui incite à la prudence lors des conclusions tirées des résultats produits et des commentaires afférents, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer différentes méthodes.

Quelles que soient la ou les méthodes utilisées, tous les acteurs font état d'objectifs différents en fonction des types d'installation et des types d'eau qu'il convient pour eux de distinguer. Cependant la plupart des acteurs retiennent sensiblement les mêmes priorités pour une méthode de dénombrement des *Legionella* :

- méthode adaptée à la matrice analysée ;

Anses

- obtention rapide des résultats : 24 à 48h ;
- suivi des tendances de colonisation des installations par les bactéries (évolution chronologique).
- si possible, quantification équivalente ou proportionnelle à la réglementation.

La plupart admettent explicitement ou non que la culture ne correspond pas totalement à la réalité des besoins industriels et sanitaires puisqu'ils cherchent souvent à développer des méthodes alternatives pour maîtriser leurs installations.

10.2.1 Concernant les eaux chaudes sanitaires

De l'avis de plusieurs des acteurs consultés, la problématique posée par la présence de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires (ECS) est moins complexe que celle des TAR, dans la mesure où il s'agit généralement d'une eau traitée, peu chargée biochimiquement et microbiologiquement parlant. Selon un des acteurs, le taux de contamination des installations par le genre *Legionella* avoisine les 10% de celles qu'il surveille, la majorité des contaminations étant dues à *Legionella* spp et plus rarement à *L. pneumophila*. Les échantillons s'avérant trop chargés en flore interférente pour fournir un résultat par culture représentent seulement 2% des échantillons traités. Par ailleurs, même si le traitement de l'eau est susceptible d'affecter certaines méthodes (ex : par présence de chlore), cette altération demeure modérée. Ce type d'eau ne comporte que peu d'inhibiteurs. De fait, **beaucoup d'acteurs observent plutôt une bonne corrélation entre les différentes méthodes utilisées**, assortie d'une bonne linéarité dès que la concentration en *Legionella* dépasse 10^3 UFC/L (résultats de q-PCR prédictifs des résultats obtenus pas culture dans plus de 80% des cas). **Cette corrélation par rapport à la méthode par culture, est valable pour *L. pneumophila* comme pour *Legionella* spp.**

Dans le cas des eaux chaudes sanitaires, on peut donc envisager sans trop de risque une méthode rapide permettant un dénombrement des *Legionella* avec des performances analytiques adaptées à la matrice. L'utilisation d'une telle méthode représente aux yeux des acteurs une plus value pour la gestion des réseaux non encore étudiées. La difficulté essentielle concerne la détermination des valeurs cibles, car certains résultats présentés font état d'un taux de faux négatifs qui reste préoccupant (supérieur à 11%).

Il est à noter que pour certains acteurs, le problème de la présence de *Legionella* dans les réseaux d'eau chaude sanitaire est principalement lié à la **conception hydraulique des installations** et pourrait être partiellement résolu en modifiant leur conception. **Sur ce point, le groupe de travail tient à préciser qu'il considère que l'amélioration hydraulique des réseaux permettrait de limiter le problème, mais que cela ne suffirait pas à la résoudre totalement. Il souligne également la complexité de la réalisation de telles améliorations dans les installations existantes.**

Afin de prendre une décision dans le cadre d'une gestion d'installation, certains acteurs soulignent l'importance de la prise en compte du nombre de points d'usage contaminés en *L. pneumophila*, comme le font les nord-américains. Ces derniers prônent le déclenchement systématique d'un traitement de l'installation si plus de 30 % des points d'usage sont contaminés. En cas de contamination par *Legionella* observées sur moins de 30 % des points d'usage la mise en œuvre d'un traitement n'est pas systématique.

10.2.2 Concernant les tours aéroréfrigérantes

Le problème posé par les tours aéroréfrigérantes (TAR) est, de l'avis général, nettement plus complexe que celui des eaux chaudes sanitaires. Les *Legionella* pathogènes sont dans ce cas intégrées à un écosystème microbien plus complexe, avec des eaux pouvant être beaucoup plus chargées en particules, en substances chimiques diverses et en microorganismes.

Tous les acteurs soulignent l'importance de dénombrer *Legionella* spp. et *L. pneumophila* pour la surveillance et la gestion courante de leurs installations. Les auditions font néanmoins apparaître que la cible dont le dénombrement apporte le plus d'informations pertinentes et décisives pour la gestion des installations est *L. pneumophila*. Ils s'accordent pour reconnaître que les analyses qu'ils réalisent portent déjà préférentiellement sur cette espèce, plutôt que sur le genre toute entier, dont le dénombrement est exigé dans la réglementation en vigueur. **A cet égard, certains acteurs préconisent d'ailleurs que les seuils réglementaires pour les TARs soit fixé en *L. pneumophila* et non pas en *L. spp.*** En effet, dans un cadre réglementaire (nombre limité de prélèvement), les résultats des recherches de *Legionella* spp. peuvent s'avérer difficilement interprétables car, selon les espèces qui les composent, elles ne représentent pas nécessairement un risque sanitaire.

Un acteur rappelle qu'à l'heure actuelle seule la France recherche *Legionella* spp., alors même que d'autres pays estiment que cette recherche a peu d'intérêt et écartent les cas de *Legionella* spp. des études comparatives. **Toutefois, pour l'ensemble des acteurs auditionnés, la recherche systématique et parallèle de *L. pneumophila* et *Legionella* spp. reste intéressante notamment du fait de l'existence d'espèces « non *pneumophila* » pathogènes, bien que ces espèces soient marginales dans les TAR.**

Pour certains acteurs la colonisation en *Legionella* spp. peut également donner une indication sur l'évolution de l'écologie microbienne des TAR. Ils notent une positivité des tours en *Legionella* spp. supérieure à 96% lorsque la recherche est effectuée en q-PCR, ce qui confirme que les conditions environnementales à l'intérieur des TARs sont particulièrement favorables à la prolifération de ce type de bactérie.

La plupart des acteurs **n'ont pu mettre en évidence de corrélation entre les résultats d'analyse d'eau de TAR obtenus par culture et par q-PCR.** Un acteur auditionné a même évoqué les résultats d'essais qui montrent une meilleure concordance relative entre les résultats de dénombrement de *Legionella* spp par culture et de *L. pneumophila* par q-PCR, et entre les résultats de dénombrement de *L. pneumophila* par culture et de *L. pneumophila* par q-PCR. Cette correspondance n'est cependant que relative. En effet, il ne s'agit pas d'une correspondance directe entre les résultats de culture (en UFC/L) et de q-PCR (en UG/L), mais d'une concordance d'actions préconisées en fonction des valeurs cibles fixées par les auteurs de l'étude pour la q-PCR et des seuils réglementaires pour la culture. Ce point n'est valable que pour les TAR et n'a pas été confirmé par ailleurs. **Certains soulignent que les milieux de cultures ont été initialement développés pour détecter *L. pneumophila* et non *L. spp.*, ce qui pourrait expliquer ce décalage.**

La prise en compte d'un indice de *Legionella* totales (*L. spp.*) pourrait permettre d'estimer l'instabilité ou la stabilité d'une TAR dans le temps, tout en apportant une information sur les effets des traitements. Toutefois un acteur fait remarquer que pour interpréter correctement un résultat de recherche de *L. spp.*, il est nécessaire de connaître l'état d'approvisionnement en eau de l'installation et de disposer d'un suivi régulier pour connaître l'évolution des résultats.

Au cours de l'analyse des données issues des auditions, un membre du groupe de travail a proposé une alternative à l'établissement de valeurs cibles de concentration en *Legionella* dans l'eau, qui sont forcément liés à une méthode donnée. Il propose de préférer à l'établissement de valeurs cibles, l'établissement d'exigences techniques destinées à maîtriser le risque :

- exigence en eau d'appoint : teneur en *Legionella pneumophila* inférieure à la limite de quantification (LQ), quelle que soit la méthode ;
- niveau d'alerte ou d'action : dépassement d'1 log par rapport à la LQ ;
- niveau d'arrêt immédiat : dépassement de 2 log par rapport à la LQ ;
- la même méthode devrait être utilisée pour toutes les analyses (de l'eau d'appoint ou du circuit de l'installation) et la LQ devra être cohérente.

Il pourrait être envisageable d'accepter des dépassements de LQ en eau d'appoint sous réserve de maîtrise stricte des paramètres de fonctionnement de la TAR : débit d'entraînement vésiculaire, rendement du dévésiculeur supérieure à 0.01%, etc. Un suivi de la biomasse sur le même principe, utilisé en routine par le gestionnaire, pourrait par ailleurs permettre de remplacer partiellement les contrôles par dénombrements de *Legionella* et d'espacer ces derniers.

Selon certains acteurs, la flore totale peut également être utilisée comme un outil de gestion des installations, lorsqu'elle est évaluée par **ATP-métrie.** La méthode ne semble toutefois pas adaptée à l'analyse des eaux de TAR alimentées par des eaux de surface qui contiennent de nombreux organismes vivants différents, susceptibles de produire de l'ATP. Son intérêt reste également contesté par d'autres acteurs en raison de sa non-spécificité vis-à-vis du genre *Legionella*. Toutefois, les acteurs s'accordent globalement sur sa simplicité de mise en œuvre sur le terrain, avec notamment peu de compétences nécessaires.

En outre, **un acteur a rapporté que la présence de biofilms dans les TARs semble contribuer à une stabilisation de l'écosystème bactérien, en limitant notamment le développement de *L. pneumophila*.** Cette opinion est basée sur l'analyse des résultats de surveillance de nombreuses tours qui révèle que par rapport aux installations dans lesquelles le biofilm est stable, les tours aérofrigoriférantes conçues spécialement pour limiter la présence de biofilm sont souvent plus difficiles à piloter du point de vue de *L. pneumophila*. **Il est à noter que la plupart des acteurs déclarent ne pas tenir compte de la présence de biofilm dans leurs installations, bien qu'il soit probable qu'une grande part de la multiplication des *Legionella* ait lieu justement dans le biofilm.** Ils

soulignent que l'analyse du biofilm n'est pas requise dans la réglementation et jugent les résultats de recherches des *Legionella* dans celui-ci, trop complexes à interpréter. D'après eux, leur mise au point nécessite encore des recherches approfondies, peu compatibles avec les objectifs industriels immédiats.

Dans le cadre d'une analyse de routine, **l'ATP-métrie et/ou les mesures de flore cultivable ne semblent donc présenter qu'un intérêt marginal pour certains acteurs qui ne basent leurs actions de gestion que sur les valeurs obtenues pour *L. pneumophila* et *L. spp.*** Ils justifient cette position par la plus grande spécificité et donc plus grande fiabilité des dénombrements de *Legionella*. Ils admettent toutefois que le dénombrement de *L. spp.* est une plus-value pour la gestion des installations.

Dans la plupart des études, les *Legionella* sont recherchées dans l'eau. Dans le cadre de préoccupations sanitaires, la recherche de *Legionella* dans les aérosols a été évoquée mais les acteurs ne disposent pas de méthodes et d'appareils de prélèvement de référence suffisamment fiables. Il est donc délicat de conclure sur les résultats d'analyse obtenus.

10.2.3 Cas particulier des eaux très chargées

Dans le cas de TAR alimentées en eaux de rivière les acteurs observent une composition biochimique (inhibiteurs) et microbiologique (flore interférente) complexe et évolutive qui rend les analyses très délicates. **La présence d'une flore interférente en grande quantité** (pouvant inhiber jusqu'à 10% des mesures, 2% en moyenne), **d'inhibiteurs organiques ou d'éléments traces métalliques** (identifiés dans 80% des eaux brutes de rivière et imposant des dilutions d'échantillons allant jusqu'à 2 log) **ou de particules auto fluorescentes, limitent le choix des méthodes applicables.** Par ailleurs, tous ces éléments interfèrent de manière significative sur de nombreux paramètres de la méthode utilisée : sensibilité, justesse, limite de détection, concordance avec les résultats par d'autres méthodes, etc.

Ce constat fait, les acteurs confrontés à ce type d'eau de manière régulière estiment que la méthode par culture ne répond pas correctement aux besoins analytiques pour la gestion de leurs installations. Ils estiment également que la méthode par q-PCR ne présente pas toutes les garanties nécessaires. A titre d'exemple, il y a théoriquement peu de risque d'obtenir des résultats faux négatifs liés à la présence d'inhibiteurs. Cependant, de nombreux échantillons ne sont plus interprétables au regard de la gestion de l'installation, du fait de dilutions importantes qui repoussent la limite de détection au-delà des seuils de décision.

Les méthodes faisant appel à des techniques d'hybridation semblent moins sensibles aux effets d'une eau chargée, avec une bonne cohérence globale et ce quelle que soit la qualité d'eau (avec et sans biocide). **Mais ces méthodes sont encore en cours d'évaluation et nécessitent d'être développées et testées plus avant.** Par ailleurs elles conviennent au dénombrement de *Legionella spp.*, mais restent moins adaptées au dénombrement de *L. pneumophila*. En outre, ces méthodes intègrent une pré-étape de culture de 24 heures et ne détectent donc pas les bactéries viables non-cultivables.

10.2.4 Suivi de traitement et recolonisation

Les désinfections interviennent par le biais d'un traitement choc après un épisode de contamination dépassant le seuil de gestion adopté. Certains acteurs préconisent une désinfection en cas de présence de flore interférente, avec un traitement choc et des analyses renouvelées dans les jours suivants. Le suivi d'installation après désinfection est actuellement effectué par la plupart des acteurs par culture. En effet, lors d'essais en discontinu, **les résultats impliquant la méthode par q-PCR ont montré des variations notables en fonction du biocide utilisé, avec une persistance du signal de q-PCR après désinfection par certains biocides,** sans que le niveau de cette persistance ait été précisé. **Dans le cadre du suivi d'installation, il est donc délicat de dégager des clés d'interprétation en fonction des pratiques opérationnelles.** En dehors de la q-PCR et de la culture, aucune autre méthode spécifique n'a été testée à grande échelle par les acteurs dans ce contexte.

Une autre approche du suivi de traitement pourrait être obtenue par comparaison q-PCR et v-PCR. Cette dernière dénombre théoriquement spécifiquement *Legionella* viables. Il est généralement observé *in vitro* un abattement de 1 à 3 log de la détection des bactéries mortes, entre les résultats obtenus par q-PCR et ceux obtenus par v-PCR. Toutefois, les essais de v-PCR ont été menés sur des systèmes fermés (sans renouvellement de l'eau du système), alors que les TAR sont des systèmes

ouverts. Le risque de détecter des *Legionella* mortes par q-PCR est minimisé dans les TAR par le fort renouvellement de l'eau dans ces installations. Les premiers résultats obtenus par quelques acteurs lors d'essais de v-PCR en conditions réelles semblent montrer que les résultats de détection sont assez comparables à ceux obtenus par q-PCR. La justesse de la q-PCR n'a par ailleurs pas été totalement évaluée.

La v-PCR apparaît à plusieurs acteurs comme potentiellement utile pour détecter rapidement un traitement non signalé ou évaluer l'efficacité immédiate d'un traitement. Toutefois elle reste à ce jour quasi-inutilisée.

Il est rappelé par un acteur que le prétraitement par l'EMA et le PMA n'a pas le même impact selon le matériel d'amplification utilisé, ce que confirme une publication (Chang *et al.* 2010).

Même si le lien entre la présence d'amibes et de *Legionella* dans l'eau n'est pas toujours évident, la présence avérée d'amibes libres dans une TAR semble être pour plusieurs acteurs un indicateur fiable d'une présence potentiellement importante de *Legionella*. Cependant la méthode de détection des amibes la plus répandue est coûteuse, demande du temps et l'ensemble des laboratoires n'est pas en mesure de la mettre en œuvre. Il est donc difficile d'envisager de l'utiliser en routine. De surcroît, la recherche d'amibes dans les TAR n'est pas forcément utile si la présence de *L. pneumophila* est maîtrisée. (opinion basée sur des essais de recherche d'amibes et de *L. pneumophila* en parallèle dans environ 200 TARs.). Elle peut en revanche se révéler intéressante en cas de sur-contamination post-traitement.

Certains acteurs notent en effet un regain de viabilité des *L. pneumophila* 7 à 10 jours après le traitement d'une installation, mettant en doute l'intérêt sanitaire des traitements choc sur le long terme. L'hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène est la destruction des *Legionella* spp. et/ou des flores interférentes qui sont susceptibles de limiter le développement de *L. pneumophila* par un phénomène de concurrence. La rétention des *L. pneumophila* dans le biofilm et dans les amibes où elles sont protégées des traitements et l'éradication de la flore libre permet à leur avis une recolonisation spécifique et accrue par *L. pneumophila*. Ainsi, **la présence de concentrations relativement élevées en *Legionella* spp. pourrait permettre de limiter la prolifération de *L. pneumophila* et ainsi limiter le risque sanitaire qui y est associé.** Il est indiqué que les méthodes destructives qui comptabilisent de fait également les *Legionella* contenues dans les protozoaires permettent de mieux appréhender ce risque

10.2.5 Comparaison des méthodes (corrélations, prédictivité et seuils de décision)

La position des acteurs quand à la comparabilité des méthodes et des éléments que l'on peut tirer de cette comparaison diverge fortement. Certains considèrent que la chose n'est simplement pas possible et s'en tiennent à la méthode réglementaire. Le fait qu'il n'existe aucun seuil réglementaire disponible pour les autres méthodes est un frein déclaré à leur utilisation.

A l'inverse, les auditions font état de deux tentatives de comparaison de méthodes cherchant à être prédictive et à fixer des seuils de décisions. Dans les deux cas, la comparaison ne concerne que la culture et la PCR. De fait, il sera difficile pour le groupe de travail de formuler un avis concernant ces points pour les autres méthodes envisageables à partir des auditions.

Il apparaît clairement à tous les acteurs concernés que les UG et les UFC sont deux unités différentes, ne correspondant à l'évidence pas à la même chose. Toutefois, les résultats de recherche de *L. pneumophila* par culture (UFC) et par PCR (UG) peuvent souvent être liés.

Pour un des acteurs auditionnés, **une lecture anticipée des résultats de culture (avant le délai d'obtention d'un résultat final préconisé par la norme NF T90-431, 14 jours après l'ensemencement) est relativement prédictive des résultats finaux : le résultat est identique au résultat final dans 96 % des cas dès le 5^{ème} ou 6^{ème} jour et dans 85% des cas entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour.** Les résultats d'analyse obtenus par PCR seraient quant à eux prédictifs de ceux obtenus par culture dans tous les cas pour le dénombrement de *L. pneumophila*. A titre d'exemple, pour l'un des acteurs auditionnés, des résultats obtenus par culture en UFC/L plus importants que ceux obtenus en q-PCR en UG/L ne représentent que moins d'1% des cas. En outre, il a été rapporté que lorsque le dénombrement de *L. pneumophila* dépasse 100 000 UFC/L, les résultats par q-PCR et culture sont identiques.

Pour deux autres acteurs, les résultats présentés pour les TAR ne montrent pas une corrélation directe entre la culture et la q-PCR, mais montrent que la q-PCR est prédictive à 97% des résultats négatifs obtenus par culture. En revanche la prédictivité positive est plus

faible. Ceci est interprété par les acteurs comme le fait que les *Legionella* détectées par q-PCR dans les échantillons des TAR sont vivantes mais cultivent difficilement sur les milieux de culture gélosés utilisés dans le cadre de la méthode normalisée par culture. **Paradoxalement, pour l'un des deux acteurs, ceci est moins vrai pour l'ECS avec seulement 89 % de valeur prédictive négative. De fait, par rapport à la culture, la valeur prédictive négative de la q-PCR semble moindre pour les ECS, mais la majorité des faux négatifs mesurés par q-PCR et mis en évidence par culture, sont en dessous du seuil d'alerte de la culture, ce qui de l'avis de l'acteur, enlève du poids à cet écart.** L'auteur d'une autre étude **rapporte néanmoins que 14 % des échantillons donnent des résultats en dessous du seuil d'alerte en PCR, alors qu'ils sont au dessus du seuil d'alerte en culture (au dessus du seuil d'action en culture pour 2% d'entres eux).** La concordance troublante des deux résultats a été remarquée par le groupe de travail. Cela peut être interprété aussi bien comme un point de désaccord entre les méthodes que comme un positionnement erroné des seuils de décisions actuels. **En effet, toutes les études reposent sur la culture comme référence, alors même que la méthode par culture est critiquable** dans certains de ses aspects et peut tout au moins susciter des questions en termes de positionnement des seuils de décisions.

Selon les résultats d'une étude européenne (étude Emile) présentée au groupe de travail, 10 UG/L (ou 1 log UG/L) seraient environ équivalentes à 1 UFC/L. Dans cette étude, les seuils d'alerte (10^3 UFC/L) et d'action (10^4 UFC/L) pris en compte pour la culture sont ceux recommandés par les documents guides européens pour les ECS et TAR et ne sont pas ceux de la réglementation française. **Cette étude propose la mise en place d'un algorithme de décision. Cette proposition est considérée par le groupe de travail comme relativement novatrice par rapport à ce qui a été vu jusqu'ici.**

Les auteurs de l'étude préconisent pour les TAR un seuil d'alerte pour *L. pneumophila* à 10^4 UG/L et un seuil d'action à 10^5 UG/L. Concernant *Legionella* spp. les auteurs préconisent des seuils d'alerte et d'action respectivement de 10^6 UG/L et 10^7 UG/L. Pour les ECS, la correspondance des seuils d'action et d'alerte des deux méthodes est très bonne aussi bien en recherchant *Legionella* spp (67 %) que *L. pneumophila* (74 %). Dans les deux cas les seuils d'alerte et d'action proposés sont respectivement pour *L. pneumophila* de 10^4 UG/L et 10^5 UG/L et pour *Legionella* spp. de $5 \cdot 10^4$ UG/L et $5 \cdot 10^5$ UG/L. L'algorithme de décision présenté n'avait pas encore été publié au moment de l'audition et sa validité n'était pas confirmée⁵².

Un autre acteur indique que la correspondance mise en évidence par l'étude européenne Emile évoquée ne tient pas compte du fait que la méthode par culture n'est pas linéaire. Le seuil d'action proposé dans cette étude serait, d'après lui, justement placé à une concentration correspondant au décrochement de linéarité de la méthode, ce qui en affecterait la validité. Ce point demande donc à être vérifié.

Les rendements respectifs des méthodes comparées semblent également poser question. Le rendement minimum exigé par la méthode PCR telle que décrite dans la norme est de - 0,6 log (25%). En pratique, il atteint en moyenne des valeurs proches de 100 % avec des kits commerciaux certifiés par "Afnor validation" et les résultats minimums ne sont jamais inférieurs à 50%. Le rendement de la culture est de l'ordre de 10% en cas de filtration de l'échantillon et de moins de 1% en cas de traitement acide (En l'absence d'autre référence, la référence prise en compte pour calculer le rendement est la culture sans filtration, dont le rendement est considéré être de 100%, même si cette hypothèse n'est pas réaliste).

Selon l'un des acteurs, la culture est linéaire entre 250 et 5000 et au dessus de 25000. La q-PCR quant à elle est linéaire au dessus de 1000 *Legionella* par litre. Avec un rendement de 100% de la q-PCR, compte tenu des linéarités des deux méthodes, les résultats de la q-PCR et de la culture ne seront comparables qu'au dessus de 25 000 *Legionella* par litre. Si le rendement n'est que de 25% pour la q-PCR, q-PCR et culture donnent des résultats comparables entre 1000 et 10000 *Legionella* par litre (concentration initialement mesurée pour la culture).

Les linéarités et les rendements respectifs des méthodes permettent de situer des valeurs cibles équivalentes pour l'analyse par PCR et culture.

⁵² Il faut signaler ici que les résultats de l'étude Emile ont été publiés très peu de temps avant la publication du présent rapport avec des seuils d'alerte et d'action légèrement différents de ceux qui avaient été évoqués pendant les auditions. Dans cette publication, les auteurs proposent un seuil d'alerte en *L. pneumophila* à $5 \cdot 10^3$ UG/L et un seuil d'action à $5 \cdot 10^4$ UG/L (Lee *et al.* 2011). Cette publication a été soumise au groupe de travail « Méthode de dénombrement de Légionelles dans l'eau », le 24 février 2011. Ce dernier estime qu'elle ne remet pas en cause le raisonnement conduisant à l'établissement de valeurs cibles dans le présent rapport.

Anses

- 1 000 UFC / 2500 UG
- 10 000 UFC / 25 000 UG
- 100 000 UFC et 250 000 UG

A partir de ces données, cet acteur préconise les niveaux de décision suivants pour les *Legionella pneumophila* dénombrées par q-PCR selon la norme XP T 90-471:

- **ECS**
 - o < 2 500 UG/L : Cible
 - o 2 500 UG/L : Alerte
 - o 25 000 UG/L : Action
- **TAR**
 - o < 2 500 UG/L : Cible
 - o 2 500 UG/L : Alerte
 - o 25 000 UG/L : Action
 - o 250 000 UG/L : Arrêt de l'installation

Le groupe de travail estime que l'introduction de l'étalon national de q-PCR amènera probablement cet acteur à reconsidérer les valeurs cibles et les niveaux de décisions préconisés. Selon cet acteur, la sensibilité de la q-PCR est supérieure à celle de la culture (détection de *L. pneumophila* dans 20% des installations *versus* 5% par culture) et sa valeur prédictive négative est excellente (98%). En outre, elle fournit un indicateur de risque précieux, car une valeur de q-PCR positive correspond à un risque de culture positive dans un cas sur 4. Cet acteur signale que ces valeurs ne sont pas seulement un modèle, mais qu'elles sont déjà appliquées de longue date au pilotage d'installations, en faisant uniquement appel aux résultats de q-PCR. Il faut signaler ici que l'acteur en question continue, en parallèle, de réaliser des dénombrements par culture, selon la préconisation de la réglementation. **Selon lui, à ce jour, les installations (TAR ou ECS) gérées de cette manière n'ont jamais rencontré de problème mis en évidence par les résultats de dénombrements par culture, qui n'aient pas été détectés et gérés préalablement grâce aux résultats de q-PCR. Pour le groupe de travail, cette précision est susceptible de renforcer la valeur de la proposition de cet acteur.**

11 Conclusions et recommandations

L'analyse menée par le groupe de travail dans le cadre de cette expertise, notamment concernant les valeurs cibles, l'a amené à prendre en compte certains éléments du risque sanitaire sans pour autant réaliser une évaluation des risques. Ainsi, le groupe de travail s'est notamment intéressé, à la virulence de *L. pneumophila* versus *L. spp*, à la signification sanitaire de la présence de *Legionella* viables non cultivables ou à la signification sanitaire des seuils de gestion réglementaires existants. De la même manière, il a également été pris en considération les procédures de gestion, notamment de désinfection, qui peuvent avoir un impact sur les résultats de dénombrement de *Legionella* examinées.

11.1 Conclusions et recommandations générales à court terme

11.1.1 Les méthodes pertinentes pour une utilisation en routine à court terme

Indépendamment des caractéristiques et performances d'une méthode analytique, pour une application en routine à court terme dans un cadre réglementaire, il importe de disposer d'une méthode dont le protocole est précisément décrit et validé par de nombreux laboratoires, sur un grand nombre d'échantillons. Actuellement, seules les méthodes normalisées offrent cette garantie. Les deux méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau normalisées à ce jour sont la culture (NF T90-431 et NF EN ISO 11731-2⁵³) et la q-PCR (NF T90-471). Les recommandations en vue d'une mise en œuvre à court terme dans un cadre réglementaire ne peuvent donc raisonnablement porter que sur ces deux méthodes.

Cela ne signifie pas que ces deux méthodes sont considérées supérieures aux autres en termes de richesse d'informations apportées ou de performances, mais seulement qu'elles ne nécessitent pas d'études complémentaires pour être applicables. D'autres méthodes ont été identifiées comme potentiellement intéressantes pour le dénombrement de *Legionella* dans l'eau, mais demandent à être développées, stabilisées et testées sur de multiples échantillons, avant qu'il soit possible d'envisager leur application en routine, laquelle ne pourra se faire qu'à moyen ou long terme.

11.1.2 Choix d'une méthode applicable aux eaux chaudes sanitaires et aux eaux des tours aérorefrigérantes

En situation de suivi de routine, dans lequel les délais de réponse ne constituent pas un critère prioritaire, il est préconisé de laisser la possibilité d'utiliser **la méthode par culture ou la méthode par q-PCR**. La méthode pourra être choisie en fonction du contexte local : présence d'inhibiteurs, flore interférente, accessibilité aux techniques, etc. Lorsque l'analyse sera réalisée par q-PCR, il est cependant préconisé, en cas de dépassement de la valeur cible, une mise en culture d'un échantillon afin de disposer de la souche dénombrée, en vue d'éventuelles analyses complémentaires. Les souches mises en culture seront conservées pendant les délais déjà prévus par la réglementation en fonction des différents cas de figure.

Si des **cas groupés ou un cas nosocomial** de légionellose sont avérés, compte tenu de l'importance d'identifier le réservoir infectieux le plus rapidement possible, le groupe de travail recommande la **méthode dont la mise à disposition des résultats est la plus rapide**. Ainsi, il est préconisé de privilégier, selon le diagnostic biologique, le dénombrement de *L. pneumophila* ou *L. spp* par q-PCR, suivie d'une mise en culture pour une comparaison des souches environnementales et cliniques (si elles ont été isolées). Dans le cas où la méthode de dénombrement par q-PCR ne serait pas disponible, il est préconisé d'utiliser la méthode de dénombrement par culture, en conservant là aussi les souches dénombrées pour d'éventuelles études complémentaires. En cas de légionellose à *L. pneumophila*, la recherche dans l'environnement inclura l'identification du séro groupe correspondant au cas clinique. En cas de légionellose due à une autre espèce que *L. pneumophila*, la recherche de *Legionella* spp sera entreprise.

11.1.3 Choix des critères d'interprétation des résultats selon les méthodes

L'utilisation d'une méthode analytique va de pair avec la définition de critères d'interprétation de ses résultats. Aussi, avant d'envisager l'utilisation d'une méthode de dénombrement de *Legionella*, dans

⁵³ Etant donné le peu d'exemples d'application de la norme NF EN ISO 11731-2 en France, les présentes recommandations sont essentiellement basées sur la norme NF T90-431.

Anses

le cadre de la surveillance sanitaire des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, il apparaît nécessaire de fixer des valeurs cibles au-delà desquelles des actions de gestion pourraient être envisagées.

A l'heure actuelle, ces valeurs cibles ne peuvent pas être basées sur les seules données épidémiologiques du fait :

- du peu de publications disponibles sur le sujet et des fortes incertitudes qu'elles mettent en évidence ;
- de la difficulté d'identification de l'origine environnementale des cas de légionellose (possible dans 20% des cas déclarés) ;
- du grand nombre de facteurs autres que la concentration en *Legionella pneumophila* dans l'eau des installations intervenant dans la survenue des légionelloses (météorologie, taille des gouttelettes produites par les installations, état de viabilité et de virulence des souches de *Legionella* présentes dans l'eau, etc.).

Aussi, la détermination des valeurs cibles doit se fonder sur une approche pragmatique, en exploitant les éléments disponibles.

11.1.3.1 Valeurs cibles pour la méthode par culture

En 2001, le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a proposé des valeurs cibles, sur la base des connaissances scientifiques et des observations de terrain disponibles à la date de cette proposition (Dubrou *et al.* 2002). Les valeurs cibles proposées n'étaient pas fondées sur une dose-réponse⁵⁴ chez l'homme.

Ces valeurs cibles ont été reprises dans la réglementation française.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Pour la population générale, la réglementation française en vigueur, fixe la **valeur cible en *L. pneumophila*** à 10^3 UFC/L.

Pour les patients à haut risque (immunodéprimés), la réglementation préconise de ne pas dépasser le seuil de détection de la méthode par culture (selon la norme NF T90-431).

Selon les données de la littérature, la concentration en *L. pneumophila* en dessous de laquelle le risque de légionellose est négligeable ou acceptable pour la population générale est comprise entre 10^4 ou 10^5 UFC/L dans les eaux chaudes sanitaires, malgré l'absence de dose-réponse connue chez l'homme.

L'examen de la bibliographie et les auditions d'acteurs du système de surveillance des *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires n'ont pas mis en évidence d'argument justifiant, d'un point de vue sanitaire, une modification de ces valeurs cibles.

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

La réglementation française en vigueur, concernant les **tours aéroréfrigérantes, fixe des valeurs cibles en *Legionella* spp.** :

- seuil d'acceptabilité de l'eau d'appoint : limite de quantification de la méthode normalisée utilisée ;
- seuil d'action pour l'eau de l'installation : 10^3 UFC/L ;
- seuil d'arrêt pour l'eau de l'installation : 10^5 UFC/L.

La littérature et les auditions d'acteurs du système de surveillance des tours aéroréfrigérantes mettent en évidence une difficulté d'interprétation des résultats liée au choix de la cible du dénombrement. En effet, l'espèce responsable de la plupart des cas de légionelloses déclarés étant *Legionella pneumophila*, il est difficile d'interpréter un dépassement de seuil en *Legionella* spp. d'un point de vue sanitaire. Ces valeurs doivent avant tout être considérées comme des valeurs de gestion.

11.1.3.2 Valeurs cibles pour la méthode par q-PCR

Le niveau actuel des connaissances ne permet pas d'établir une valeur cible de *L. pneumophila* à la q-PCR (en UG/L) sur les bases d'une dose réponse chez l'homme.

⁵⁴ Relation spécifique d'une voie entre des niveaux d'exposition à un agent dangereux et l'indice observé d'un effet donné.

Cependant, les bénéfices sanitaires potentiels de l'utilisation de la q-PCR, du simple fait de la rapidité de sa mise en œuvre et de l'obtention de résultats spécifiques de *L. pneumophila*, incitent à mettre en place les outils permettant l'utilisation de cette technique en routine. En effet, dans de nombreux cas, elle permettrait de détecter et donc de gérer la contamination d'une installation beaucoup plus rapidement qu'avec la culture. Dans ce contexte, l'établissement de valeurs cibles est primordial.

Les seuls référentiels actuels sont les valeurs cibles déjà présentes dans la réglementation pour la méthode par culture. Les retours d'expérience liés à leur utilisation pour la surveillance des légionelles dans l'eau ne mettent pas en évidence la nécessité de les modifier. Il apparaît donc raisonnable de définir les valeurs cibles applicables à la q-PCR de manière à ce que le taux de résultats supérieurs à ces valeurs cibles, obtenus avec une même série de prélèvements, soit équivalent pour la culture et pour la q-PCR.

Cependant les unités des différentes méthodes de dénombrement de *Legionella* apparaissent hétérogènes et difficilement comparables : unités génomes/L (UG/L) pour les méthodes par biologie moléculaire et unités formant colonies/L (UFC/L) pour les méthodes par culture. En l'absence de donnée publiée, les valeurs proposées sont principalement basées sur les résultats de la surveillance des légionelles dans l'environnement, présentés par deux acteurs auditionnés.

- Dans le cas des eaux chaudes sanitaires

Sur la base de ce raisonnement des valeurs cibles peuvent être élaborées pour les points d'usage à risque⁵⁵ dans les établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque.

En ce qui concerne les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé, pour assurer une protection sanitaire maximale, il semble raisonnable de proposer des valeurs cibles égales au seuil de détection de la méthode.

- Dans le cas des tours aéroréfrigérantes

L'établissement de valeurs cibles en *Legionella* spp., adaptées à la q-PCR, pourrait être envisagé sur la base du raisonnement développé ci-dessus.

Cependant, certains essais montrent une bien meilleure concordance relative entre les résultats obtenus par culture et par q-PCR pour le dénombrement de *L. pneumophila* que pour celui de *Legionella* spp. D'un point de vue analytique, il semble donc plus adapté de déterminer une valeur cible en *L. pneumophila* pour la q-PCR.

D'un point de vue sanitaire, l'établissement de valeurs cibles en *L. pneumophila* apparaît également plus pertinent.

Les valeurs réglementaires actuelles en *Legionella* spp. pourraient être considérées plus protectrices d'un point de vue sanitaire que les mêmes valeurs appliquées à *L. pneumophila*, dans la mesure où ces dernières font partie des *Legionella* spp. On rappellera néanmoins que :

- à ce jour, aucune autre espèce que *L. pneumophila* n'a pu être identifiée chez un patient atteint de légionellose, dont l'origine de la contamination ait été attribuée à une tour aéroréfrigérante ;
- la proportion de *L. pneumophila* parmi les *Legionella* spp. varie fortement dans le temps et il n'existe pas d'outil fiable permettant de la prévoir.

Aussi, il paraît fondé de proposer aujourd'hui des valeurs cibles en *L. pneumophila*, pour la surveillance sanitaire des tours aéroréfrigérantes, aussi bien pour la méthode par culture que pour la méthode par q-PCR.

Ce dispositif présente quatre avantages importants :

- d'un point de vue sanitaire :
 - faciliter l'interprétation des résultats de surveillance ;
 - ouvrir la possibilité d'utiliser la q-PCR pour la surveillance des tours aéroréfrigérantes, pour bénéficier de la grande réactivité de cette technique, avec la possibilité de détecter une contamination beaucoup plus rapidement que ce n'est le cas actuellement ;

⁵⁵ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

Anses

- du point de vue de la gestion des installations : le choix de dénombrer *L. pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes à la place de *Legionella* spp. permettrait :
 - d'arrêter les installations uniquement pour une raison sanitaire. Le nombre d'arrêts de fonctionnement des tours aéroréfrigérantes sans fondement sanitaire s'en verrait significativement réduit ;
 - de vérifier plus rapidement l'efficacité des actions correctives menées en cas d'arrêt d'une installation.

11.1.4 Propositions de valeurs cibles

Les valeurs cibles proposées ici reposent sur un avis d'expert en l'état actuel des connaissances. Elles sont proposées dans l'objectif d'améliorer le niveau de sécurité sanitaire.

Les valeurs cibles proposées pour la q-PCR nécessitent d'être consolidées durant une période probatoire, pendant laquelle une étude métrologique serait menée afin de comparer les résultats d'analyse obtenus avec les deux méthodes utilisées en parallèle sur un nombre suffisant d'échantillons.

Les valeurs proposées ici sont propres à chaque méthode. Elles visent cependant à atteindre les mêmes objectifs en termes de gestion des risques.

11.1.4.1 Pour les eaux chaudes sanitaires :

En situation de surveillance de routine

- Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque⁵⁶ dans des établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque⁵⁷ dans les établissements de santé :

Pour les résultats d'analyses obtenus par **culture**, aucune des données répertoriées ne permet de justifier une modification de la réglementation en vigueur en France concernant l'objectif cible préconisé de concentration en *L. pneumophila* à ne pas dépasser, soit **10³UFC /L**.

Pour les résultats obtenus par **q-PCR**, la concentration seuil en *L. pneumophila* à ne pas dépasser est de **5.10³UG /L**. En suivant la logique décrite dans le chapitre 11.1.3., cette recommandation de valeur cible pour la q-PCR est basée sur les données suivantes :

- deux études non publiées, précédemment évoquées au chapitre 10.2., proposent des seuils en *L. pneumophila* de 2,5.10³ UG /L et de 10. 10³ UG /L dans les eaux chaudes sanitaires ;
- compte tenu des incertitudes de l'étape de q-PCR (+/- 0,15 log selon la norme NF T90-471), un résultat égal à 5.10³UG /L, implique que l'échantillon contient entre 3,5.10³ et 7.10³ UG /L.
- Les limites de quantification des kits commercialisés pour le dénombrement de *Legionella* par q-PCR sont comprises entre 0,5.10³ et 0,9.10³ UG /L pour un échantillon de 1 litre d'eau à analyser et entre 10³ et 1,8.10³ UG /L pour un échantillon de 0,5 litre, ce qui est proche de 3,5.10³ UG /L. Ainsi, compte tenu de l'incertitude, de l'étape de q-PCR évoquée ci-dessus, un résultat inférieur à 5.10³ UG /L n'est pas loin de correspondre à un échantillon qui peut en réalité contenir une concentration en *L. pneumophila* égale ou inférieure à la limite de quantification de la méthode. Compte tenu de ces limites analytiques, en gardant des volumes d'échantillon du même ordre de grandeur, il semble donc difficilement envisageable d'exiger une concentration en *L. pneumophila* plus basse.

Ces deux valeurs cibles ne sont pas *sensu stricto* équivalentes.

En cas de dépassement des valeurs cibles proposées et en fonction de la méthode de dénombrement choisie, des actions de gestion doivent être envisagées par le responsable de l'installation. Au cas où des résultats non satisfaisants⁵⁸ sont obtenus, il convient de rechercher l'origine de la contamination en confrontant les résultats d'analyse d'eau prélevée en différents points du réseau de distribution

⁵⁶ L'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire, définit « **point d'usage à risque** » comme « *tout point d'usage accessible au public et pouvant produire des aérosols d'eau chaude sanitaire susceptible d'être contaminée par les légionelles ; il s'agit notamment des douches, des douchettes, des bains à remous ou à jets.* »

⁵⁷ Circulaire DGS 2002 243, du 22 avril 2002 : les patients dits « **patients à haut risque** » sont les immunodéprimés sévères, et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg de prednisonne pendant 30 jours ou plus, ou équivalent) ou récente et à haute dose (c'est-à-dire supérieure à 5 mg/kg de prednisonne pendant plus de 5 jours)

⁵⁸ Dépassement des seuils de gestion fixés

Anses

d'eau chaude. Il importe aussi de vérifier la concentration en *L. pneumophila* dans l'eau du réseau d'eau froide. Le taux de points conformes et la localisation des points non-conformes peuvent également apporter des informations utiles au gestionnaire de l'installation. Les mesures de gestion de la qualité des eaux incluent outre la désinfection, des améliorations à envisager telles que la suppression de bras morts, et de points de soutirage non utilisés ou l'équilibrage du débit. Dans tous les cas, une vérification de l'efficacité des mesures de gestion choisies sera indispensable.

La gestion technique des installations d'eau chaude sanitaire peut permettre de détecter, voire d'anticiper des dysfonctionnements. Elle peut être réalisée par le dénombrement de *Legionella* spp comme par des indicateurs beaucoup plus simples, tels qu'un suivi rigoureux de température basé sur un nombre suffisant de points de mesure.

- Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé :

Selon la réglementation en vigueur en France, (Arrêté du 1er février 2010) l'objectif cible préconisé de concentration en *L. pneumophila* à ne pas dépasser est le seuil de détection de la méthode par culture⁵⁹. Le groupe de travail préconise de conserver cet objectif pour les résultats de surveillance obtenus par culture et recommande d'appliquer ce même objectif de non dépassement du seuil de détection de la méthode utilisée, aux résultats obtenus par q-PCR⁶⁰.

Concernant les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque, il convient, en plus de la surveillance vis-à-vis de *Legionella pneumophila*, de procéder à une analyse de risque étendue au genre *Legionella* et à toutes autres bactéries pathogènes. Celle-ci sera réalisée, par le Comité de lutte contre les infections nosocomiales ou toute organisation chargée des mêmes attributions évoquées dans l'arrêté du 1^{er} février 2010, relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

En situation de surveillance après une décontamination

Après une décontamination chimique ou thermique, il est nécessaire de vérifier son efficacité en dénombant *L. pneumophila* dans un échantillon prélevé quelques jours après le traitement (circulaire DGS 2002 / 243 du 22 avril 2002). Le fascicule de documentation FD T90-522, "Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux" (2006), préconise de réaliser le prélèvement au minimum 48 heures après un traitement de décontamination choc. Ce délai est notamment prévu pour permettre le renouvellement de l'eau dans le réseau et l'élimination des éventuelles bactéries mortes. En termes d'impact sur les résultats des méthodes, la probabilité de dénombrent de fortes proportions de bactéries mortes, par q-PCR, ou de ne pas dénombrent de fortes proportions de bactéries VBNC par culture sont limités. De surcroît, dans le cas d'un traitement de l'eau par un désinfectant chloré, il est nécessaire de traiter l'échantillon d'eau par du thiosulfate de sodium pour neutraliser le chlore. Dans ce cas, le risque d'inhibition par le chlore de la croissance des bactéries sur les milieux de culture et donc le risque de faux négatifs, sont limités.

Le choix de la méthode la plus appropriée (culture ou q-PCR) peut être laissé à la discrétion du gestionnaire de l'installation. Dans le cas de la culture, comme dans celui de la q-PCR, la décontamination peut être considérée suffisante si le résultat de l'analyse met en évidence un nombre de *L. pneumophila* inférieur ou égal à la valeur cible précédemment proposée. Dans le cas contraire, une nouvelle action de gestion doit être envisagée jusqu'à ce que les analyses fassent état de résultats inférieurs ou égal à cette valeur cible.

11.1.4.2 Pour les eaux de tour aérorefrigérante :

En situation de surveillance de routine

Actuellement, dans un contexte sanitaire, les seuils relatifs aux tours aérorefrigérantes fixés par la réglementation française concernent *Legionella* spp. Le **groupe de travail propose de ne plus rechercher *Legionella* spp, mais seulement *L. pneumophila***. Les valeurs cibles de concentration en *L. pneumophila* préconisées sont les suivantes :

Résultats obtenus par culture :

- **valeur à ne pas dépasser pour l'eau d'appoint** : limite de quantification de la méthode (**250 UFC/L**) ;

⁵⁹ 50 UFC /L

⁶⁰ Selon la norme NF T90-471, le seuil de détection de la méthode par q-PCR est variable en fonction des éventuelles dilutions appliquées à l'échantillon en présence d'inhibiteurs. Il est important que les dilutions éventuelles n'impactent pas la valeur cible.

Anses

- **valeur cible d'action** pour l'eau de l'installation : 10^3 UFC /L ;
- **valeur cible d'arrêt** pour l'eau de l'installation : 10^5 UFC /L.

Résultats obtenus par q-PCR :

- **valeur à ne pas dépasser** pour l'eau d'appoint : **limite de quantification** de la méthode (limite variable) ;
- **valeur cible d'action** pour l'eau de l'installation : 5.10^3 UG /L ;
- **valeur cible d'arrêt** pour l'eau de l'installation : 5.10^5 UG /L.

En suivant la logique décrite dans le chapitre 11.1.3., ces recommandations de valeurs cibles pour la q-PCR sont basées sur les données suivantes :

- deux études non publiées précédemment évoquées proposent des valeurs cibles en *L. pneumophila*, dans les tours aéroréfrigérantes : l'une à $2,5.10^3$ UG /L pour le seuil d'action (10^3 UFC /L) et à $2,5.10^5$ UG/L pour le seuil d'arrêt (10^5 UFC /L) ; l'autre à 10^4 UG /L pour le seuil d'alerte (10^3 UFC /L) et à 10^5 UG /L pour le seuil d'action (10^4 UFC /L) ;
- les incertitudes de la q-PCR qui impliquent qu'un résultat égal à 5.10^3 UG /L, signifie que l'échantillon contient entre $3,5.10^3$ et 7.10^3 UG /L et un résultat égal à 5.10^5 UG /L, entre $3,5.10^5$ et 7.10^5 UG /L ;
- le fait qu'un résultat inférieur à 5.10^3 UG /L n'est pas loin de correspondre à un échantillon qui peut en réalité contenir une concentration en *L. pneumophila* égale ou inférieure à la limite de quantification de la méthode.

Les valeurs cibles proposées pour la culture et pour la q-PCR ne sont pas *sensu stricto* équivalentes.

Par ailleurs, une augmentation relative significative (2 log ou plus) de la teneur en *Legionella* spp. par rapport à la teneur en *Legionella* dans l'eau d'appoint pourrait constituer un indicateur de dysfonctionnement de la tour aéroréfrigérante. Le même principe pourrait par ailleurs s'appliquer à d'autres indicateurs bactériens, tels que l'ATP-métrie.

En situation de surveillance après une décontamination

En cas de traitement de décontamination d'une installation à l'arrêt, par suite d'une contamination excessive ou d'un cas de légionellose, il est nécessaire de rincer les circuits afin d'évacuer les bactéries présentes dans l'eau et le cas échéant les résidus de produits chimiques. Les procédures de désinfection spécifient que l'absence de résidus de désinfection doit être vérifiée après le rinçage. Ainsi, le risque de voir un dénombrement perturbé par la présence de désinfectant (pour la méthode par culture) ou la présence de bactéries mortes (pour la méthode par q-PCR), est diminué. Il est donc recommandé de laisser la possibilité d'utiliser la méthode par culture ou la méthode par q-PCR. Il convient cependant de mettre les résultats à disposition du gestionnaire le plus rapidement possible (q-PCR ou culture selon les contextes locaux). L'interprétation des résultats devra prendre en compte les performances analytiques et la particularité des méthodes utilisées.

Selon la réglementation en vigueur, dans le cadre du suivi de décontamination, en cas de dépassement du seuil d'action, il est nécessaire de dénombrer *L. pneumophila* dans un échantillon prélevé au maximum deux semaines après le traitement. En cas de dépassement du seuil d'arrêt, la réglementation demande un prélèvement de contrôle 48h après la remise en service (Arrêté du 13 décembre 2004). La décontamination est suffisante si le résultat de l'analyse met en évidence un nombre de *L. pneumophila* inférieur aux seuils d'action.

En cas de contaminations récurrentes d'un même site, il convient de réaliser des investigations complémentaires incluant la conception hydraulique des installations, la présence de biofilms ainsi que celle de protozoaires.

11.1.5 Besoins d'études et de recherches

En ce qui concerne la q-PCR et la culture, il est nécessaire de mener une étude comparative sur différentes qualités d'eaux (Eaux chaudes sanitaires et tours aéroréfrigérantes), avec un grand nombre d'échantillons, afin de tester et le cas échéant d'affiner les valeurs cibles proposées dans le cadre de cette expertise.

11.2 Conclusions et recommandations à moyen et long termes

Des critères de choix des méthodes ont été définis, discutés et hiérarchisés dans le tableau 1 "Pertinence des critères de sélection d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau dans les contextes des ECS, des TAR et des suivis de décontamination" (page 25).

Cela constitue une base de travail, permettant de faciliter le développement de méthodes alternatives de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, adaptées aux contextes particuliers des eaux chaudes sanitaires et des tours aéroréfrigérantes.

Les méthodes actuelles ne répondent pas à tous les besoins exprimés

Les deux méthodes normalisées qui font l'objet des recommandations à court terme apportent un certain nombre d'informations et ont le mérite d'être largement développées et utilisées. Cependant elles présentent des limites déjà largement évoquées, notamment concernant leurs caractéristiques intrinsèques.

- La méthode par culture n'apporte pas de garantie sur sa capacité à prendre en compte correctement des *Legionella* intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification ; elle ne permet pas de détecter l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes ; elle est relativement lente et fastidieuse ; elle nécessite une bonne compétence technique ; elle peut être influencée par la présence d'une flore autre que *Legionella*.
- La méthode par q-PCR dénombre aussi bien les *Legionella* mortes que vivantes ; elle ne permet pas de disposer de souches pour des études complémentaires ; elle est sensible à la présence d'inhibiteurs.

Des réponses aux besoins sont potentiellement apportées par certaines méthodes alternatives, sous réserve de développements et d'évaluations *in situ*

- Aucune des méthodes alternatives de dénombrement de *Legionella* décrites dans le rapport ne semble pouvoir satisfaire à l'ensemble des attentes identifiées par les experts. Cependant, les principes et objectifs de certaines méthodes décrites permettent d'envisager de repousser certaines des limites. Il est donc important d'encourager leur développement.
- Les méthodes de dénombrement par q-PCR, v-PCR, culture (pour cette dernière sous réserve de l'introduction d'un protocole expérimental permettant la rupture des vésicules amibiennes sans rupture de la membrane bactérienne), FISH et IDS (sous réserve de l'introduction d'un protocole expérimental permettant que la sonde ou l'anticorps puisse pénétrer les cellules amibiennes), semblent pouvoir permettre une prise en compte des *Legionella* intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification.
- Les méthodes de dénombrement par DVC, v-PCR, IDS, DVC-FISH ou culture-FISH semblent permettre de détecter uniquement les bactéries viables ou de distinguer les bactéries viables et non viables. L'une des pistes également évoquées est le marquage spécifique des bactéries viables et non viables à l'aide de fluorochromes marquant les cellules dont la membrane est intègre, ou à l'inverse celles dont la membrane est perméabilisée.
- Les méthodes de dénombrement par q-PCR, v-PCR, immuno-détection, FISH, et IDS permettent théoriquement de détecter l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes.
- Les méthodes de dénombrement par DVC, q-PCR, v-PCR, immuno-détection, FISH, et IDS permettent une obtention relativement rapide des résultats d'analyse.
- Des améliorations des milieux utilisés pour les méthodes de dénombrement par culture pourraient également permettre une réduction du temps d'obtention des résultats de ces méthodes.
- Les méthodes de dénombrement par immuno-détection, FISH, IDS, q-PCR et culture-FISH permettent théoriquement d'améliorer la distinction et la quantification des sérogroupes de *L. pneumophila* autres que le séro groupe 1.

Besoins d'études et de recherches

Les travaux du groupe de travail ont mis en évidence des **manques de connaissances qui pourraient justifier la réalisation d'études ou d'essais expérimentaux**. A titre indicatif et sans revendiquer l'exhaustivité, quelques pistes d'études et de recherches sont proposées.

Pathogénicité et génomique

Il semble opportun de mener des recherches pour améliorer les connaissances sur les *Legionella* pathogènes, notamment des différents clones de *L. pneumophila* sg1 déjà identifiés en pathologie humaine et leur détection. Cette approche nécessiterait une étude complémentaire de la composition des génomes, et le développement de sondes spécifiques, afin de distinguer les séquences les plus intéressantes dans la discrimination des espèces et sérogroupes pathogènes. De même, des recherches pourraient être menées pour améliorer les connaissances sur la notion de dose infectieuse ainsi que sur la pathogénicité des *Legionella* viables non cultivables.

Echantillonnage

Le prélèvement et l'échantillonnage constituent un enjeu fort des futurs travaux de développements. En effet, dans ces deux cas, les méthodes analytiques applicables à l'eau sont utilisables en l'état, à condition d'arriver à disposer d'un échantillon représentatif. Aussi, il convient d'encourager le **développement de méthodes de prélèvement et d'échantillonnage applicables aux aérosols et biofilms**.

Prétraitement des échantillons

Les méthodes de prélèvement et d'échantillonnage utilisées en amont des méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, peuvent avoir une importante influence sur la qualité des résultats obtenus.

Le développement et l'optimisation des prétraitements des échantillons, pour adapter leurs caractéristiques aux méthodes de détection déjà utilisées ou en cours de développement, pourraient permettre d'améliorer les rendements globaux des dénombrements de *Legionella*. L'analyse des eaux très chargées, reste problématique pour l'ensemble des méthodes utilisées. **La capture des bactéries par le biais d'anticorps spécifiques** (séparation immuno-magnétique, etc.) est, dans ce domaine, une piste intéressante qui demande à être développée. Elle est envisageable en amont de la quasi-totalité des méthodes de dénombrement évoquées. Elle peut notamment permettre de contourner efficacement le problème de la flore interférente (lequel affecte la culture) mais également celui des inhibiteurs (lequel handicape l'amplification génique par PCR). Toutefois, une capture spécifique nécessite un large panel d'anticorps recouvrant la gamme des espèces et sérogroupes actuellement identifiés. Ces anticorps ne sont pas tous encore disponibles ou leur qualité sur le plan de l'affinité est encore perfectible. Les efforts consentis pour le développement de nouveaux anticorps devraient s'avérer à terme un atout précieux dans l'efficacité de l'évaluation du risque aussi bien que dans la progression de la qualité du diagnostic médical.

Techniques analytiques

Chaque méthode étudiée possède ses points faibles, que les développements ultérieurs devront s'attacher à atténuer.

Ainsi, il s'agit de s'assurer que les milieux sélectifs utilisés en culture présentent une sélectivité équivalente en termes de dénombrement pour les différentes espèces et sous-types de *Legionella*.

Par ailleurs, les difficultés de la méthode par culture à dénombrer les VBNC, alors que ces mêmes bactéries semblent pouvoir être revitalisées par les protozoaires indiquent que les milieux actuellement utilisés pour la caractérisation des *Legionella* sont encore perfectibles. **La mise au point de nouveaux milieux de cultures plus adaptés**, en particulier permettant la croissance de la fraction actuellement non cultivable, est sans nul doute une voie d'amélioration de la méthode par culture. Il convient également d'évaluer l'efficacité de nouveaux antibiotiques, différents de ceux actuellement utilisés dans le milieu GVPC, afin de rendre plus efficace la discrimination entre *Legionella* et flore interférente.

Comme cela a été évoqué, la q-PCR pourrait également faire l'objet d'améliorations. Actuellement, ses performances peuvent notamment être affectées par la présence d'inhibiteurs. Des développements visant à limiter l'impact des inhibiteurs et à optimiser l'étape d'extraction de l'ADN semblent une voie d'amélioration intéressante.

Le q-PCR ne donne pas d'indication sur l'état de viabilité des bactéries. La v-PCR semble fournir une information sur l'état de viabilité des bactéries. Des études visant à tester cette méthode sur des eaux environnementales sont cependant encore nécessaires pour vérifier son potentiel.

Anses

L'hybridation moléculaire peut également contribuer à répondre au problème du dénombrement de *Legionella* dans des eaux très chargées. Elle est moins sensible aux inhibiteurs que l'amplification génique car elle ne fait intervenir aucune enzyme et est par ailleurs capable de détecter aussi bien les cellules cultivables que les VBNC. La mise en œuvre de ce type d'analyse pourrait passer par le développement de biocapteurs (puces à ADN, etc.) adaptés à ce type d'eau.

Le développement de kits prêts à l'emploi, basés sur les différents principes déjà évoqués semble également une voie d'amélioration prometteuse.

Outils utilisables sur site

Une demande a été fortement exprimée lors des auditions par différents acteurs. Elle concerne un besoin de **développement d'outils utilisables sur site** afin de générer le plus rapidement possible, directement sur les lieux d'installation, des réponses non ambiguës permettant d'améliorer l'efficacité de la surveillance de la qualité des eaux. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun système portable susceptible de réaliser le dénombrement de *Legionella*. De tels outils pourraient être développés pour être mis à disposition des gestionnaires d'installations et des industriels.

Matrices et écosystèmes

Les écosystèmes des légionelles sont encore mal caractérisés. Des études complémentaires sur l'influence des conditions environnementales sur la composition physicochimique de l'eau, le biofilm, les traitements biocides et les interactions entre les microorganismes permettrait de faire progresser les connaissances dans ce domaine.

Bien que l'eau soit la source principale de contamination, les aérosols sont la source principale de diffusion leur comportement et constitution sont encore trop méconnus. Des études supplémentaires dans ce domaine sont nécessaires.

Le contrôle efficace des installations passe par la maîtrise des systèmes biologiques qui s'y trouvent. L'état des connaissances des écosystèmes microbiens complexes, en particulier des **biofilms** et de leur capacité à servir de réservoir aux *Legionella* est lacunaire. Cette lacune devrait être comblée par des études car, actuellement, elle entrave les possibilités de contrôle.

Le suivi des **protozoaires** (amibes et ciliés) dans les installations et leur contribution à la dangerosité des installations à risque est trop largement négligé. Une maîtrise complète du risque ne pourra être envisagée sur le long terme que si ces deux paramètres sont pris en compte. Un **effort sensible de la recherche dans ces deux domaines** est préconisé.

Des études **comparant les stratégies de suivi des installations mettant en œuvre les différentes méthodes** de dénombrement disponibles, en commençant par la culture et la q-PCR, pourraient être proposées, notamment en cas de décontamination, pour optimiser les délais entre traitements et prélèvements en fonction des méthodes.

Enfin, il semble important que le développement des futurs réseaux intègre la problématique des *Legionella* et anticipe autant que possible les problèmes hydrauliques à l'origine de développement bactérien.

Interprétation des résultats

L'absence de **critères d'interprétation des résultats** du point de vue sanitaire, quelles que soient les méthodes alternatives à la culture, tient principalement au manque de données analytiques obtenues par ces différentes méthodes. A court terme, il convient d'affiner les critères d'interprétation des résultats retenus pour la q-PCR. A moyen ou long terme, il convient d'élaborer des critères pour les autres méthodes qui atteindront un niveau de développement suffisant.

S'agissant des méthodes non encore rodées, le manque de cohérence des essais comparatifs mettant en œuvre les différentes technologies justifie de **mettre en œuvre des essais à grande échelle. Ces essais permettront d'aboutir à terme à une standardisation des protocoles**, voire à leur normalisation et de disposer de données suffisantes pour pouvoir les comparer.

Il semble probable que l'émergence d'une solution efficace susceptible de répondre au problème des *Legionella* passera à terme par l'élaboration d'une technique composite mettant en œuvre plusieurs des principes décrits dans le présent rapport. Pour autant, certaines méthodes se situant encore à des stades très préliminaires de développement, demandent à être encouragées.

Références bibliographiques

- Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS (1998) Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3127-3133.
- Ader F, Le BR, Fackeur R, Raze D, Menozzi FD, Viget N, Faure K, Kipnis E, Guery B, Jarraud S, Etienne J, Chidiac C (2008) In vivo effect of adhesion inhibitor heparin on *Legionella pneumophila* pathogenesis in a murine pneumonia model. *Intensive Care Med* **34**, 1511-1519.
- AFSSA (2008) 'Demande d'appui scientifique et technique relatif à l'équivalence des méthodes alternatives par rapport aux méthodes de référence dans le domaine des eaux destinées à la consommation humaine (Saisine 2007-SA-0192) - Laboratoire d'étude et de recherches en hydrologie.'
- Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S (2008) Use of Flow Cytometry To Monitor *Legionella* Viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7813-7816.
- Alonso JL, Mascellaro S, Moreno Y, Ferrus MA, Hernandez J (2002) Double-Staining Method for Differentiation of Morphological Changes and Membrane Integrity of *Campylobacter coli* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5151-5154.
- Amann R, Fuchs BM, Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 231-236.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Ascon-Cabrera MA (1995) Activity of synchronized cells of a steady-state biofilm recirculated reactor during xenobiotic biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 920-925.
- Aurell H, Catala P, Farge P, Wallet F, Le Brun M, Helbig JH, Jarraud S, Lebaron P (2004) Rapid Detection and Enumeration of *Legionella pneumophila* in Hot Water Systems by Solid-Phase Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1651-1657.
- Avril J, Dabernat H, Denis F (2000) In '*Legionella*. In: Bactériologie clinique'. (Ed. Ellipses) pp. 350-363. Paris)
- Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, Towner KJ (2000) Detection of *Legionella pneumophila* Using a Real-Time PCR Hybridization Assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4215-4218.
- Barer MR, Smith RJ, Cooney RP, Kimmitt PT (2000) Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *J Infect. Chemother.* **6**, 108-111.
- Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takenchi K (2005) Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* **61**, 399-412.
- Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R, Adoutte A (1992) A broad molecular phylogeny of ciliates: identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A* **89**, 9764-9768.
- Baron PA, Willeke K (1986) Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environ Res* **39**, 8-18.
- Bartie C, Venter SN, Nel LH (2003) Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Research* **37**, 1362-1370.
- Bauer M, Mathieu L, oge-Abarkan M, Remen T, Tossa P, Hartemann P, Zmirou-Navier D (2008) *Legionella* bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes. *J Epidemiol. Community Health* **62**, 913-920.
- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B, Ollevier F (2007) 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.

- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F (2006) Quantitative detection and differentiation of free-living amoeba species using SYBR green-based real-time PCR melting curve analysis. *Curr.Microbiol* **53**, 506-509.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**, 597-600.
- Berendt RF, Young HW, Allen RG, Knutsen GL (1980) Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *J Infect.Dis* **141**, 186-192.
- Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ (1998) Production of Respirable Vesicles Containing Live *Legionella pneumophila* Cells by Two *Acanthamoeba spp.* *Appl.Environ.Microbiol.* **64**, 279-286.
- Berthelot N, Oberti S, Pman A, Jandos AM, Decherf S, Alexandre V, Valette M, Laurent F (2009) Prélèvement des légionelles dans les aérosols. Etude de la viabilité avec deux préleveurs du marché. *L'eau, l'industrie les nuisances* 1-3.
- Bhopal RS, Fallon RJ, Buist EC, Black RJ, Urquhart JD (1991) Proximity of the home to a cooling tower and risk of non-outbreak Legionnaires' disease. *BMJ* **302**, 378-383.
- Bogosian G, Bourneuf EV (2001) A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep* **2**, 770-774.
- Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B (1985) Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1128-1131.
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tato D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De LG, Ossi C, Moro M, Ribera DG (2004) Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerg.Infect.Dis* **10**, 457-464.
- Boulanger CA, Edelstein PH (1995) Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 1805-1809.
- Bouyer S, Imbert C, Rodier MH, Héchard Y (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* **9**, 1341-1344.
- Breiman RF, Fields BS, Sanden GN, Volmer L, Meier A, Spika JS (1990) Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* **263**, 2924-2926.
- Brieland J, McClain M, LeGendre M, Engleberg C (1997) Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis*: a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis. *Infect.Immun.* **65**, 4892-4896.
- Bushon RN, Likirdopulos CA, Brady AMG (2009) Comparison of immunomagnetic separation/adenosine triphosphate rapid method to traditional culture-based method for *E. coli* and enterococci enumeration in wastewater. *Water Research* **43**, 4940-4946.
- Byrd JJ, Xu HS, Colwell RR (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**, 875-878.
- Campese C, Bitar D, Jarraud S, Maine C, Forey F, Etienne J, Desenclos JC, Saura C, Che D (2010) Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998-2008. *Int J Infect.Dis.*
- Cavalier-Smith T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **57**, 953-994.
- Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, Lomma M, Rvins-Ravault D, Newton HJ, Sansom FM, Jarraud S, Zidane N, Ma L, Bouchier C, Etienne J, Hartland EL, Buchrieser C (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS.Genet.* **6**, e1000851.
- Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabel H (2009) Specific Detection of Viable *Legionella* Cells by Combined Use of Photoactivated Ethidium Monoazide and PCR/Real-Time PCR. *Appl.Environ.Microbiol.* **75**, 147-153.
- Chang B, Taguri.T., Sugiyama.K., Amemura-Maekawa.J., Kura.F., Watanabe.H. (2010) Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* Cells. *Jpn.J.Infect.Dis.* **63**, 119-123.
- Chen NT, Chang CW (2010) Rapid quantification of viable *legionellae* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J Appl Microbiol.*

- Cherry WB, Thomason BM (1969) Fluorescent antibody techniques for Salmonella and other enteric pathogens. *Public Health Rep* **84**, 887-898.
- Ciesielski CA, Blaser MJ, Wang WL (1984) Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of Legionella pneumophila from hospital plumbing. *Appl.Environ.Microbiol.* **48**, 984-987.
- Cirillo JD, Cirillo SLG, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS (1999) Intracellular Growth in Acanthamoeba castellanii Affects Monocyte Entry Mechanisms and Enhances Virulence of Legionella pneumophila. *Infect.Immun.* **67**, 4427-4434.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect.Immun.* **62**, 3254-3261.
- Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR (2000) Detection of *Legionella* Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 1709-1712.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Nerlier E (1942) The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *Journal of Immunology* **45**, 159-170.
- Cooper IR, Meikle ST, Standen G, Hanlon GW, Santin M (2009) The rapid and specific real-time detection of Legionella pneumophila in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy. *J Microbiol Methods* **78**, 40-44.
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A (2005) Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 46-50.
- Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret JF, Greub G (2010) Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **1213**, 158-166.
- Courcol R (2009) Quelles utilisations de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale ? *Revue Francophone des Laboratoires* **2009**, 61-64.
- CSHPF (2005) 'Le risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion.'
- David C, Bureau-Chalot F, Kolb B, Jarraud S, Delmer A, de CC (2006) Legionellosis due to *Legionella gormanii* fortuitously found in a man with chronic lymphocytic leukemia: a case study and literature review. *Med Mal Infect.* **36**, 172-173.
- De Jonckheere JF (1980) Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different Acanthamoeba spp. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 681-685.
- Declerck P (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **12**, 557-566.
- Delgado-Viscogliosi P, Simonart T, Parent V, Marchand G, Dobbelaere M, Pierlot E, Pierzo V, Menard-Szczepara F, Gaudard-Ferveur E, Delabre K, Delattre JM (2005) Rapid Method for Enumeration of Viable Legionella pneumophila and Other Legionella spp. in Water. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 4086-4096.
- Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre JM, Delattre JM (2009) 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.
- Deloge-Abarkan M, Ha TL, Robine E, Zmirou D, Mathieu L (2007) Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *J.Environ.Monit.* **9**, 91-97.
- Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, Bosman A, Van den HS, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van Spaendonck MA (2002) A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg.Infect.Dis* **8**, 37-43.
- Dennis PJJ, Bartlett CLR, Wright AE (1984) Comparison of isolation methods for Legionella spp. In Thornsby, C. et al. (ed.) Legionella : Proceedings of the 2nd International symposium Washington D.C. In 'Proceedings of the 2nd International symposium Washington D.C.'. pp. 294-296. (American Society for Microbiology:

- Diederer BMW, Kluytmans JAJW, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF (2008) Utility of Real-Time PCR for Diagnosis of Legionnaires' Disease in Routine Clinical Practice. *J.Clin.Microbiol.* **46**, 671-677.
- Ditommaso S, Giacomuzzi M, Gentile M, Zotti CM (2010) Evaluation of the usefulness of a new direct immunofluorescence assay (ScanVIT-*Legionella*™) for monitoring hospital water systems contaminated with *Legionella* spp. *Letters in Applied Microbiology* **50**, 341-346.
- Doleans A, Aurell H, Eyrolle M, Ina G, Reney J, Andenesch F, Tienne J, Arraud S (2004) Clinical and Environmental Distributions of *Legionella* Strains in France Are Different. *J.Clin.Microbiol.* **42**, 458-460.
- Dubrou S, Guillotin L, Gabon S, Van Gastel B, Chalkmel O, Cartier D, Lawrence C, Decludt B, Etienne J, Squinazi F (2002) Cooling towers and Legionellosis : a large urban area expérience. In '*Legionella*'. (Ed. ASM Press) pp. 291-294. Washington)
- Ducret A (2009) Viabilité et cultivabilité de *L. pneumophila*.
- Duquenne P, Greff-Mirguet G (2005) 'L'échantillonnage et l'analyse de bioaérosols, Hygiène et sécurité du travail, 1^{er} trimestre 2005.' INRS, No. 198,
- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M (2008) A PCR-Based Method for Monitoring *Legionella pneumophila* in Water Samples Detects Viable but Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. *Appl.Environ.Microbiol.* **74**, 4817-4824.
- Edelstein PH (1981) Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **14**, 298-303.
- El-Boubbou K, Gruden C, Huang X (2007) Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation. *J Am Chem Soc* **129**, 13392-13393.
- FAO (1997) 'Section 7.2.1 "Spécifications en matière de performance" du "Manuel sur le Contrôle de la Qualité des Produits Alimentaires. 14: Assurance de la Qualité dans le Laboratoire d'Analyse Chimique des Aliments".' FAO - ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE,
- Farhat M, Trouilhe MC, Brand E, Moletta-Denat M, Robine E, Frère J (2010) Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 1073-1082.
- Faulkner G, Berk SG, Garduno E, Ortiz-Jimenez MA, Garduno RA (2008) Passage through *Tetrahymena tropicalis* Triggers a Rapid Morphological Differentiation in *Legionella pneumophila*. *J.Bacteriol.* **190**, 7728-7738.
- Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* **10**, 437-441.
- Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW (1978) Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* **8**, 320-325.
- Fields BS (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**, 286-290.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE (2002) Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin.Microbiol.Rev.* **15**, 506-526.
- Fields BS, Sanden GN, Barbaree JM, Morrill WE, Wadowsky RM, White EH, Feeley JC (1989) Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks. *Current Microbiology* **18**, 131-137.
- Fields BS, Shotts EB, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT (1984) Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl.Environ.Microbiol.* **47**, 467-471.
- Finlay BJ, Esteban GF (1998) Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. *Biodiversity and Conservation* **7**, 1163-1186.
- Frère J (2009) Persistance de *Legionella pneumophila* dans les biofilms. *Association française des techniques hydrothermales - Bulletin d'information* **20**, 11-16.

- Frueh FW, Noyer-Weidner M (2003) The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: Impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med* **41**, 452-461.
- Fuchslin HP, Kotzsch S, Keserue HA, Egli T (2010) Rapid and quantitative detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry A* **77**, 264-274.
- Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, Sakurada K, Yoshino M, Yasuda J (2011) Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiological Research* **166**, 77-86.
- Garcia MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Kwaik YA (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ.Microbiol.* **9**, 1267-1277.
- Garduño EF, Faulkner G, Ortiz-Jimenez MA, Berk SG, Garduño RA (2006) Interaction with the ciliate *Tetrahymena sp.* may predispose *Legionella pneumophila* to infect human cells. In 'Legionella: State of the Art 30 years after its recognition'. (Eds NP Cianciotto, Y Abu Kwaik, PH Edelstein, BS Fields, DF Geary, TG Harrison, CA Joseph, RM Ratcliff, JE Stout, and MS Swanson) pp. 297-300. Washington)
- Géhin D, Faure M, Duquenne P, Simon X, Vallet D, Montjoffre F, Le Bacle C (2009) 'Fabrication de saucissons secs et pneumopathie d'hypersensibilité. Documents pour le médecin du travail, 4^{ème} trimestre 2009.' INRS, No. 120,
- Girod JC, Reichman RC, Winn WC, Jr., Klaucke DN, Vogt RL, Dolin R (1982) Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis. The result of a common-source exposure to *Legionella pneumophila*. *Arch Intern.Med* **142**, 545-547.
- Goyer N, Lavoie J, Lazure L, Marchand G (2001) 'Bioaerosols in the Workplace: Evaluation, Control and Prevention Guide - Studies and Research Projects / Technical Guide T-24.' IRSST, Montréal
- Griffin JL (1972) Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* **178**, 869-870.
- Grimm D, Merkert H, Ludwig W, Schleifer KH, Hacker J, Brand BC (1998) Specific Detection of *Legionella pneumophila* : Construction of a New 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**, 2686-2690.
- Habicht W, Muller HE (1988) Occurrence and parameters of frequency of *Legionella* in warm water systems of hospitals and hotels in Lower Saxony. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg B* **186**, 79-88.
- Harris A, Lally M, Albrecht M (1998) *Legionella bozemanii* pneumonia in three patients with AIDS. *Clin Infect.Dis* **27**, 97-99.
- Hay J, Seal DV, Billcliffe B, Freer JH (1995) Non-culturable *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii*: detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 61-65.
- Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR (2001) Direct Detection of *Legionella Species* from Bronchoalveolar Lavage and Open Lung Biopsy Specimens: Comparison of LightCycler PCR, In Situ Hybridization, Direct Fluorescence Antigen Detection, and Culture. *J.Clin.Microbiol.* **39**, 2618-2626.
- Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Luck PC (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2841-2845.
- Helbig JH, Ludwig B, Luck PC, Groh A, Witzleb W, Hacker J (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **2**, 160-165.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* **10**, 413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 1026-1030.

- Hixon SC, White WE, Yielding KL (1975) Selective covalent binding of an ethidium analog to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labeling. *J.Mol.Biol.* **92**, 319-329.
- Hoebe CJ, Kool JL (2000) Control of legionella in drinking-water systems. *Lancet* **355**, 2093-2094.
- Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP (2003) Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 585-597.
- Holden EP, Winkler HH, Wood DO, Leinbach ED (1984) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infect.Immun.* **45**, 18-24.
- Hurt GB, Doktycz MJ, Vass AA, Buchanan MV (2010) Detection of Bacterial DNA Polymerase Chain Reaction Products by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry* **10**, 377-382.
- Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM, Burge WD (1987) Viable *Legionella pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. *Nat.Biotechnol.* **5**, 947-950.
- Hwang MG, Katayama H, Ohgaki S (2006) Effect of Intracellular Resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphage* Cells on the Antimicrobial Properties of Silver and Copper. *Environ.Sci.Technol.* **40**, 7434-7439.
- Joly JR, Dery P, Gauvreau L, Cote L, Trepanier C (1986) Legionnaires' disease caused by *Legionella dumoffii* in distilled water. *CMAJ* **135**, 1274-1277.
- Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S (2006) Quantitative Real-Time *Legionella* PCR for Environmental Water Samples: Data Interpretation. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 2801-2808.
- Jones MD, Foulkes NS (1989) Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8387-8388.
- Joseph, C. A., Ricketts, K. D., et European Working Group for Legionella Infections, Respiratory Diseases Department Health Protection Agency Centre for Infections. Surveillance and outbreak reports - Legionnaires' disease in Europe 2007–2008. *Eurosurveillance* 15. 25-2-2010. Eurosurveillance. Ref Type: Electronic Citation
- Joux F, Lebaron P (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes.Infect.* **2**, 1523-1535.
- Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 169-187.
- Keller DW, Hajjeh R, DeMaria A, Fields BS, Pruckler JM, Benson RS, Kludt PE Lett SM, Mermel LA, Giorgio C, Breiman RF (1996) Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella* species. *Clin Infect.Dis* **22**, 257-261.
- Kilvington S, Price J (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Microbiology* **68**, 519-525.
- Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans ADL, Beumer RR, Van der Kooij D (2004) Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in Aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**, 6826-6833.
- Lau HY, Ashbolt NJ (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol* **107**, 368-378.
- Lee HJ, Ho MR, Bhuwan M, Hsu CY, Huang MS, Peng HL, Chang HY (2010) Enhancing ATP-based bacteria and biofilm detection by enzymatic pyrophosphate regeneration. *Analytical Biochemistry* **399**, 168-173.
- Lee J, Caplivski D, Wu M, Huprikar S (2009) Pneumonia due to *Legionella feeleii*: case report and review of the literature. *Transpl.Infect.Dis* **11**, 337-340.
- Lee JV, Joseph C (2002) Guidelines for investigating single cases of Legionnaires' disease. *Commun.Dis.Public Health* **5**, 157-162.

Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, Hartemann P, Luck C, Pangon B, Ricci ML, Scaturro M, Fontana S, Sabria M, Sanchez I, Assaf S, Surman-Lee S (2011) An international trial of quantitative PCR for monitoring for Legionella in artificial water systems. *J Appl Microbiol*.

Lee JY, Deininger RA (2004) Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence* **19**, 31-36.

Lemarchand K, Parthuisot N, Catala P, Lebaron P (2001) Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology* **25**, 301-309.

Leoni E, Legnani PP, Bucci Sabattini MA, Righi F (2001) Prevalence of Legionella spp. in swimming pool environment. *Water Res* **35**, 3749-3753.

Lorenz MG, Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**, 563-602.

Luck CP, Jacobs E, Roske I, Schroter-Bobsin U, Dumke R, Gronow S (2009) Legionella dresdenensis sp. nov. isolated from the river Elbe near Dresden in Germany. *Int J Syst Evol Microbiol* ijs.

Luck PC, Igel L, Helbig JH, Kuhlisch E, Jatzwauk L (2004) Comparison of commercially available media for the recovery of Legionella species. *Int J Hyg Environ Health* **207**, 589-593.

Lynn DH, Corliss JO (1991) In 'Microscopic Anatomy of Invertebrates: Protozoa'. (Ed. Wiley-Liss) pp. 333-467. New York)

Mahbubani MH, Bej AK, Miller RD, Atlas RM, DiCesare JL, Haff LA (1991) Detection of bacterial mRNA using polymerase chain reaction. *Biotechniques* **10**, 48-49.

McDougald D, Rice SA, Weichert D, Kjelleberg S (1998) Nonculturability : adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* **25**, 1-9.

Meenhorst PL, Reingold AL, Groothuis DG, Gorman GW, Wilkinson HW, McKinney RM, Feeley JC, Brenner DJ, van FR (1985) Water-related nosocomial pneumonia caused by Legionella pneumophila serogroups 1 and 10. *J.Infect.Dis.* **152**, 356-364.

Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Brachet E, Marin M, Cazalet C, Gomez-Valero L, Gaillard JL, Herrmann JL, Etienne J, Lawrence C, Buchrieser C (2009) Comparative genomics of the lipopolysaccharide biosynthesis gene cluster of *Legionella pneumophila*: towards rapid identification tests. In 'Legionella 2009'.

Mignon-Godefroy K, Guillet JG, Butor CÃ (1997) Solid phase cytometry for detection of rare events. *Cytometry* **27**, 336-344.

Miranda-Castro R, de-Los-Santos-Alvarez N, Lobo-Castanon MJ, Miranda-Ordieres AJ, Tunon-Blanco P (2009) PCR-coupled electrochemical sensing of *Legionella pneumophila*. *Biosens.Bioelectron.* **24**, 2390-2396.

Mody CH, Paine R, III, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI, Toews GB (1993) Legionella pneumophila replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect.Dis* **167**, 1138-1145.

Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE (2010) Rapid identification of Legionella species by mass spectrometry. *J Med Microbiol* **59**, 273-284.

Morio F, Corvec S, Caroff N, Le Gallou F, Dugeon H, Reynaud A (2008) Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: Utility for daily practice. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**, 403-411.

Moritz MM, Flemming HC, Wingender J (2010) Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health* **213**, 190-197.

Muder RR, Yu VL (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clinical Infectious Diseases* **35**, 990-998.

Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM (2001) Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. *Microbiology* **147**, 3121-3126.

- Myjak P, Kur J, Pietkiewicz H (1997) Usefulness of new DNA extraction procedure for PCR technique in species identification of *Entamoeba* isolates. *Wiad.Parazytol.* **43**, 163-170.
- Nayak M, Kotian A, Marathe S, Chakravorty D (2009) Detection of microorganisms using biosensors- a smarter way towards detection techniques. *Biosens.Bioelectron.* **25**, 661-667.
- Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger RJ, Musser KA (2008) Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn.Microbiol Infect.Dis* **62**, 125-132.
- Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods* **42**, 97-114.
- Newsome AL, Baker RL, Miller RD, Arnold RR (1985) Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect.Immun.* **50**, 449-452.
- Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS (1998) Isolation of an Amoeba Naturally Harboring a Distinctive *Legionella* Species. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**, 1688-1693.
- Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety.Res* **6**, 37-53.
- Nocker A, Camper AK (2006) Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 1997-2004.
- Nocker A, Cheung CY, Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J.Microbiol.Methods* **67**, 310-320.
- Oh BK, Kim YK, Lee W, Bae YM, Lee WH, Choi JW (2003) Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance. *Biosens.Bioelectron.* **18**, 605-611.
- Ohno A, Kato N, Sakamoto R, Kimura S, Yamaguchi K (2008) Temperature-Dependent Parasitic Relationship between *Legionella pneumophila* and a Free-Living Amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl.Environ.Microbiol.* **74**, 4585-4588.
- Oliver JD (2000) The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In 'Nonculturable microorganisms in the environment'. (Ed. R.R.Colwell and D.J.Grimes) pp. 277-300. (ASM Press: Washington, D.C.)
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43 Spec No**, 93-100.
- Oliver JD (2009) Recent findings on the viable, but nonculturable state in pathogenic bacteria. *Federation of European Microbiological Societies* 1-11.
- Orrison LH, Cherry WB, Tyndall RL, Fliermans CB, Gough SB, Lambert MA, McDougal LK, Bibb WF, Brenner DJ (1983) *Legionella oakridgensis* : unusual new species isolated from cooling tower water. *Appl.Environ.Microbiol.* **45**, 536-545.
- Pagnier I, Merchat M, La SB (2009) Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. *Future.Microbiol* **4**, 615-629.
- Pasculle AW, Feeley JC, Gibson RJ, Cordes LG, Myerowitz RL, Patton CM, Gorman GW, Carmack CL, Ezzell JW, Dowling JN (1980) Pittsburgh Pneumonia Agent: Direct Isolation from Human Lung Tissue. *The Journal of Infectious Diseases* **141**, 727-732.
- Paszko-Kolvaa C, Shahamatc M, Colwellb RR (1992) Long-term survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microbiology Letters* **102**, 45-55.
- Patterson WJ, Seal DV, Curran E, Sinclair TM, Mcluckie JC (1994) Fatal nosocomial Legionnaires' disease : relevance of contamination of hospital water supply by temperature-dependent buoyancy-driven flow from spur pipes. *Epidemiol.Infect.* **112**, 513-525.
- Pelandakis M, Pernin P (2002) Use of Multiplex PCR and PCR Restriction Enzyme Analysis for Detection and Exploration of the Variability in the Free-Living Amoeba *Naegleria* in the Environment. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**, 2061-2065.

Pennanec X, Dufour A, Haras D, Réhel K (2010) A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 384-392.

Phares CR, Wangroongsarb P, Chantra S, Paveenkitiporn W, Tondella ML, Benson RF, Thacker WL, Fields BS, Moore MR, Fischer J, Dowell SF, Olsen SJ (2007) Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae* : 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. *Clin Infect.Dis* **45**, e147-e155.

Philippe C, Blech MF, Hartemann P (2006) Multiplication intra-amibienne de *Legionella pneumophila* et rôle potentiel des amibes dans la transmission de la légionellose. *MÃ©decine et Maladies Infectieuses* **36**, 196-200.

Pilcher KE, Gaudet P, Fey P, Kowal AS, Chisholm RL (2007a) A general purpose method for extracting RNA from Dictyostelium cells. *Nat.Protocols* **2**, 1329-1332.

Pilcher KE, Fey P, Gaudet P, Kowal AS, Chisholm RL (2007b) A reliable general purpose method for extracting genomic DNA from Dictyostelium cells. *Nat.Protocols* **2**, 1325-1328.

Pongratz A, Schwarzkopf A, Hahn H, Heesemann J, Karch H, Doll W (1994) [The effect of the pipe material of the drinking water system on the frequency of Legionella in a hospital]. *Zentralbl.Hyg Umweltmed.* **195**, 483-488.

Ragull S, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M (2007) Legionella pneumophila in Cooling Towers: Fluctuations in Counts, Determination of Genetic Variability by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Persistence of PFGE Patterns. *Appl.Environ.Microbiol.* **73**, 5382-5384.

Riedy MC, Muirhead KA, Jensen CP, Stewart CC (1991) Use of a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell populations. *Cytometry* **12**, 133-139.

Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Filion LG, Sattar SA (2001) Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* **43**, 99-102.

Rittman BE (1989) Detachment from biofilms. In 'Structure and Functions of Biofilms.'. (Ed. Wiley) pp. 48-58. New York

Rodriguez-Zaragoza S (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**, 225-241.

Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 1585-1592.

Rogers J, Keevil CW (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of Legionella pneumophila within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**, 2326-2330.

Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**, 2421-2431.

Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183.

Rowbotham TJ (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal of Clinical Pathology* **36**, 978-986.

Rowbotham TJ (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr.J Med Sci* **22**, 678-689.

Rudi K, Moen B, Dromtorp SM, Holck AL (2005) Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 1018-1024.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Schuster FL (1979) Small amoebas and amoeboflagellates. In 'Biochemistry and physiology of protozoa'. (Ed. M.Levandowsky and S.H.Hutner) pp. 215-285. (Academic Press: New York)

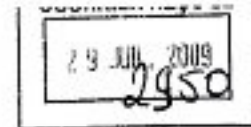
- Sethi S, Gore MT, Sethi KK (2007) Increased sensitivity of a direct fluorescent antibody test for *Legionella pneumophila* in bronchoalveolar lavage samples by immunomagnetic separation based on BioMags. *J Microbiol Methods* **70**, 328-335.
- Soejima T, Iida K, Qin T, Tanai H, Eki M, Oshida SI (2008) Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *J.Clin.Microbiol.* **46**, 2305-2313.
- Soejima T, Iida K-I, Qin T, Tanai H, Seki M, Takade A, Yoshida S-I (2007) Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiology and immunology* **51**, 763-775.
- Srikanth S, Berk SG (1993) Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3245-3249.
- States SJ, Conley LF, Ceraso M, Stephenson TE, Wolford RS, Wadowsky RM, McNamara AM, Yee RB (1985) Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 1149-1154.
- Steinberger RE, Holden PA (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5404-5410.
- Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**, 2047-2053.
- Steinert M, Hentschel U, Hacker J (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 149-162.
- Steinert M, Ockert G, Lück C, Hacker J (1998) Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralblatt für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* **288**, 331-342.
- Stout JE, Yu VL (2010) Environmental culturing for *Legionella* : Can we build a better mouse trap. *Am.I.Infect Control* **38**, 341-343.
- Stout JE, Yu VL, Best MG (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 221-228.
- Suida W, Gude H (1996) Determination of dissolved deoxyribonucleic acid concentration in lake water. *Aquatic Microbial Ecology* **11**, 193-202.
- Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Lã Y, vi[1] (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 950-963.
- Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G (2006) Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**, 2428-2438.
- Trudil D, Loomis L, Pabon R, Hasan JAK, Trudil CL (2000) Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples. *Biocatalysis* **41**, 27-29.
- Tyndall RL, Domingue EL (1982) Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl.Environ.Microbiol.* **44**, 954-959.
- Van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJH (2005) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Research* **39**, 2789-2798.
- Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C (2010) An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol.Adv.* **28**, 232-254.
- Von Wintzingerode F, Böcker S, Schlötelburg C, Norman NHL, Storm N, Jurinke C, Cantor CR, Göbel UB, Boom DD (2002) Base-Specific Fragmentation of Amplified 16S rRNA Genes Analyzed by Mass Spectrometry: A Tool for Rapid Bacterial Identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7039-7044.
- Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp NJ, West AJ, Kuchta JM, States SJ, Dowling JN, Yee RB (1991) Multiplication of *Legionella spp.* in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1950-1955.

Anses

- Wadowsky RM, Wolford R, McNamara AM, Yee RB (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 1197-1205.
- Wadowsky RM, Yee RB (1981) Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 768-772.
- Wellington N, Frost C, Marre R (2001) Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3985-3993.
- Wilks SA, Keevil CW (2006) Targeting Species-Specific Low-Affinity 16S rRNA Binding Sites by Using Peptide Nucleic Acids for Detection of *Legionellae* in Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5453-5462.
- Wolter A, Niessner R, Seidel M (2008) Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system. *Anal Chem* **80**, 5854-5863.
- Wurzburger RJ, Gupta R, Parnassa AP, Jain S, Wexler JA, Chu JL, Elkon KB, Blank RD (2003) Use of GC Clamps in DHPLC Mutation Scanning. *Clinical Medicine & Research* **1**, 111-118.
- Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**, 149-154.
- Yanez MA, Carrasco-Serrano C, Barbera VM, Catalan V (2005) 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.
- Yang G, Benson R, Pelish T, Brown E, Winchell JM, Fields B (2010) Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella species* by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clinical Microbiology & Infection* **16**, 255-261.
- Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S (2007) Integrated Real-Time PCR for Detection and Monitoring of *Legionella pneumophila* in Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1452-1456.
- Yong SF, Goh FN, Ngeow YF (2010) *Legionella species* and serogroups in Malaysian water cooling towers: identification by latex agglutination and PCR-DNA sequencing of isolates. *J Water Health* **8**, 92-100.
- Yoon CH, Cho JH, Oh HI, Kim MJ, Lee CW, Choi JW, Paek SH (2003) Development of a membrane strip immunosensor utilizing ruthenium as an electro-chemiluminescent signal generator. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 289-296.
- Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A (2002) 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.
- Zacheus OM, Martikainen PJ (1994) Occurrence of legionellae in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings. *Can J Microbiol* **40**, 993-999.

Annexes

Annexe 1 : Courrier de saisine de l'Afsset par la DGS et la DGPR sur les méthodes de détection des légionelles dans l'eau



Ministère de la Santé et des Sports

Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer

en charge des Technologies vertes et des Négociations sur le climat

Paris, le

Le Directeur général de la santé

Le Directeur général de la prévention des risques

à

Monsieur le Directeur général de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

OBJET : Détection des légionelles dans l'eau
P. J.: Courrier du Haut Conseil de la Santé Publique du 13 mai 2008

Actuellement la réglementation française concernant la prévention des risques liés aux légionelles préconise la réalisation d'analyses suivant la méthode par culture (Norme NF T 90-431, « Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés ») pour les réseaux d'eau chaude sanitaire et l'impose pour les tours aéroréfrigérantes (arrêté du 13 décembre 2004) ainsi que pour les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques dans les établissements thermaux (arrêté 19 juin 2000). C'est également systématiquement cette méthode qui est mise en œuvre au titre des contrôles sanitaires ou lors d'investigations épidémiologiques de cas de légionellose. Les résultats par cette méthode d'analyse s'expriment en Unité Formant Colonie par litre d'eau (UFC/L).

Toutefois cette méthode présente certains inconvénients :

- fournir des résultats définitifs au minimum 8 jours après la mise en culture (des résultats intermédiaires pouvant cependant être transmis au bout de 2 à 4 jours). Ce délai peut poser certains problèmes pour la gestion des installations concernées, notamment pour les circuits de refroidissement qui possèdent une réglementation plus contraignante que les réseaux d'eau chaude sanitaire, ou lors de la levée de mesures restrictives d'utilisation d'eau (ex : interdiction d'utilisation de douches dans l'attente de résultats négatifs...);
- permettre uniquement le dénombrement des bactéries viables et cultivables dans les échantillons d'eau. Les bactéries non cultivables ne sont donc pas comptabilisées par cette méthode mais leur pouvoir pathogène n'est, en l'état actuel des connaissances, pas clairement identifié.

Face à ces inconvénients, plusieurs autres techniques d'analyses sont aujourd'hui utilisées pour l'autosurveillance des installations par les exploitants. Parmi celles-ci, la technique de concentration et amplification génique basée sur une réaction en chaîne de polymérisation (PCR). Les résultats par cette méthode d'analyse s'expriment en Unité Génome par litre d'eau (UG/L). Cette technique possède une norme expérimentale (XP T 90-471, « Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) », publiée en avril 2005). Cette norme est actuellement en cours de révision à l'AFNOR et un projet de normalisation au niveau européen a été initié début 2008. La norme révisée définira l'utilisation d'un étalon primaire certifié servant à améliorer la reproductibilité des résultats et leur comparaison entre les différents laboratoires.

Cette méthode a pour principaux avantages de rendre des résultats quasi immédiats et de mesurer les bactéries cultivables et non cultivables. Cependant l'absence de distinction du caractère de cultivabilité et le fait que la méthode PCR comptabilise également les légionelles mortes posent le problème de détermination du réel potentiel pathogène de l'échantillon analysé. Cette méthode présente de plus de nombreuses limites concernant l'analyse des *Legionella species* (rendements faibles), les seuils pour la réglementation des circuits de refroidissement étant exprimés en *Legionella species*.

Il n'existe pas de corrélation directe entre ces deux méthodes, c'est-à-dire entre les résultats exprimés en UG/L et ceux obtenus par la culture exprimés en UFC/L. Aussi, les résultats analytiques obtenus par PCR ne permettent pas de conclure sur la conformité aux textes réglementaires.

Objet de la saisine :

Face à ces constats, il apparaît nécessaire de conduire une expertise pour établir les avantages et les inconvénients de cette technique d'analyse qu'est la PCR à la fois pour les réseaux d'eau chaude sanitaire et les eaux des circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes.

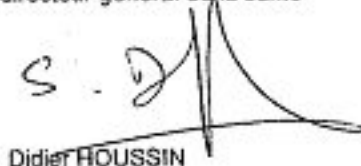
Le produit de cette expertise devra intégrer :

1. une description des méthodes analytiques connues pour la détection de légionelles dans l'eau (méthode par culture classique, méthode moléculaire (PCR), Chemscan, ATPmétrie, cytométrie, etc. Cette description aura notamment pour finalité d'identifier les questions auxquelles répondent les méthodes et leurs limites théoriques. Elle sera basée sur une recherche bibliographique ;
2. une étude de la pertinence (avantages et inconvénients) de la mise en œuvre de ces méthodes analytiques pour le contrôle sanitaire des eaux chaudes et le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes, en fonction de leurs besoins et contraintes respectives ;
3. si nécessaire, une identification d'essais expérimentaux permettant de vérifier ou d'infirmer les hypothèses avancées concernant la pertinence des techniques récentes, en se limitant à la description des objectifs de ces essais.

Les résultats de cette expertise sont attendus pour décembre 2009.

Compte tenu des positions très fortes prises par certains acteurs sur ce sujet, il serait souhaitable que les experts qui participeront à cette analyse soient choisis en fonction de leur neutralité vis à vis de la méthode PCR.

Le directeur général de la santé


Didier ROUSSIN

Le directeur général de la prévention des risques


Laurent MICHEL

Annexe 2 : Textes réglementaires et législatifs relatifs aux *Legionella*, en ligne sur le RESE (<http://rese.sante.gouv.fr/>), le 5 mars 2010.

Code de la santé publique

Articles L. 1335-2-1 à L. 1335-2-3

Article R. 1321-23

Décrets

Décret n° 2004-1331 du 1er décembre 2004 modifiant la nomenclature des installations classées (*ndlr : création de la rubrique 2921*)

Arrêtés

Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire

Arrêté du 21 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique

Arrêté du 22 juin 2006 modifiant l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation (*ndlr : concerne les TAR*)

Arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, de bureaux ou locaux recevant du public

Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous la rubrique n° 2921 Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air

Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921

Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales

Arrêté du 28 octobre 1993 modifiant l'arrêté du 2 août 1977 relatif aux règles techniques et de sécurité applicables aux installations de gaz combustible et d'hydrocarbures liquéfiés situées à l'intérieur des bâtiments d'habitation ou de leurs dépendances

Arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, de bureaux ou locaux recevant du public (*modifié par l'arrêté du 30 novembre 2005*)

Circulaires, notes, ...

Note de service DGS/EA4/2009/281 du 9 septembre 2009 relative aux investigations à mener lors de la survenue d'un ou plusieurs cas de légionellose à proximité de certains centres nucléaires de production d'électricité

Note de service DGS/EA4/2009/167 du 19 juin 2009 relative à la désinfection des réseaux d'eau chaude sanitaire par injection de produits à base de peroxyde d'hydrogène et de sels d'argent

Circulaire DGS/EA4/2010/448 du 21 décembre 2010 relative aux missions des Agences régionales de santé dans la mise en œuvre de l'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Circulaire DGS/EA4/2010/289 du 27 juillet 2010 relative à la prévention des risques infectieux et notamment de la légionellose dans les bains à remous (spas) à usage collectif et recevant du public

Circulaire MEDAD/DPPR du 28 juin 2007 relative à la vigilance accrue en période d'été

Circulaire DGS/DEUS/2007/229 du 11 juin 2007 relative à la diffusion du questionnaire d'évaluation de l'utilisation du document "Le risque lié aux légionelles, Guide d'investigation et d'aide à la gestion", dans les services déconcentrés (DDASS, CIRE)

Circulaire interministérielle DGS/SD7A/DSC/DGUHC/DGE/DPPR/126 du 3 avril 2007 relative à la mise en œuvre de l'arrêté du 30 novembre 2005 modifiant l'arrêté du 23 juin 1978 relatif aux installations fixes destinées au chauffage et à l'alimentation en eau chaude sanitaire des bâtiments d'habitation, des locaux de travail ou des locaux recevant du public

Circulaire du 28 septembre 2006 relative aux mesures compensatoires en cas d'impossibilité technique ou économique de réaliser l'arrêt annuel de l'installation pour nettoyage et désinfection

Circulaire DGS/SD7A/398 du 12 septembre 2006 relative à la saisie dans la base de données informatique SISE-Eaux des analyses microbiologiques réalisées dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux des établissements thermaux (*Version : annexe 3 modifiée le 15 septembre 2006*)

Circulaire DGS/DPPR/DGSNR/DRT n° 2006/213 du 15 mai 2006 relative aux modalités d'organisation des services de l'Etat en cas de survenue de cas groupés de légionellose

Note d'information DGS/SD7A n° 2005/1628 du 15 décembre 2005 relative à l'abrogation de la circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose et actualisation de ses annexes

Circulaire du 8 décembre 2005 relative à l'application des arrêtés ministériels du 13 décembre 2004 relatifs aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (rubrique 2921)

Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/DGAS/SD2/2005/493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées

Circulaire DHOS/E4/DGS/SD7A/2005/417 du 9 septembre 2005 relative au guide technique sur l'eau dans les établissements de santé

Circulaire DGS/SD5C/SD7A/DESUS/2005/323 du 11 juillet 2005 relative à la diffusion du guide d'investigation et d'aide à la gestion d'un ou plusieurs cas de légionellose

Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/2005/286 du 20 juin 2005 relative au référentiel d'inspection des mesures de prévention des risques liés aux légionelles dans les établissements de santé

Note d'information DGS/SD7A n° 2005/315 du 3 mars 2005 relative aux évolutions en matière de méthodes d'analyse de légionelles dans les échantillons d'eau et l'interprétation de leurs résultats

Circulaire interministérielle DGS/DPPR/2004/413 du 6 août 2004 relative à la prévention du risque sanitaire lié aux légionelles dû aux tours aérorefrigérantes humides

Circulaire du 24 février 2004 relative au recensement des tours aérorefrigérantes humides dans le cadre de la prévention du risque sanitaire lié aux légionelles

Circulaire DHOS/E2/DGS/SD5C/2004/21 du 22 janvier 2004 relative au signalement des infections nosocomiales et à l'information des patients dans les établissements de santé

Circulaire DGS/SD7A n° 633 du 30 décembre 2003 relative à l'application des articles R. 1321-1 et suivants du code de la santé publique concernant les eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles

Circulaire MEDD du 16 décembre 2003 relative aux installations classées - vigilance vis-à-vis du risque de légionellose

Circulaire DGS/SD7A - DHOS/E4 - DPPR/SEI n° 2003/306 du 26 juin 2003 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les tours aérorefrigérantes des établissements de santé

Circulaire DGS/SD7A - DHOS/E4 n° 03/296 du 24 juin 2003 relative à l'enquête visant à évaluer l'application par les établissements de santé des mesures préconisées par la circulaire du 22 avril 2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

Circulaire DPPR du 24 avril 2003 relative aux installations classées - Tours aérorefrigérantes - Prévention de la légionellose

Lettre circulaire DGS/SD5B-n° 03/58 du 21 février 2003 relative à la procédure de gestion des alertes sanitaires associant les services déconcentrés, les CIRE(s), l'InVS et la DGS

Anses

Circulaire DGS n° 2002/273 du 2 mai 2002 relative à la diffusion du rapport du Conseil supérieur d'hygiène publique de France relatif à la gestion du risque lié aux légionelles

Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

Circulaire DGS/SD7A/2001/575 du 29 novembre 2001 relative à l'enquête sur le bilan de la mise en œuvre de l'arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales

Circulaire DGS/VS4/2000/336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux (*modifiée par circulaire du 29 novembre 2001*)

Circulaire DPPR/SEI/BAMET/PG/NA du 23 avril 1999 relative aux installations classées sous la rubrique 2920, comprenant des tours aéroréfrigérantes

Circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements à risque et dans celles des bâtiments recevant du public (*modifiée par les circulaires du 22 avril 2002 et du 28 octobre 2005*)

Circulaire DGS/VS2 n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose (*abrogée par la circulaire du 11 juillet 2005*)

Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose annexé à la circulaire DGS 97/311 et édité dans le cadre du BEH 20-22 / 1997

Annexe V : Mesure de lutte et de prévention au niveau des bains à remous ou des bains à jets (*version corrigée*) (*ndlr : erreur de titre sur le document en ligne sur le site de l'InVS*)

Circulaire DGS/PGE/IC n° 238 du 28 mars 1989 relative à la listériose et à la légionellose (*abrogée par circulaire du 24 avril 1997*)

Circulaire n° 538 TG 3 du 3 juillet 1974 relative à la prévention des accidents de brûlures par l'eau chaude sanitaire (*abrogée par circulaire du 22 avril 2002*)

Annexe 3 : Normes référencées dans le rapport

NF T90-431 (septembre 2003) - 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

XP T 90-471 (Avril 2006) - 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)

NF T 90-471 (Avril 2010) - 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)

NF T90-210 (juin 2009) - Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire

XP T90-465-1 (projet de norme expérimentale du 15 février 2010) - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques

XP T90-465-2 (projet de norme expérimentale du 15 février 2010) - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques - Partie 1 : Les techniques énumératives

NF ISO 8199 (2005) - Qualité de l'eau -- Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture

NF EN ISO 11731-2 (Juillet 2008) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella* - Partie 2 : Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries

NF EN ISO 16140 (Octobre 2003) - Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives

NF EN ISO 17994 (décembre 2004) - Qualité de l'eau - Critères pour établir l'équivalence entre les méthodes microbiologiques

ISO 19458:2006 (aout 2006) – Qualité de l'eau – Echantillonnage pour analyse microbiologique

ISO/TR 13843 : 2000 (juin 2000) - Qualité de l'eau -- Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques

FD ENV ISO 13843 (T90-460) (Octobre 2001) - Qualité de l'eau - Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques

FD T90-522 (fascicule de documentation du Juillet 2006) – Qualité de l'eau – Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux

Version 0 (26 septembre 2006) du 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) - Application à l'analyse microbiologique de l'eau

Version 0 (28 juillet 2008) du Protocole de validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence - Application à l'analyse microbiologique de l'eau

Annexe 4 : Réglementation et guides internationaux

Les éléments présentés dans cette annexe ont pour but de donner une image représentative des valeurs cibles préconisées dans les réglementations et guides internationaux pour la surveillance des tours aéroréfrigérantes. Cependant, la liste présentée n'est pas nécessairement exhaustive.

Tableau 11 : valeurs cibles de surveillance des tours aéroréfrigérantes préconisées par les réglementations ou les guides internationaux

Pays	Réglementation/Guide	Cibles dénombrement	Valeurs cibles
Allemagne	Guide 6022-3 de 2002 concernant les exigences en termes d'hygiène pour les systèmes d'air conditionné (section 4.3.10)	<i>Legionella</i>	Objectif / seuil d'action : 10 UFC/L
Australie	Norme intégrée dans la réglementation : "Air-handling and water systems of buildings, microbial control, AS/NZS 3666 Australian / New Zealand standards, Sydney" (2000)	<i>Legionella spp</i>	Objectif : LD Seuil d'action : 10 à 10 ⁶ UFC/l Pas de seuil d'arrêt
Espagne	Décret royal 865/2003 du 4 juillet établit les critères de santé et d'hygiène pour la prévention et le contrôle de la légionellose. annexe 4	<i>Legionella</i> , sous-entendu <i>spp</i> (ISO 11731 partie 1, 1998)	Seuil d'action 1 : 10 ² UFC/l Seuil d'action 2 : 10 ³ UFC/l Seuil d'arrêt : 10 ⁴ UFC/l
Finlande	Pas de réglementation nationale Application de l' <i>European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires Disease</i> (janvier 2005)	<i>Legionella spp</i>	Seuil d'action : 10 ³ UFC/l Pas de seuil d'arrêt
Norvège	Réglementation nationale associée à l'application de l' <i>European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires Disease</i> (janvier 2005)	<i>Legionella spp</i>	Seuil d'action : 10 ³ UFC/l Pas de seuil d'arrêt
Pays Bas	Décret (11/09/2003) modifiant la réglementation sur les conditions de travail (acte 1998, section 5 ; décret section 4.87)	<i>Legionella spp</i>	Aussi faible que possible
Royaume Uni	Guide de référence publié par le <i>Health Safety Executive</i> (HSE) intitulé : « <i>Approved code of practice and guidance Legionnaires disease, the control of legionella bacteria in water system</i> » (2004)	<i>L. pneumophila</i>	Objectif : < 10 ² UFC/l Seuil d'action : 10 ³ UFC/l
Suède	Pas de réglementation nationale Application de l' <i>European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires Disease</i> (janvier 2005)	<i>Legionella spp</i>	Seuil d'action : 10 ³ UFC/l Pas de seuil d'arrêt
Suisse	Le document « <i>Legionella</i> et légionellose » (2005), de l'Office fédéral de la santé publique (rubrique maladies transmissibles)	<i>Legionella spp</i>	Seuil d'action : 10 ³ UFC/l Seuil d'arrêt : 10 ⁴ UFC/l
USA	Guide édité par l' <i>Occupational Safety & Health Administration</i> (OSHA, 1999)	<i>L. pneumophila</i>	Seuils d'action : 10 ⁵ et 10 ⁶ UFC/l Pas de seuil d'arrêt

Annexe 5 : Exemples de courriers de sollicitation utilisés pour préparer les auditions menées par le groupe de travail "Détection des légionelles dans l'eau".

Courrier 1

Objet : Sollicitation pour une audition concernant les méthodes de dénombrement des légionelles dans l'eau

Monsieur,

A la demande des Ministères en charge de la santé et de l'environnement, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset), étudie actuellement la pertinence de différentes méthodes de détection des légionelles dans les eaux chaudes sanitaires et dans les tours aérorefrigérantes.

Vous avez déposé votre candidature pour participer au groupe de travail constitué par l'Afsset pour répondre à cette demande et nous vous en remercions. Bien que vous n'ayez pas été retenu en tant que membre de ce groupe de travail, la prise en compte de votre expérience et de vos compétences nous semble essentielle pour mener à bien notre réflexion.

Dans ce contexte, nous vous sollicitons donc pour une audition avec Messieurs et Cette audition sera conduite par le groupe de travail «Détection des légionelles dans l'eau» et se déroulera le : à partir de

Compte tenu d'un temps d'audition limité, nous souhaiterions nous concentrer plus particulièrement sur les points suivants :

- ☞ la liste des méthodes de détection des légionelles que vous utilisez ;
- ☞ les contextes dans lesquels ces méthodes sont utilisées (contextes réglementaires, gestion technique, types d'eau, ...) ;
- ☞ les informations que vous attendez de chacune de ces méthodes ;
- ☞ comment vous interprétez leurs résultats (méthodes, seuils,...) ;
- ☞ quels types de mesures peuvent découler de ces résultats (mesures de gestion techniques, sanitaires, ...).

Nous vous proposons de préparer une présentation très synthétique de 10 à 15 minutes spécifiquement sur les points que nous souhaitons aborder, suivie d'une discussion de 30 à 40 minutes.

Nous souhaiterions par ailleurs, une contribution écrite de votre part, qui regroupe les différents éléments que vous voudrez bien nous communiquer sur les points précités, en y précisant autant que possible des éléments sur lesquels nous ne passerons pas nécessairement beaucoup de temps pendant l'audition :

- ☞ performances des méthodes que vous évoquerez (performances théoriques et surtout performances observées) :
 - ▲ *justesse (faux positifs, faux négatifs),*
 - ▲ *fidélité (Reproductibilité : coefficient de variance),*
 - ▲ *sensibilité (rendement, limites de détection, limites de quantification en précisant les volumes d'échantillons),*
 - ▲ *spécificité (par rapport à Legionella et par rapport à L. pneumophila),*
 - ▲ *temps d'analyse (prélèvement, analyse et mise en forme des résultats),*
 - ▲ *éventuels autres paramètres de performance que vous utilisez pour caractériser ces méthodes d'analyse,*
- ☞ robustesse des méthodes utilisées (niveaux de compétence nécessaires à leur mise en œuvre, sensibilités aux conditions de mise en œuvre, ...)
- ☞ coût par analyse, en fonction du nombre d'analyses réalisées, en précisant les éléments pris en compte (matériel, réactifs, personnel...)

Anses

↳ résultats d'éventuelles comparaisons ou évaluations d'équivalence de différentes méthodes de détection des légionelles dans l'eau que vous auriez menées.

Nous n'attendons pas nécessairement cette contribution écrite avant l'audition, mais dans la mesure du possible, nous souhaiterions en disposer d'ici 2010.

Je vous prie de croire, Monsieur, à l'expression de mes salutations distinguées.

Courrier 2

Objet : Sollicitation pour une audition concernant les méthodes de dénombrement des légionelles dans l'eau

Monsieur,

A la demande des Ministères en charge de la santé et de l'environnement, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset), étudie actuellement la pertinence de différentes méthodes de détection des légionelles dans les eaux chaudes sanitaires et dans les tours aérorefrigérantes.

Vous avez déposé votre candidature pour participer au groupe de travail constitué par l'Afsset pour répondre à cette demande et nous vous en remercions. Bien que vous n'ayez pas été retenu en tant que membre de ce groupe de travail, la prise en compte de votre expérience et de vos compétences nous semble essentielle pour mener à bien notre réflexion.

Dans ce contexte, nous vous sollicitons donc pour une audition avec Messieurs et Cette audition sera conduite par le groupe de travail «Détection des légionelles dans l'eau» et se déroulera le : à partir de

Compte tenu d'un temps d'audition limité, nous souhaiterions nous concentrer plus particulièrement sur les points suivants :

- ☞ les méthodes de dénombrement des légionelles sur lesquelles portent les essais de comparaison inter laboratoire ;
- ☞ les contextes dans lesquels ces méthodes sont utilisées (contextes réglementaires, gestion technique, types d'eau, ...)
- ☞ les résultats de comparaison inter laboratoire menés sur ces méthodes ;
- ☞ l'interprétation et la signification de ces résultats.

Nous vous proposons de préparer une présentation très synthétique de 10 à 15 minutes spécifiquement sur les points que nous souhaitons aborder, suivie d'une discussion de 30 à 40 minutes.

Nous souhaiterions par ailleurs, une contribution écrite de votre part, qui regroupe les différents éléments que vous voudrez bien nous communiquer sur les points précités, en y précisant autant que possible des éléments sur lesquels nous ne passerons pas nécessairement beaucoup de temps pendant l'audition :

- ↳ performances des méthodes que vous évoquerez (performances théoriques et surtout performances observées) :
 - ↳ *justesse (faux positifs, faux négatifs),*
 - ↳ *fidélité (Reproductibilité : coefficient de variance),*
 - ↳ *sensibilité (rendement, limites de détection, limites de quantification en précisant les volumes d'échantillons),*
 - ↳ *spécificité (par rapport à Legionella et par rapport à L. pneumophila),*
 - ↳ *temps d'analyse (prélèvement, analyse et mise en forme des résultats),*
 - ↳ *éventuels autres paramètres de performance que vous utilisez pour caractériser ces méthodes d'analyse,*

Anses

- ↳ robustesse des méthodes utilisées (niveaux de compétence nécessaires à leur mise en œuvre, sensibilités aux conditions de mise en œuvre, ...) ;
- ↳ coût par analyse, en fonction du nombre d'analyses réalisées, en précisant les éléments pris en compte (matériel, réactifs, personnel...) ;
- ↳ résultats d'éventuelles comparaisons ou évaluations d'équivalence de différentes méthodes de détection des légionelles dans l'eau que vous auriez menées.

Nous n'attendons pas nécessairement cette contribution écrite avant l'audition, mais dans la mesure du possible, nous souhaiterions en disposer d'ici 2010.

Je vous prie de croire, Monsieur, à l'expression de mes salutations distinguées.

Annexe 6 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine.

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DECLARATION PUBLIQUE D'INTERETS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU CES « EAUX ET AGENTS BIOLOGIQUES » PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	Date de déclaration des intérêts*
Analyse Anses :		
ABSI	Rafik Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	8 septembre 2010
BALLET	Jean-Jacques (n'a pas participé aux travaux) Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	20 juin 2007
BERJEAUD	Jean-Marc VB : Co-directeur de thèse sur une bactériocine anti-légionelle (bourse CIFRE/Veolia) Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.	7 juillet 2010
BOUDENNE	Jean-Luc Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	7 février 2011
BRUGERE-PICOUX	Jeanne Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	3 septembre 2010

Anses

CABILLIC	Pierre-Jean Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	5 septembre 2010
CAMUS	Patrick Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	1 ^{er} septembre 2010
CREPPY	Edmond Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	10 septembre 2010
CUDENNEC	Christophe Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	30 aout 2010
DAGOT	Christophe Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	24 octobre 2010
DUKAN	Sam (n'a pas participé aux travaux) Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	25 novembre 2009
GEHANNO	Jean-François Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	13 juin 2010
GUT	Jean-Pierre <i>IP-SC</i> : Evaluation d'une trousse pour le dépistage de l'infection par le virus de l'hépatite C, pour le Laboratoire BIORAD, avec une rémunération de son organisme d'appartenance (CHU Strasbourg), 2003. Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.	27 octobre 2009
HILAIRE	Didier <i>SR-A</i> : Membre du groupe « décontamination » de l'OTAN depuis 1995. Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.	3 septembre 2010
HUMBERT	Jean-François Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	17 juillet 2010
LAKEL	Abdel Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	26 septembre 2010
LE BACLE	Colette Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	23 septembre 2010
MARCHANDISE	Patrick Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	10 septembre 2010

Anses

MATHIEU Laurence	8 janvier 2011
Analyse Anses :	VB : Participation au programme de recherche « Caractérisation de l'exposition aux aérosols de légionnelles » financé par l'Ademe, l'Ansest, Veolia, la DGS et EDF. Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.
MOGUEDET Gérard	1 ^{er} octobre 2007
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
MOUNEYRAC Catherine	24 novembre 2010
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
POURCHER Anne-Marie	9 février 2011
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
RAUZY Sylvie	30 aout 2010
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
RUNIGO-MAGIS Renée	9 décembre 2009
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
SAUVANT-ROCHAT Marie-Pierre	6 septembre 2010
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
TANDEAU DE MARSAC Nicole	9 septembre 2010
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
TREMBLAY Michèle	9 février 2011
	Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.
TRIBOLLET Bernard	27 juillet 2010
Analyse Anses :	IP : Participation au groupe de travail Afsset relatif aux risques sanitaires liés aux proliférations de Legionella dans l'eau (2005 – 2007) Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.
VILLENA Isabelle	3 septembre 2010
Analyse Anses :	IP : Présidence CES Microbiologie de l'Anses (2009 à 2012) Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.

SYNTHESE DES DECLARATIONS PUBLIQUES D'INTERETS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM Analyse Anses :	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts*
ABASQ	Pierre Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	11 décembre 2009
ALLEGRA	Séverine Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	24 aout 2010
CHANTELOUP	Philippe Aucun lien déclaré	27 septembre 2010
HILAIRE	Didier (membre du CES « Évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques ») Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.	03 décembre 2009
JARRAUD	Sophie <i>IP-AC</i> : intervention pour l'Afssaps en mars 2010. <i>IP-CC</i> : Organisation du Colloque National <i>Legionella</i> et légionelloses, à Lyon, les 18 et 19 Octobre 2007, avec la participation de Genesystems, BIO-RAD, Disruptive Technologies, OXOID, Sanofi Aventis, AES Chemunex, Applied Biosystems, BioMerieux, GIRPI, Sanichem, Thetis environnement, Eurobio, Pall Medical, Trinity Biotech France, PFIZER, Biololab, ELYO Cylergie, Euromedex, GATC Biotech, GSK GlaxoSmithKline France, ROCHE DIAGNOSTICS, Wyett Lederle. VB : Responsable d'un projet d'Evaluation d'une technique de PCR en temps réel pour la détection de légionelles dans l'environnement (participation de GeneSystems au financement de l'équipe recherche) Responsable d'un projet de différenciation des <i>Legionella</i> vivantes et mortes par biologie moléculaire (participation de BioRad au financement de l'équipe recherche) Participe à un projet de recherche financé par l'Anses sur le typage des légionelles par la méthode MLVA (novembre 2010 à novembre 2012) Appel à recherché Afssset ciblée Légionelles 2007 : Rôle des amibes de l'environnement sur la colonisation, la prolifération et la virulence des bactéries du genre <i>Legionella</i> (principal investigateur : Michel Pelandakis)	24 février 2011

	<p>SR-A : Déclaration d'invention dans le cadre d'un projet piloté par l'Institut Pasteur concernant le typage moléculaire de <i>Legionella pneumophila</i> et <i>Legionella longbeachae</i>, avec identification simultanée de l'espèce et du sérotype (dépôt le 13/10/2010, aucune firme n'a acheté les droits d'exploitation de l'invention au 10/02/2011, pas de rémunération à cette date).</p> <p>Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.</p>	
LAWRENCE	<p>Christine</p> <p>IP : Formation de 2h pour Biorad en 2007</p> <p>VB : Projet de contrat de collaboration de recherche entre l'APHP et Genesystems (non signé au 10/02/2011)</p> <p>SR-A : Déclaration d'invention dans le cadre d'un projet piloté par l'Institut Pasteur concernant le typage moléculaire de <i>Legionella pneumophila</i> et <i>Legionella longbeachae</i>, avec identification simultanée de l'espèce et du sérotype (dépôt le 13/10/2010, aucune firme n'a acheté les droits d'exploitation de l'invention au 10/02/2011, pas de rémunération à cette date).</p> <p>Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.</p>	21 février 2011
LE CANN	<p>Pierre</p> <p>VB : Pilotage d'un projet de recherche financé par l'Anses sur le typage des légionelles par la méthode MLVA (novembre 2010 à novembre 2012)</p> <p>Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.</p>	8 septembre 2010
LECSO	<p>Marylin</p> <p>Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.</p>	14 décembre 2009
SARDE	<p>Claude-Olivier</p> <p>IP : travaux scientifique dans le cadre du Programme Européen Marie Curie "Vesicount", en collaboration avec Ascal</p> <p>Analyse Anses : Pas de risque de conflit d'intérêt par rapport à la saisine.</p>	13 septembre 2010
SQUINAZI	<p>Fabien</p> <p>Aucun lien déclaré en rapport avec la saisine.</p>	27 janvier 2010

* : à chaque début de réunion, il est demandé aux experts s'ils ont de nouveaux liens à déclarer depuis la dernière mise à jour de leur déclaration publique d'intérêt.





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr