Mise en place de la détection et quantification de legionella pneumophilia dans les eaux de tours aérorégrigérantes par amplification génique : intérêt vis-à-vis de la culture en présence de flore interférente

Élise Bénard

▶ **To cite this version:**

Élise Bénard. Mise en place de la détection et quantification de legionella pneumophilia dans les eaux de tours aérorégrigérantes par amplification génique : intérêt vis-à-vis de la culture en présence de flore interférente. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01381175

HAL Id: dumas-01381175

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01381175

Submitted on 14 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

Année 2016 N°

MEMOIRE

POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2016

Par Elise BENARD

Née le 13 novembre 1985 à Harfleur

MISE EN PLACE DE LA DETECTION ET QUANTIFICATION DE LEGIONELLA PNEUMOPHILA DANS LES EAUX DE TOURS AEROREFRIGERANTES PAR AMPLIFICATION GENIQUE : INTERET VIS-A-VIS DE LA CULTURE EN PRESENCE DE FLORE INTERFERENTE

Président de jury : Professeur Véronique MERLE

Directeur de thèse : Docteur Lise GOURICHON

Membres du jury : Professeur Martine PESTEL-CARON

Docteur Gilles GARGALA

Docteur Michèle NOUVELLON

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Stéphane MARRET

I - **MEDECINE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno **BACHY** *(surnombre jusque 01/11/15))*	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART** *(surnombre)*	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy **BONMARCHAND** (*surnombre)*	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie

Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe **CHASSAGNE**	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN** *(surnombre)*	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric **DI FIORE**	CB	Cancérologie
Mr Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean **DOUCET**	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
Mr Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
Mr Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel **GODIN** *(surnombre)*	HB	Néphrologie
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Philippe **GRISE** *(surnombre)*	HCN	Urologie
Mr Dominique **GUERROT**	HCN	Néphrologie
Mr Olivier **GUILLIN**	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie

Mr Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - Vénéréologie
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
Mr Eric **LEREBOURS**	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
Mr Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David **MALTETE**	HCN	Neurologie
Mr Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique **MERLE**	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan **PREVOST**	HCN	Endocrinologie

Mr Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
Mr Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mr Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy **BELLIEN**	HCN	Pharmacologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie

Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS**	HCN	Chirurgie Digestive
Mr Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Stéphane **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ**	HCN	Bactériologie
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
Mr Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre **GOULLE**	Toxicologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET**	Physiologie
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique **BOUCHER**	Pharmacologie
Mr Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie

Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Cécile **CORBIERE**	Biochimie
Mr Eric **DITTMAR**	Biophysique
Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR**	Chimie Organique
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**	Pharmacie officinale
Mr Jean-François **HOUIVET**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**	Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie **MARTINET**	Immunologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE**	Parasitologie
Mr François **HALLOUARD**	Galénique
Mme Caroline **LAUGEL**	Chimie organique
Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZ**	Biochimie
Mme Maïté **NIEPCERON**	Microbiologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
Mr Roland **CAPRON**	Biophysique
Mr Jean **CHASTANG**	Mathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacodynamie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mr François **ESTOUR**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS-MÉDECIN GÉNÉRALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL**	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET**	UFR	Médecine générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mme Lucille **PELLERIN**	UFR	Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN**	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul **MULDER** (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su **RUAN** (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079**)**
Mme Carine **CLEREN** (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline **GAILDRAT** (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas **GUEROUT** (phar)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric **PASQUET**	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle **TOURNIER** (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle	***HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME***
CB - Centre Henri Becquerel	***CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray***
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation	***SJ – Saint Julien Rouen***

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

Remerciements

A Madame le Professeur Véronique MERLE : vous me faites l'honneur d'avoir accepté la présidence de ma thèse. Je vous remercie pour l'attention portée à l'égard de ce travail. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON : vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre enseignement, la confiance que vous m'avez accordé au cours de ces années d'internat. Merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Gilles GARGALA : merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour vos conseils et enseignements pendant le stage de parasitologie. Veuillez trouvez-ici mes profonds remerciements.

A Lise : merci de m'avoir proposé ce travail et d'avoir accepté de m'encadrer. Je te remercie pour tous tes précieux conseils, ta disponibilité, ta gentillesse et ton soutien pour ce travail. Merci de m'avoir fait découvrir l'hygiène hospitalière. Je te prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour ton accompagnement, ta générosité et ton soutien.

A Madame le Docteur Michèle NOUVELLON. Je vous remercie de m'avoir accepté au sein de votre service au cours d'un semestre, et de m'avoir fait découvrir l'hygiène hospitalière. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Veuillez trouver dans ce travail mes sincères remerciements.

Au Docteur Christine CHEFSON-GIRAULT, merci de ton enseignement et de m'avoir fait découvrir l'hygiène hospitalière. Merci pour ta gentillesse et ton soutien pour ce projet.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'hygiène du CHU de Rouen : à Maud, Edwige, Fabienne, Patricia, Christine, Anthony et Joëlle, merci pour votre accueil, votre gentillesse, et pour l'aide apportée à ce projet.

Aux Docteurs Ludovic LEMEE, Noëlle FREBOURG, Sophie BOYER, Sandrine et Anaïs, merci de m'avoir transmis vos connaissances, merci de votre disponibilité et votre gentillesse.

A l'ensemble des techniciens de bactériologie, merci pour la formation, tous vos conseils, et pour tous les bons moments passés avec vous lors de cet internat.

A l'ensemble du personnel de l'IBC, merci pour votre accueil et votre gentillesse durant ces années d'internat.

A l'ensemble des biologistes du groupe hospitalier du Havre merci pour votre accueil, vos conseils et votre gentillesse. Merci de m'accueillir dans votre équipe à l'issue de mon internat.

A Elodie, Laure et Céline, merci pour votre soutien et vos conseils.

A mes parents et mon frère, merci pour votre amour et pour m'avoir soutenu et encouragé durant toutes ces années.

A mes cousines Manon et Claire, merci pour toutes ses années de soutien. Manon, je te souhaite beaucoup de courage et de la réussite pour ta PACES.

A mes grands-parents, merci pour le soutien durant toutes ses années.

A mes co-internes, Jennifer, Florian, Céline, Ismaël, Justine, Cédric, Benoît, Charline, Gaëtan, Valentin merci pour tous ces moments passés ensemble au laboratoire et en dehors. Merci pour votre bonne humeur communicative votre soutien et votre amitié.

A mes amis, merci pour tous le soutien que vous m'avez apporté durant ces années, merci Astrid, Giulia et Sophie pour tous les moments passés en votre compagnie et votre amitié.

Sommaire

Remerciements 13

Index des tableaux 21

Index des figures 22

Liste des abréviations 23

Introduction 25

1. Les légionelles 26

1.1. Taxonomie 26

1.2. Caractéristiques physiques et biochimiques 27

1.3. Croissance 28

1.4. Réservoir 29

2. La légionellose 30

2.1 Epidémiologie 30

2.2 Physiopathologie 31

2.3 Facteurs de risque 31

2.3.1. Facteurs de risque collectifs 31

2.3.2. Facteurs de risque individuels 32

2.4 Symptômes cliniques 32

2.5 Complications 33

2.6 Diagnostic biologique : 33

2.6.1. Recherche d'antigènes urinaires 33

2.6.2. Culture à partir de prélèvements respiratoires 34

2.6.3. Sérologie 36

2.6.4. Polymérase Chain Réaction (PCR) 36

2.6.5. Typage moléculaire 37
2.6.6. Méthode Nested-SBT 38
2.6.7. Co-culture amibienne 38
2.7 Traitement 38
2.7.1. Traitement curatif 38
2.7.2. Traitement prophylaxique....39
2.8 Prévention 39
2.9 Enquête autour d'un ou plusieurs cas de légionellose 40
2.9.1 Définitions 40
2.9.2 Systèmes de surveillance de la légionellose 41
2.9.2.1. Déclaration obligatoire 41
2.9.2.2. Déclaration des infections nosocomiales 43
2.9.2.3. Surveillance microbiologique par le CNR de Lyon (CNR-L). 43
2.9.2.4. Réseau européen des cas de légionellose liés aux voyages : Eldsnet....44
2.9.2.5. Autres partenaires impliqués dans la surveillance et les investigations....44
3. Tours aéroréfrigérantes. 45
3.1 Principe 45
3.2 Les différents types de systèmes aéroréfrigérants 45
3.2.1. TAR équipée d'un système de refroidissement par voie humide ou évaporatif..45
3.2.2. Les installations de refroidissement par voie sèche....48
3.2.3. Installations de refroidissement par voie sèche et humide : tours hybrides 48
3.2.4. Installations de refroidissement par eau en circuit ouvert 49
3.3 Facteurs favorisant le développement et la propagation des légionelles 49
3.3.1 Mécanisme de contamination des tours à partir du milieu extérieur....49
3.3.2 Le mode de fonctionnement 49

3.3.3 La conception 50
3.3.4 L'exploitation 51
3.3.5 Influence du climat et de la saison 51
3.4 Prévention 52
3.4.1 Systèmes limitant la prolifération des légionelles 52
3.4.2 Maintenance et entretien 52
3.5 Epidémies 52
4. La surveillance environnementale 55
4.1. Réglementation 56
4.1.1. Eaux chaudes sanitaires 56
4.1.2. Tours aéroréfrigérantes 57
4.2. Analyses environnementales 59
4.2.1. Norme NF EN ISO/CEI 17025 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais 59
4.2.2. Mise en culture des prélèvements d'eau 60
4.2.3. Détection et quantification par PCR 62
4.2.3.1. Principe 62
4.2.3.2. Mise en œuvre 63
4.2.4. Avantages et inconvénients de la recherche par culture et par PCR 64
4.2.5. Etudes comparatives entre la PCR et la culture. 66
Deuxième partie : travaux personnels : vérification de la méthode qPCR *L. pneumophila* dans les eaux de tours aéroréfrigérantes 68
1. Objectifs et principes 68
2. Matériels et méthode 69
2.1 Analyse de risque 69
2.2 Kit commercial 69

2.3 Equipements et locaux 69
2.4 Matrice 70
2.5 Préalables à la validation de méthode 70
2.6 Protocole de vérification du kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* sur les eaux de tours aéroréfrigérantes 70
2.6.1. Inclusivité/exclusivité : 71
2.6.2. Evaluation de la droite de calibrage 72
2.6.2.1. Réalisation 72
2.6.2.2. Analyse statistique 72
2.6.3. Vérification de la limite de quantification 74
2.6.3.1. Réalisation 74
2.6.3.2. Analyse statistique 75
2.6.4. Vérification de la limite de détection 75
2.6.5. Vérification du rendement et de la robustesse 76
2.6.5.1. Réalisation 76
2.6.5.2. Analyse statistique 77
2.7 Suivi des performances de la méthode iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* en routine
2.7.1. Mise en place de contrôles de qualité 78
2.7.2. Calcul de l'incertitude de mesure de la méthode 78
3. Résultats 79
3.1 Analyse de risque 79
3.2 Prérequis à la validation 85
3.2.1. Suivi métrologique des équipements 85
3.2.2. Rédaction du mode opératoire 85
3.2.3. Formation et habilitation 85

3.3 Vérification de la méthode 86
3.3.1. Inclusivité/exclusivité 86
3.3.2. Evaluation de la droite de calibrage 86
3.3.3. Vérification de la limite de quantification 88
3.3.4. Vérification de la limite de détection 89
3.3.5. Vérification du rendement et de la robustesse 90
3.4 Suivi et maîtrise des performances en routine 93
3.4.1 Réalisation de CIQ 93
3.4.2 Mise en place de l'EEQ 94
3.4.3 Calcul de l'incertitude de mesure de la méthode 94
3.5 Conclusions quant à la vérification de la méthode 95

Troisième partie : travaux personnels détection et quantification par qPCR et culture de *L. pneumophila* dans les eaux de tours aéroréfrigérantes en présence de flore interférente

1. Matériels et méthodes 96
1.1. Détermination de la flore 96
1.2. Détermination de la quantité de légionelles testée 97
1.3. Prélèvements d'eau des tours aéroréfrigérantes 97
1.4. Réalisation des suspensions bactériennes 97
1.5. Dopage des eaux prélevées 98
1.6. Mise en œuvre des essais 98
1.6.1. Réalisation de la PCR 98
1.6.2. Réalisation de la culture 98
1.6.3. Lecture des cultures 99
2. Résultats 99
2.1 Détection et quantification de *L. pneumophila* par qPCR 99

2.2 Recherche et dénombrement par mise en culture et concentration par centrifugation ... 100

2.3 Comparaison PCR/culture ... 103

Discussion et conclusion ... 104

Bibliographie ... 108

Annexes ... 122

Index des tableaux

Tableau 1 : espèces et sérogroupes du genre *Legionella* d'après « Baudard et al. Les légionelles. » Revue Francophone Des Laboratoires. 2014 ; (459), 57–68.
Tableau 2 : analyse de risque selon la méthode des 5 M
Tableau 3 : estimation de la droite de régression et de l'efficacité
Tableau 4 : évaluation de la performance de la régression linéaire
Tableau 5 : détermination de l'exactitude de la limite de quantification
Tableau 6 : vérification de la limite de détection
Tableau 7 : rendement de la méthode sur la matrice eau minérale avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 200000 UG/L
Tableau 8 : rendement de la méthode sur la matrice eau minérale avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 2000 UG/L
Tableau 9 : rendement de la méthode sur la matrice eau de tours aéroréfrigérantes avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 200000 UG/L
Tableau 10 : rendement de la méthode sur la matrice eau de tours aéroréfrigérantes avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 2000 UG/L
Tableau 11 : incertitude globale de la méthode
Tableau 12 : résultat de la PCR *L. pneumophila*
Tableau 13 : résultats de la mise en culture
Tableau 14 : résultats comparatifs de la PCR versus la culture

Index des figures

Figure 1 : aspect d'une colonie de légionelles à la loupe binoculaire d'après « http://www.microbes-edu.org/professionel/Legionella/legion.html »

Figure 2 : schéma de fonctionnement d'une tour ouverte. D'après « Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissements par dispersion d'eau dans un flux d'air »

Figure 3 : schéma d'un échangeur intermédiaire non accolé à la tour. D'après « Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissements par dispersion d'eau dans un flux d'air »

Figure 4 : schéma de fonctionnement d'une tour fermée. D'après « CETIAT, Ministère de l'écologie et du développement durable. Les différents procédés de refroidissement d'eau dans les installations industrielles et tertiaires guide technique »

Figure 5 : alignement des points $x'_1 m_1$ à $x'_p\, m_p$

Liste des abréviations

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARS : Agence Régionale de Santé

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extrat

BET : Bromure d'éthidium

CCLIN : Centre de Coordination de la Lutte des Infections Nosocomiales

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

Cofrac : Comité français d'accréditation

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

DDSCPP : Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations

DREAL : Direction Régionale de L'Environnement, de L'Aménagement et du Logement

Eldsnet : European Legionnaires Disease Surveillance Network

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EOHH : équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière

EWGLI : European working group on *Legionella* infections

H_2S : sulfure d'hydrogène

InVS : Institut de Veille Sanitaire

LLAPs : Legionella-like amoebal pathogens

L. Pneumophila : *Legionella pneumophila*

L. spp : *Legionella spp*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PCR : Polymérase Chain Réaction

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

P. spp : *Panthoa spp*

qPCR : PCR en temps réel

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymérase Chain Réaction

SBT : Sequence Based Typing

TAR : tour aéroréfrigérante

UG : unités génome

Introduction

La légionellose est une maladie respiratoire, possiblement létale, provoquée par une bactérie du genre *Legionella* qui se développe dans les milieux aquatiques naturels et artificiels. L'homme se contamine en inhalant des gouttelettes d'eau, contaminées par *Legionella pneumophila*, diffusées en aérosols. Les légionelles se développent préférentiellement dans l'eau chaude et peuvent résister à diverses conditions physiques et chimiques défavorables. Ainsi de nombreuses épidémies ont été décrites. Les principales sources de ces épidémies sont les réseaux intérieurs de distribution d'eau chaude sanitaire mal entretenus et des installations à risque comme les tours aéroréfrigérantes (TAR). La prévention de la légionellose constitue donc un enjeu majeur de santé publique.

Actuellement au laboratoire d'hygiène du CHU de Rouen, la recherche et le dénombrement des légionelles sont réalisés par la culture ; le résultat définitif étant obtenu au bout de huit à onze jours. D'autres bactéries vont se développer dans les mêmes niches écologiques que les légionelles, ainsi ces bactéries vont être présentes dans les prélèvements d'eau chaude sanitaire et de TAR. Celles-ci vont envahir les milieux de culture, ce qui empêche et retarde la détection de légionelles et donc la mise en place rapide d'actions correctives permettant d'éviter la prolifération et la diffusion massive de cette bactérie.

Au cours de l'année 2015, le laboratoire d'hygiène a été confronté pendant plusieurs mois à ce problème ce qui a empêché le rendu de résultats interprétables pour la recherche de *L. pneumophila* dans les TAR surveillées par le laboratoire. Il a donc été décidé de développer la recherche de légionelles par une méthode de biologie moléculaire (RT-PCR) permettant l'obtention d'un résultat en moins d'une journée. Après avoir décrit dans une première partie l'état des connaissances relatives aux légionelles, à la légionellose, aux tours aéroréfrigérantes, aux analyses environnementales et à la réglementation, une deuxième partie présentera le travail de validation de la détection et la quantification de *L. pneumophila* par PCR au sein du laboratoire d'hygiène en vue d'une utilisation en routine. Enfin, une troisième partie montrera que la présence de flore interférente peut empêcher la culture de légionelles alors que la PCR mise en œuvre sur le même échantillon permettrait de rendre un résultat.

Première partie : généralités

1. Les légionelles

1.1. Taxonomie

Elles appartiennent à la classe des Gamma-proteobacteria et à la famille des legionellaceae dont elle est le seul représentant.

Il existe environ 60 espèces du genre *Legionella* (tableau 1) (1). Certaines espèces sont réparties en 70 sérogroupes différents définis par la présence de certains antigènes O des lipopolysaccharides (1-2). Il existe 1 ou 2 sérogroupes par légionelle sauf pour *Legionella pneumophila* qui est constitué de 16 sérogroupes (3).

Le développement des techniques de typage moléculaire ont permis d'identifier des sous types pour certains sérogroupes de *L. pneumophila*. Par exemple pour *L. pneumophila* sérogroupe 1 il existe les sous types Philadelphia France/Allentown et Knoxville (3). *L. pneumophila* est également divisé en 3 sous espèces. La sous espèce *pneumophila* concerne le sous type Philadelphia et des souches de sérogroupes de 1 à 14. La sous espèce *fraseri* est composée de la souche Los Angeles-1 (sérogroupe 4) et des souches de sérogroupes 1, 4 et 5. Enfin la sous espèce *pascullei* regroupe les souches de sérogroupe 5 (1).

Espèce	Date de publication	Nbre de sérogroupes	Nb de sérogroupes impliqués dans une infection
L. pneumophila	1979	15	tous sauf sg 5 et 7
L. bozemanii	1980	2	2
L. dumoffii	1980	1	1
L. gormanii	1980	1	1
L. micdadei	1980	1	1
L. longbeachae	1981	2	2
L. jordanis	1982	1	1
L. wadsworthii	1982	1	1
L. oakridgensis	1983	1	1
L. feeleii	1984	2	2
L. sainthelensi	1984	2	2
L. anisa	1985	1	1
L. cherrii	1985	1	1
L. erythra	1985	2	1 (sg1)
L. hackeliae	1985	2	2
L. jamestowniensis	1985	1	0
L. maceachernii	1985	1	1
L. parisiensis	1985	1	1
L. rubilucens	1985	1	0
L. santicrucis	1985	1	0
L. spiritensis	1985	1	0
L. steigerwaltii	1985	1	0
L. israelensis	1986	1	0
L. birminghamensis	1987	1	1
L. brunensis	1988	1	0
L. cincinnatiensis	1988	1	1
L. moravica	1988	1	0
L. gratiana	1989	1	0
L. quinlivanii	1989	2	0
L. tucsonensis	1989	1	1
L. adelaidensis	1991	1	0
L. fairfieldensis	1991	1	0
L. lansingensis	1992	1	1
L. shakespearei	1992	1	0
L. geestiana	1993	1	0
L. londoniensis	1993	1	0
L. nautarum	1993	1	0
L. quateirensis	1993	1	0
L. worsleiensis	1993	1	0
L. genomospecies 1	1996	1	0
L. lytica (LLAP)	1996	1	0
L. waltersii	1996	1	0
L. taurinensis	1999	1	0
L. beliardensis	2001	1	0
L. drozanskii (LLAP)	2001	1	0
L. fallonii (LLAP)	2001	1	0
L. gresilensis	2001	1	0
L. rowbothamii (LLAP)	2001	1	0
L. busanensis	2003	1	?
L. drancourtii (LLAP)	2004	1	0
L. impletisoli	2007	1	?
L. yabuuchiae	2007	1	0
L. dresrenensis	2010	1	?
L. cardiaca	2012	1	?
L. nagasakiensis	2012	1	?

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes du genre *Legionella* d'après « Baudard et al. Les légionelles. » Revue Francophone Des Laboratoires. 2014 ; (459), 57–68. (1)

1.2. Caractéristiques physiques et biochimiques

Il s'agit d'un bacille gram négatif aérobie strict mesurant 0.3 à 0.9 µm de largeur et 2 à 5 µm de longueur (4). Certaines ont une longueur allant jusqu'à 20 µm (4). Elles sont non

fermentaires. Elles n'ont pas de capsule mais peuvent être mobiles (sauf *L. oakridgensis, L. nautarum* et *L. londinensis*) grâce à un ou plusieurs flagelles polaires ou subpolaires. Elles sont catalase positive (*sauf L. worsleinsis*) et oxydase négative (5).
Leur croissance est lente et nécessite du fer et de la L-cystéine. Certaines espèces présentent une fluorescence positive bleue ou rouge en présence de rayonnement ultraviolet. D'autres espèces ne présentent pas de fluorescence, c'est le cas de *L. pneumophila* (5).

1.3. Croissance

La majorité des légionelles sont des bactéries intracellulaires facultatives. Cependant elles peuvent se développer dans les amibes colonisant les eaux. Dans l'environnement, les bactéries sont normalement phagocytées par les amibes qui se nourrissent de ces organismes. Cependant certaines bactéries sont devenues résistantes aux amibes comme les légionelles qui sont capables de parasiter une douzaine d'espèces d'amibes (4). Les amibes les plus souvent parasitées sont notamment : *Acanthamoeba, Hartmannella* et *Naegleria* (4). Après avoir infecté le protozoaire, la bactérie va gagner le phagosome qui se transforme et s'entoure d'une membrane multicouche issue du réticulum endoplasmique, empêchant ainsi l'élimination des légionelles en retardant la fusion du phagosome au lysosome. Les légionelles vont ensuite initier leur multiplication et sont finalement libérées dans l'environnement par la cellule dans des vésicules ou sous forme libre (4-6). Elles peuvent aussi rester dans les kystes amibiens ce qui va leurs permettre de résister à des conditions physiques et chimiques défavorables à leur propagation (6). Certaines légionelles ont une multiplication intracellulaire obligatoire (4). Ce sont les LLAPs pour *Legionella-like amoebal pathogen*s dont seule la LLAPs 3 est décrite comme pathogène (4).

La croissance des légionelles est favorisée par différents facteurs physiques et chimiques **:**

- la température qui doit avoisiner les 35°C pour une croissance optimale. Elles peuvent se multiplier à une température située entre 25°C et 45°C et sont capables de survivre à une température comprise entre 6 et 66°C,
- le pH qui doit être compris entre 5.5 et 10,

- la présence de zinc et de fer, de L-cystéine,
- la stagnation de l'eau
- la présence de biofilm qui va les protéger des conditions environnementales défavorables
- la présence d'autres microorganismes notamment des bactéries (1, 7).

1.4. Réservoir

Il s'agit d'une bactérie ubiquitaire d'origine hydro-tellurique dont l'habitat naturel est constitué par les eaux douces (lacs, rivières, fleuves, nappes phréatiques), la terre humide et le compost (1)**.**

A partir du milieu naturel, la légionelle va coloniser des réservoirs artificiels tels que :

- les réseaux d'eaux chaudes surtout dans les collectivités (hôpitaux, hôtels et immeubles),
- les systèmes de climatisation,
- les tours aéroréfrigérantes,
- les bacs de réserve d'eau,
- les piscines, bains à remous stations thermales,
- les stations d'épurations,
- certains appareils produisant des aérosols (humidificateurs, brumisateurs unités dentaires, appareils respiratoires fonctionnant en mode humide),
- les fontaines et jeux décoratifs
- les stations de lavage automobile.

Cette colonisation intervient lorsque les conditions de son développement sont réunies. Outre la température, celle-ci est particulièrement favorisée par la présence de biofilm.
Le biofilm correspond à des entités complexes hétérogènes situées entre l'eau et les matériaux du réseau d'eau. Ces entités sont constituées d'éléments organiques et minéraux sur lesquels différentes bactéries ou virus vont se développer. Tout matériel stérile déposé dans de l'eau conduit immédiatement à l'attachement de cellules bactériennes, cet attachement étant plus ou

moins important en fonction du débit de l'eau (8). En effet plus le débit est faible, plus l'attachement sera important. La présence de micro-organismes entraine l'apparition de zones anaérobies permettant la production de sulfure d'hydrogène (H_2S). L'H_2S va faciliter la corrosion et la destruction des parois du réseau d'eau (8) constituant ainsi des niches permettant l'adhésion du biofilm et donnant des nutriments aux micro-organismes (8). La présence d'eau stagnante, de bras morts, la taille et la vétusté des circuits d'eau, le tartre ou encore la corrosion sont des éléments qui vont favoriser le développement du biofilm (1). Certains matériaux comme le polystyrène et le polypropylène vont également favoriser le biofilm (9). Le biofilm contient les nutriments et les micro-organismes notamment les amibes et protozoaires permettant aux légionelles d'y adhérer et de se développer (8). Le biofilm pourra à tout moment, au moindre choc se détacher et libérer les légionelles dans l'eau circulante (8). Ce biofilm va constituer un véritable « bouclier » face aux traitements utilisés pour la désinfection des circuits d'eaux (1).

2. La légionellose

2.1 Epidémiologie

Cette maladie est connue depuis 1976. Elle a été initialement découverte chez des vétérans de l'American Légion réunis en congrès à Philadelphie. Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987.

Environ 30 espèces ont été documentées comme étant potentiellement pathogènes. La principale espèce responsable de la légionellose est *L. pneumophila*, elle est responsable de 90% des cas de légionellose déclarés. Pour 64 à 90 % de ces cas il s'agit de *L. pneumophila* sérogroupe 1 (1). D'autres cas de légionellose dus à d'autres espèces ont été décrits chez des patients immunodéprimés. Ils sont principalement dus à *L. longbeachae* (3,9 % des cas) et *L. bozemanii* (2,4 % des cas) (7).

Le nombre de cas de légionellose déclaré en 2015 est de 1389 avec une moyenne de 115 cas par mois et un taux d'incidence de 2.1 pour 100000 habitants, le taux de létalité était de 9 % (10). On observe une augmentation du nombre de cas en août et septembre (plus de 200 cas par mois) et une diminution en février mars et avril (60 cas par mois) (10). Le développement

des légionelles étant favorisé par des températures comprises entre 25°C et 45°C, elles prolifèrent ainsi plus facilement en été entrainant une augmentation du nombre de cas de légionellose par rapport à l'hiver.

2.2 Physiopathologie

Le principal mode de contamination se fait par inhalation de gouttelettes d'eau contaminée par *L. pneumophila* diffusées en aérosol. Seules les petites gouttelettes vont être contaminantes puisque leur diamètre doit être inférieur ou égal à 5µm pour qu'elles puissent atteindre les alvéoles pulmonaires (11). Les légionelles vont infester les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales pulmonaires. Physiologiquement, les macrophages sains vont détruire les bactéries par un mécanisme de fusion du phagosome au lysosome. Dans les macrophages infestés, les légionelles vont se multiplier dans le phagosome, le pH neutre favorisant leur multiplication. Elles vont retarder ainsi la fusion du phagosome avec le lysosome (12). Pendant ce temps, elles vont se multiplier et devenir acido-résistantes afin de résister aux hydrolases acides du lysosome. Cela va entrainer la destruction du macrophage par un mécanisme d'apoptose ou de nécrose et libérer les légionelles (12).
La contamination par ingestion est discutée mais n'a pas été démontrée.
Il n'y a pas d'autres modes de contamination décrits à ce jour et notamment pas de contamination interhumaine.
La dose infectante chez l'homme est inconnue.

2.3 Facteurs de risque

2.3.1. Facteurs de risque collectifs

Tous les séjours dans les lieux où les réseaux d'eau sont collectifs et susceptibles d'être contaminés. Les endroits les plus à risque sont donc : les hôpitaux, les hôtels, les campings et les stations thermales. Les TAR qui sont susceptibles d'émettre dans l'atmosphère des nuages d'eau contaminés sont également un facteur de risque.

2.3.2. Facteurs de risque individuels

Les facteurs de risque individuels de développer une légionellose sont l'âge supérieur à 50 ans, l'immunodépression induite par traitement par corticothérapie ou anti-TNF, le tabac, le diabète, les pathologies pulmonaires et cardiaques chroniques. Les patients à haut risque sont les personnes atteintes par une hémopathie maligne, un cancer, une maladie du greffon contre l'hôte, les patients traités par immunosuppresseurs notamment dans le cadre de greffe d'organe ou par corticothérapie prolongée (11).

2.4 Symptômes cliniques

L'incubation dure en général 2 à 10 jours mais cela peut aller jusqu' à 18 jours (13). *L. pneumophila* peut être responsable de 3 tableaux cliniques différents qui sont la fièvre de Pontiac, la maladie du légionnaire et la forme extra pulmonaire.

Dans 95% des cas, l'infection est bénigne : il s'agit de la Fièvre de Pontiac (1) caractérisé par un syndrome pseudo-grippal passant souvent inaperçu avec une guérison spontanée en 2 à 5 jours (1).

La maladie du légionnaire correspond à une atteinte pulmonaire. Elle débute par un syndrome pseudo-grippal associé à une fièvre, des céphalées et une anorexie. Elle évolue ensuite vers une pneumonie aigue sévère avec dyspnée, cyanose et toux importante pouvant évoluer jusqu'à la défaillance multiviscérale. La radiologie pulmonaire est non spécifique puisqu'elle montre un syndrome alvéolaire ou alvéolo-interstitiel le plus souvent bilatéral (12). Cette forme est moins fréquente mais la mortalité est de 10 à 20 % chez l'immunocompétent et 40 à 80 % chez l'immunodéprimé non traité (1).

Le troisième tableau possible est très rare et prédomine chez les immunodéprimés. Il s'agit de la forme extra-pulmonaire avec atteinte cardiaque principale : myocardite, péricardite, endocardite sur valve prothétique (1). Il peut également y avoir des atteintes neurologiques, hématologiques, musculaires, et digestives (12).

2.5 Complications

Les complications généralement rencontrées sont :

- la thrombocytopénie
- l'hyperleucocytose ou leucopénie
- l'insuffisance rénale
- l'insuffisance hépatique
- l'insuffisance respiratoire
- l'insuffisance cardio-vasculaire
- l'état de choc avec CIVD, défaillance multi-viscérale
- décès 1 à 20% des cas (11)

2.6 Diagnostic biologique :

Le diagnostic biologique de la légionellose repose essentiellement sur la recherche de l'antigène de *L. pneumophila* sérogroupe 1 dans les urines. Cependant d'autres techniques peuvent être utilisées notamment pour le diagnostic des autres sérogroupes de *L. pneumophila* et *Legionella non pneumophila*.

2.6.1. Recherche d'antigènes urinaires

Il s'agit du dépistage le plus utilisé puisqu'il permet 96% des diagnostics en France. Il est réalisé dans les urines et ne nécessite pas de geste invasif.

Les antigènes détectés correspondent aux lipopolysaccharides de la membrane externe des légionnelles. Ces antigènes peuvent persister dans les liquides biologiques même si la bactérie n'est plus viable. Les kits commerciaux actuellement disponibles ne permettent de détecter que *L. pneumophila* sérogroupe 1. Ce test présente l'avantage d'être précoce puisque les antigènes peuvent être détectés 24 à 48 heures après le début d'apparition des symptômes. Ils persistent en moyenne 2 mois après le début du traitement.

La technique utilisée est une méthode immuno-enzymatique de type ELISA ou un test immunochromatographique sur membrane avec une révélation par colorimétrie ou par fluorescence. La méthode ELISA permet un diagnostic au bout de 4 heures tandis que le test immunochromatographique permet de rendre un résultat en 15 à 20 minutes. La sensibilité varie selon les tests de 56 % à 90 % et elle peut être augmentée en concentrant les urines par centrifugation, la spécificité est de 99% (14). En cas d'urine positive, il est recommandé de refaire le test après chauffage à 100°C pendant au moins 5 minutes afin d'éviter d'éventuels faux positifs.
Pour toute antigénurie positive, il est recommandé de mettre en culture des prélèvements respiratoires afin d'isoler la souche (5, 14).

2.6.2. Culture à partir de prélèvements respiratoires

Elle peut être réalisée à partir de tout type de prélèvement pulmonaire : expectoration, aspiration trachéale ou bronchique, lavage broncho-alvéolaire, liquide pleural, abcès pulmonaires ou biopsies pulmonaires. Cependant le meilleur prélèvement reste le lavage broncho-alvéolaire mais il s'agit d'un acte invasif qui nécessite une endoscopie et qui est donc contre-indiqué chez certains patients (5).

La mise en culture doit être réalisée sur des milieux spécifiques. Les milieux utilisés sont des milieux BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extrat) avec L-cystéine supplémenté avec 0.1% d' α-cétoglutarate qui contient du fer et du charbon et dont le pH est à 6.9. Ce milieu peut être associé à des antibiotiques comme dans le milieu BMPA qui est un milieu BCYE associé à du céfamandole, de la polymyxine B et l'anisomycine ou le milieu MWY qui contient en plus de la glycine, de la polymyxine B, de l'anisomycine et de la vancomycine. Le milieu GVPC (composé de glycine, vancomycine, polymyxine B et cyclohéximide) peut également être utilisé mais les légionelles provenant de prélèvements respiratoires étant moins fertiles, il n'est pas utilisé en première intention. Il est recommandé d'ensemencer au moins trois géloses par prélèvement : un milieu de recherche non sélectif BCYE car certaines espèces de légionelles peuvent être inhibées par la vancomycine et le céfamandole (*L. micdadei* par exemple*)*, un milieu avec antibiotique BMPA ou MWY ou à défaut GVPC et une gélose au

sang (14). Les milieux doivent être incubés à 35°C en aérobiose et en atmosphère humide pendant 10 jours. Un début de culture est obtenu au bout de trois jours minimum sur les milieux avec cystéine (5, 14). La culture est absente sur gélose au sang.

Les colonies suspectes sont blanches, grises, bleues, violettes avec un bord entier et présentant un aspect en verre dépoli à la loupe binoculaire (figure 1). L'identification de la souche peut être ensuite réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Cependant certaines espèces ne peuvent pas être identifiées et cette technique ne permet pas de différencier les sérogroupes de *L. pneumophila* (14). La séro-agglutination va permettre également l'identification séparée de *L. pneumophila* sérogroupe 1 et sérogroupe 2-14 ainsi que la détection de certaines espèces de *L. spp*.
Toute souche isolée dans un prélèvement biologique doit être envoyée au centre national de référence (CNR) à Lyon pour confirmer l'identification par amplification et séquençage. La sensibilité de la culture est de 25 à 75 % et la spécificité de 100% (14).

Il n'est pas recommandé d'étudier systématiquement in vitro la sensibilité aux antibiotiques. Cependant en cas d'évolution défavorable sous antibiothérapie présumée efficace, il pourra être réalisé une CMI ou une PCR spécifique sur la souche par le CNR (14).

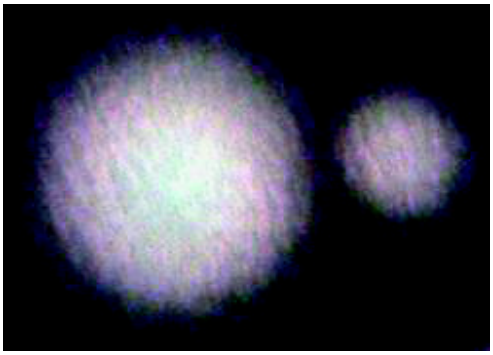


Figure 1 : aspect d'une colonie de légionelles à la loupe binoculaire d'après http://www.microbes-edu.org/professionel/Legionella/legion.html.

2.6.3. Sérologie

Elle permet un diagnostic tardif. Elle peut être utilisée en cas d'antigénurie, culture ou PCR négatives. Elle permet le diagnostic de *L. pneumophila* sérogroupe 1 à 10 et de quelques autres espèces de *Legionella*.

Les 2 techniques possibles sont l'ELISA et l'immunofluorescence indirecte. Les anticorps détectés sont dirigés contre les liposaccharides de la membrane externe de *Legionella*.

Cette chaîne polysaccharidique est caractéristique de chaque sérogroupe de *L. pneumophila*. Les IgM et IgG apparaissent en moyenne une à deux semaines après le début des symptômes, le pic étant atteint 4 à 5 semaines plus tard. Chez certains patients, cependant, les anticorps peuvent être détectés tardivement. Ainsi, seule la mise en évidence d'une multiplication par quatre du titre des anticorps entre deux prélèvements espacés de trois à six semaines permet de faire le diagnostic. La disparition des anticorps varie selon les patients entre deux à trois mois et douze à dix-huit mois. Il existe de nombreuses réactions croisées décrites avec les mycobactéries, les leptospires, *Chlamydiae*, *Mycoplasma*, *Citrobacter*, *Campylobacter* et *Coxiella burnettii*. Il existe également des réactions croisées entre les sérogroupes de *L. Pneumophila*, la plus fréquente étant entre le sérogroupe 1 et sérogroupe 6. La sensibilité varie de 40 à 75 % selon les kits et la spécificité est supérieure à 95% (5, 14).

2.6.4. Polymérase Chain Réaction (PCR)

Elle est réalisée sur prélèvement respiratoire en seconde intention en cas d'antigénurie négative. Différents types de PCR à temps réel peuvent être utilisés :

- la PCR spécifique : elle permet de détecter uniquement *L. pneumophila* par amplification du gène *mip (macrophage infectivity potentiator)*,
- la PCR 16S, 5S ou 5S-23S permet l'identification de l'ensemble des *Legionella.*

La sensibilité sur prélèvement respiratoire varie de 85 à 100% et la spécificité est proche de 100% (14). Il est possible également de la réaliser sur sang et urines mais la sensibilité est mauvaise puisqu'elle est de 30 à 50% pour le sang et 46 à 86 % pour l'urine (5).

Pour les cas de légionelloses sévères, la quantité d'ADN retrouvée dans les prélèvements respiratoires est corrélée à la sévérité de l'infection (5, 14, 16).

2.6.5. Typage moléculaire

Il est réalisé par le CNR et permet de comparer les souches cliniques aux souches environnementales. Il est réalisé sur toutes les souches cliniques envoyées (17).

Pour *L. pneumophila* sérogroupe 1, il existe 3 techniques possibles de typage moléculaire :

- le typage phénotypique (MAbs) : réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux (MAbs) permet le sous groupage de *L. pneumophila* sérogroupe 1 en neuf sous-groupes (France-Allentown, Knoxville, Philadelphia, Olda, Benidorm, Bellingham, Oxford, Heysham, Camperdown) (17).

- le "Sequence Based Typing" (SBT) qui est la méthode de référence européenne. Elle permet le séquençage de sept gènes dont deux gènes concernant le métabolisme de base et cinq gènes associés à la virulence. Le séquençage de ces gènes produit une combinaison de sept chiffres définissant leur profil allélique (ST) qui est spécifique pour une souche donnée. Les ST des différentes souches sont ensuite comparés pour déterminer un lien génétique entre les souches. Il existe une banque de références internationale permettant le recensement et la comparaison de différents ST (European working group on *Legionella* infections : EWGLI). Cette méthode a un pouvoir discriminant de 96% (17).

- l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE) qui est une méthode basée sur la fragmentation du génome complet à l'aide d'une enzyme de restriction. Après migration électrophorétique de ces fragments, les profils obtenus sont comparés entre eux, établissant ainsi un lien génétique ou non entre les souches.
  Il s'agit d'une technique longue qui nécessite un repiquage de la souche et 4 jours consécutifs de technique. Cette méthode a un très fort pouvoir discriminant : 98% pour *L. pneumophila* sérogroupe 1 (17).

L'utilisation de ces trois méthodes permet d'augmenter le pouvoir discriminant et de faciliter l'interprétation des résultats.
Pour les autres sérogroupes de *L. pneumophila*, seules les méthodes SBT et le PFGE peuvent être utilisées pour comparer les souches. Pour les autres espèces, la méthode PFGE peut être mise en œuvre mais elle n'a pas été développée pour toutes les espèces. Le pouvoir discriminant de ces méthodes pour les espèces autre que *L. pneumophila* est inconnu (3).

2.6.6. Méthode Nested-SBT

Il s'agit d'une technique SBT réalisée directement sur le prélèvement. Elle doit être effectuée en cas de culture négative lorsque l'antigénurie et/ou PCR sont positives. Elle est réalisée par le CNR (17).

2.6.7. Co-culture amibienne

Cette technique est mise en œuvre par le CNR, à partir du prélèvement, en cas de culture négative et PCR positive et/ou antigénurie positive ou lorsqu'il existe une forte suspicion clinique.
Elle permet d'isoler des souches alors que le prélèvement est contaminé par d'autres germes.
Elle nécessite une culture cellulaire d'amibes. Les amibes sont infectées avec le prélèvement et la culture est incubée à 30°C. Les cultures d'amibes sont ensuite observées quotidiennement de J3 à J5 puis les amibes infectées sont ensemencées sur des géloses BCYE et BMPA qui sont incubées à 35°C pendant 10 jours (18).

2.7 Traitement

2.7.1. Traitement curatif

Pour être efficace sur la maladie, les antibiotiques doivent avoir une bonne diffusion au sein du tissu respiratoire, être actif in vitro sur les légionelles et avoir une activité bactéricide

intracellulaire. Les antibiotiques recommandés et répondant à ces critères sont les fluoroquinolones, les macrolides et la rifampicine. Le choix de l'antibiotique va dépendre de la gravité de l'infection et des comorbidités associées.

Dans les formes non sévères, le traitement recommandé est un macrolide en monothérapie pendant huit à quatorze jours sauf pour l'azythromycine dont la durée de traitement est de cinq jours (19).

Dans les formes sévères, le traitement recommandé repose sur l'utilisation d'une fluoroquinolone en monothérapie ou en association avec un macrolide. La durée du traitement est de vingt et un jours (19).

Chez l'immunodéprimé la durée du traitement est de vingt et un jours ou de dix jours en cas de traitement par l'azithromycine. La rifampicine peut être prescrite en seconde intention en association avec un macrolide ou une fluoroquinolone (2). Les β lactamines sont inefficaces sur les légionelles.

2.7.2. Traitement prophylaxique

Il n'est pas recommandé à l'heure actuelle car il n'y a pas de preuve scientifique de son efficacité.

Il peut cependant être discuté pour des patients à risque élevé en cas de cas groupés de légionellose nosocomiale lors d'une réunion pluridisciplinaire faisant intervenir l'Equipe Opérationnelle d'Hygiène Hospitalière (EOHH), le Centre de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CCLIN), un représentant du comité des anti-infectieux et le coordonnateur de la gestion des risques de l'établissement de santé (19). Cette cellule prendra en compte l'exposition, l'état d'immunodépression des patients et les effets indésirables associés à l'antibiothérapie (19).

2.8 Prévention

Le tartre permettant aux légionelles de se développer, il est recommandé de réaliser dans les collectivités ou dans les logements individuels l'entretien des points d'eau.

Les boucles, les bras morts et circuits favorisant la stagnation de l'eau doivent être évités et des purges régulières doivent être effectuées en cas de non ou sous-utilisation des points d'eau.

Des contrôles de températures, des dosages de chlore et d'analyses microbiologiques sur les circuits d'eaux chaudes sanitaires et les TAR sont réalisés régulièrement comme préconisé par la règlementation selon respectivement l'arrêté du 01 février 2010 (20) et l'arrêté du 24 décembre 2013 (21).

Compte-tenu du risque sanitaire, les cas confirmés et probables de légionellose font l'objet d'une surveillance et d'investigations afin de repérer et maîtriser les sources de contaminations, d'éviter de nouveaux cas et de réduire les délais de prise en charge.

2.9 Enquête autour d'un ou plusieurs cas de légionellose

2.9.1 Définitions

Un cas confirmé est un patient présentant une pneumopathie aigue associée à au moins un de ces signes :

- isolement de *L. spp* dans un prélèvement clinique
- multiplication par 4 du titre des anticorps avec un deuxième titre minimum de 128
- antigénurie légionelle positive (3).

Un cas probable est un patient présentant une pneumopathie aigue associée à au moins un de ces signes :

- titre unique d'anticorps supérieur ou égal à 256,
- PCR positive (3).

Ces cas peuvent être d'origine nosocomial ou communautaire.

Une légionellose est considérée comme nosocomiale certaine si le patient a séjourné dans l'établissement de santé de façon continue pendant la période d'exposition soit environ

dix jours avant l'apparition des signes cliniques (3). En cas de séjour discontinu le cas sera considéré comme nosocomial probable (3).
La légionellose est également dite associée aux soins lorsqu'elle peut être associée à des soins réalisés en dehors d'un établissement de santé (22).

On parle de légionellose communautaire pour tout cas de légionellose dont on ne retrouve pas de séjour dans un établissement de santé pendant la période supposée d'exposition (3).

Enfin la notion de cas groupés est définie par au moins deux cas survenus dans un même espace géographique et un intervalle de temps susceptible d'impliquer une source commune de contamination. Les notions de temps et d'espace sont à déterminer en fonction de chaque situation. Le temps peut correspondre à des jours, semaines ou mois mais ne peut pas dépasser deux ans. L'espace géographique peut correspondre à un établissement, un quartier ou une ville. C'est l'agence régionale de santé (ARS) qui prend initialement la décision de déterminer s'il s'agit ou non de cas groupés (3).

2.9.2 Systèmes de surveillance de la légionellose

En France, cette surveillance repose sur plusieurs systèmes complémentaires.

2.9.2.1. Déclaration obligatoire

La déclaration de légionellose est obligatoire depuis 1987. Selon l'article R.3113-4 (23) du code de la santé publique, le signalement doit être réalisé sans délai par les médecins et les biologistes au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS et il va permettre la mise en place de mesures de prévention individuelles et collectives autour des cas. Selon l'article R3113-1 du code de la santé publique (24), le signalement est suivi d'une notification sur une fiche spécifique (« fiche de notification des cas de légionellose » - CERFA n°12202*02) (3). Cette notification qui intervient après le diagnostic, va permettre la réalisation d'une enquête par l'ARS afin de déterminer la source d'exposition et de rechercher d'autres cas éventuels

liés à cette source d'exposition et de prendre des mesures de contrôle environnemental appropriées. La fiche de notification validée est ensuite transmise à Santé publique France (par exemple à l'Institut de veille sanitaire (InVS)) (3).
Au niveau national ce système de surveillance a pour objectif de réaliser des statistiques afin de déterminer la fréquence, les caractéristiques épidémiologiques de cette maladie, et aussi d'établir des mesures de contrôles afin d'éviter des épidémies (3).

2.9.2.1.1. Investigation après un cas de légionellose

Une fois le diagnostic confirmé, l'ARS réalise l'enquête épidémiologique à l'aide d'un questionnaire standardisé afin de déterminer les sources d'exposition et la présence d'éventuels autres cas. Ces informations sont ensuite transmises à Santé Publique France (3).
Une enquête environnementale est également réalisée. Si l'exposition est nosocomiale, cette enquête est réalisée par l'équipe opérationnelle d'hygiène. En cas d'exposition communautaire, étant donné le nombre de sources potentielles, l'ARS décide si elle réalise ou non des prélèvements (3).

2.9.2.1.2. Investigation après plusieurs cas de légionellose

Cette investigation est réalisée par une cellule de coordination réunissant les services concernés (22). Elle est chargée de déterminer et de maîtriser les sources de contamination dans les plus brefs délais et d'informer la population.
Avant de débuter cette enquête, il est nécessaire de réaliser l'investigation relative à chaque cas.
L'enquête descriptive est ensuite réalisée sur la base des feuilles de déclaration obligatoire et de l'enquête réalisée pour chaque cas. Les données recueillies sont le sexe, l'âge, la date de début des signes, les dates et les lieux d'hospitalisation, le diagnostic clinique, radiologique et biologique, la date de réception de la déclaration obligatoire, les antécédents et l'évolution de l'état du patient, le domicile, les différents lieux visités quatorze jours avant le début des symptômes, les expositions à risque et les résultats de l'enquête environnementale (3).

Cette enquête va permettre de définir les critères d'inclusion et d'orienter les investigations secondaires.
Parallèlement à cette enquête, l'ARS réalise une recherche massive des cas auprès des professionnels et établissements de santé.
Une fois l'enquête descriptive et la recherche de cas réalisées, des hypothèses concernant l'origine de la contamination sont émises afin d'orienter les prélèvements environnementaux.
L'enquête environnementale est ensuite effectuée afin d'identifier la source probable de la contamination. La première étape consiste à récolter des informations sur les installations telles que leur localisation, leur nature ou encore les maintenances, la fréquence des nettoyages et des contrôles effectués. Des mesures immédiates d'arrêt peuvent être prises à ce niveau (3).
La deuxième étape consiste à contrôler les installations et à réaliser des prélèvements d'eaux. Les prélèvements sont ensuite mis en culture et les souches éventuellement retrouvées sont envoyées au CNR pour comparaison avec les souches cliniques (3).

2.9.2.2. Déclaration des infections nosocomiales

En application du décret n° 2001-671 du 26/07/2001 (25), toutes les infections nosocomiales doivent faire l'objet d'un signalement interne à l'établissement de santé. Celui-ci s'effectue auprès d'un référent désigné qui apprécie la nécessité ou non d'un signalement externe aux autorités sanitaires et au CCLIN selon un certain nombre de critères définis (caractère rare ou particulier de l'infection, décès, source environnementale, maladie à déclaration obligatoire dont l'origine nosocomiale peut être suspectée). Le CCLIN par le biais des antennes régionales (ARLIN) peut aider à l'investigation des cas et à la mise en œuvre de mesures préventives (26).

2.9.2.3. Surveillance microbiologique par le CNR de Lyon (CNR-L).

Toute souche responsable d'une légionellose doit être envoyée au CNR pour la réalisation d'un typage moléculaire (27). Les résultats sont transmis aux ARS et Santé publique France pour compléter les informations concernant la déclaration obligatoire (3).

Cette surveillance va permettre le signalement de souches présentant un même profil génomique, la confirmation de plusieurs cas groupés liés épidémiologiquement ou encore va permettre d'identifier la source d'exposition en comparant les souches cliniques aux souches environnementales.
Le CNR-L réalise également une souchothèque nationale afin d'étudier la distribution et l'évolution de *Legionella* et participe également au réseau européen Eldsnet (European Legionnaires Disease Surveillance Network) pour la recherche, l'échange et la comparaison de souches (27).

2.9.2.4. Réseau européen des cas de légionellose liés aux voyages : Eldsnet

La France participe à ce réseau depuis 1992 via Santé publique France (3). Santé publique France doit notifier à ce réseau tout cas de légionellose survenue à la suite d'un voyage réalisé dans les dix jours précédant le début des symptômes en mentionnant les établissements fréquentés et la durée du voyage (28). Les autorités nationales du pays sont ensuite informées. Pour les cas isolés c'est la réglementation en vigueur dans le pays qui s'applique. Par contre, pour les cas groupés, la procédure « Cluster Eldsnet » est appliquée (28) : une enquête environnementale doit être réalisée avec obligation de résultats. Si les résultats ne sont pas satisfaisants dans un délai de six semaines suivant la notification par le réseau européen, le nom de l'établissement est affiché sur le site internet du réseau jusqu'à obtention de résultats satisfaisants.
Si le pays concerné est en dehors de l'Europe, l'OMS est informée et est chargée d'informer le pays concerné (3).

2.9.2.5. Autres partenaires impliqués dans la surveillance et les investigations

En fonction des sources suspectées, d'autres partenaires peuvent être impliqués dans la surveillance. Les services de l'inspection des installations classées en région (la Direction Régionale de L'Environnement, de L'Aménagement et du Logement (DREAL), Direction Départementale de la Protection des Populations (DDPP) et Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations (DDSCPP)) qui sont chargés de la

surveillance des TAR. Ce type d'installation est, en effet, considéré comme particulièrement à risque vis-à-vis de la diffusion dans l'atmosphère.

3. Tours aéroréfrigérantes.

3.1 Principe

Les TAR sont des installations de refroidissement qui sont utilisées pour refroidir des eaux réchauffées par une source d'énergie afin d'être réutilisées. Les eaux chaudes à refroidir sont mises en contact avec de l'air. Il se produit alors un échange thermique de l'eau vers l'air par évaporation, conduction ou convection (29).

Les TAR sont utilisées dans les industries produisant de la chaleur à partir de corps chauds (sidérurgie, plasturgie et automobile), de la condensation (centrales électriques, sucreries, distilleries) et dans les industries transformant de l'énergie mécanique en chaleur (gaz industriels, chimie, papeterie et verrerie) (30).
Elles sont également employées pour les installations frigorifiques (alimentaires, industrielles, commerciale) et de climatisation dans le secteur tertiaire (30).

3.2 Les différents types de systèmes aéroréfrigérants

Il existe quatre grands types de systèmes de refroidissement : les tours équipées d'un système de refroidissement par voie humide, par voie sèche, hybride et les installations de refroidissement par eau en circuit ouvert.

3.2.1. TAR équipée d'un système de refroidissement par voie humide ou évaporatif

Le transfert thermique de l'eau vers l'air se fait par évaporation (29). Les tours peuvent être ouvertes ou fermées (31).

Pour les tours ouvertes (figure 2), l'eau chaude du circuit à refroidir est directement projetée sur le corps d'échange de la tour à l'aide d'une rampe de dispersion. Une partie de l'eau s'évapore avec la chaleur tandis que l'autre partie est récupérée dans le bac de récupération et retourne vers le procédé à refroidir (31).

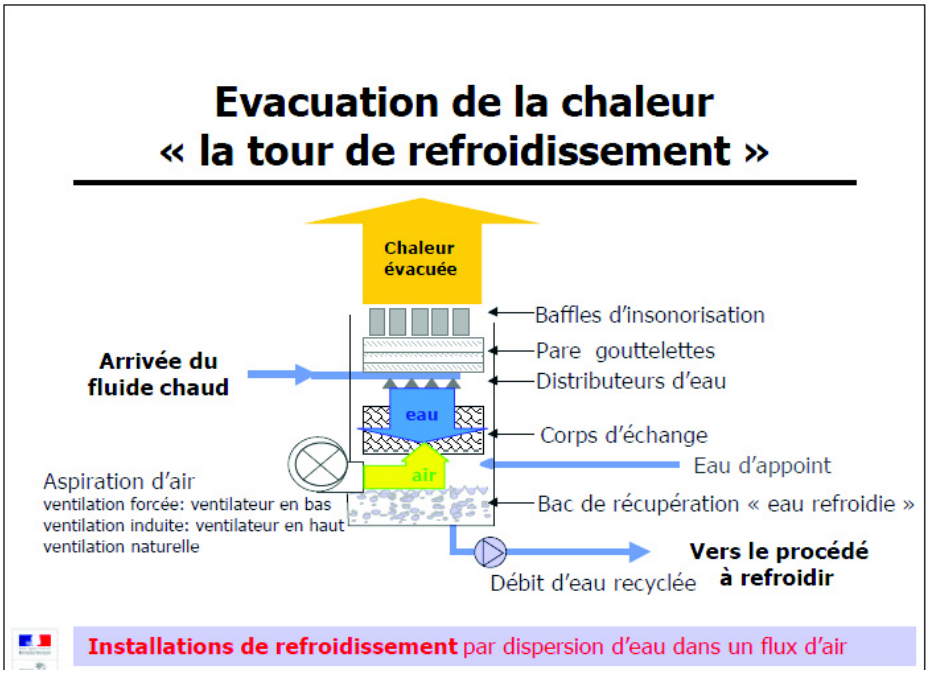


Figure 2 : Schéma de fonctionnement d'une tour ouverte. D'après « Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissements par dispersion d'eau dans un flux d'air » (31).

Pour les tours ouvertes et échangeur non accolé, le liquide à refroidir traverse d'abord un échangeur à plaques distant de la tour, l'eau est ensuite récupérée dans un circuit secondaire. L'eau de ce circuit secondaire est ensuite dispersée sur le corps d'échange de la tour, le principe de fonctionnement est ensuite le même que pour la tour ouverte (30) (figure 3).

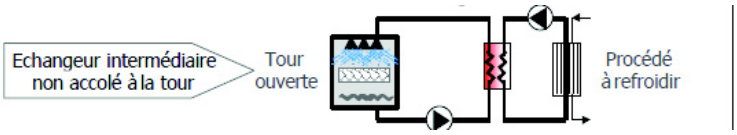


Figure 3 : schéma d'un échangeur intermédiaire non accolé à la tour. D'après « Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissements par dispersion d'eau dans un flux d'air » (31).

Les tours ouvertes avec échangeur accolé fonctionnent sur le même principe que pour l'échangeur non accolé sauf que l'échangeur est collé à la tour (30).

Enfin pour les tours fermées : l'eau à refroidir circule dans un échangeur tubulaire qui remplace le corps d'échange. Le refroidissement est assuré par dispersion sur l'échangeur tubulaire d'eau provenant d'un bassin de rétention. L'eau dispersée est ensuite évaporée (30) (figure n°4).

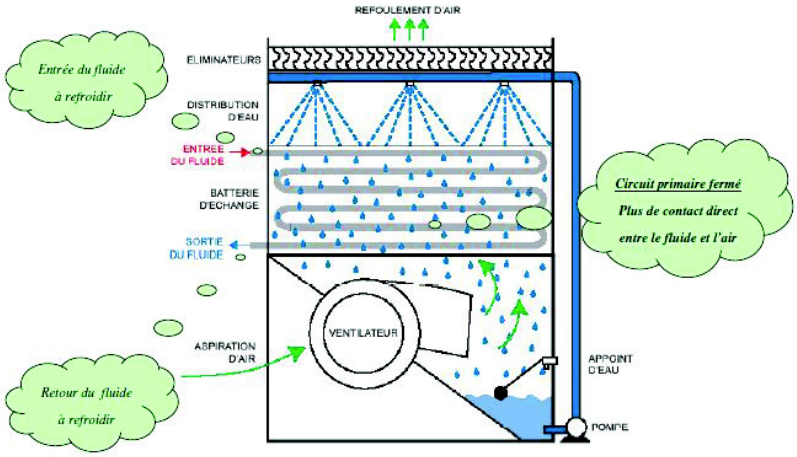


Figure 4 : schéma de fonctionnement d'une tour fermée. D'après « CETIAT, Ministère de l'écologie et du développement durable. Les différents procédés de refroidissement d'eau dans les installations industrielles et tertiaires guide technique » (30).

3.2.2. Les installations de refroidissement par voie sèche

Le fonctionnement de ces installations est assuré grâce à l'utilisation soit d'un aéroréfrigérateur sec, soit d'un groupe refroidisseur de liquides par condensation d'air qui vont permettre le transfert thermique de l'eau vers l'air par conduction ou convection, les fluides étant séparés par une paroi (29).

Dans le cas d'un aéroréfrigérant sec (dry cooler) : le liquide à refroidir circule dans des tubes contenant des échangeurs à ailettes et il est refroidi par de l'air diffusé par des ventilateurs et traversant l'échangeur. Ce système ne permet pas d'obtenir des températures aussi basses qu'un système évaporatif (30).

En ce qui concerne le groupe refroidisseur de liquides par condensation d'air, c'est le principe du cycle thermodynamique qui est utilisé. Le fluide à refroidir circule initialement dans l'évaporateur d'un groupe frigorifique où il est évaporé puis il circule dans un compresseur où il est retransformé en liquide, cette transformation libérant de la chaleur. La chaleur est ensuite évacuée au condenseur et directement à l'air ambiant. Ces systèmes de refroidissement sont utilisés pour la climatisation dans le tertiaire (30).

3.2.3. Installations de refroidissement par voie sèche et humide : tours hybrides

Ces systèmes peuvent être ouvert ou fermés.

Pour la tour hybride ouverte, le liquide à refroidir circule d'abord dans une batterie sèche située en haut de la tour de refroidissement. Si ce liquide n'est pas assez refroidi, il est alors dispersé sur un corps d'échange et s'évapore (30).

Dans le cas de la tour hybride fermée, il existe deux systèmes puisque la tour peut être composée soit d'une batterie sèche et d'un échangeur extérieur accolé à une surface de ruissellement soit d'une batterie sèche et d'un échangeur tubulaire interne à la tour. L'eau à

refroidir passe d'abord dans la batterie sèche puis dans l'échangeur accolé ou l'échangeur tubulaire (30).

3.2.4. Installations de refroidissement par eau en circuit ouvert

Ce système consiste à prélever l'eau de la nappe phréatique ou d'une rivière. Celle-ci circule ensuite dans un échangeur à plaques ou tubes et va permettre de refroidir le liquide circulant de l'autre côté de l'échangeur. Ce système est utilisé dans les centrales électriques (30).

3.3 Facteurs favorisant le développement et la propagation des légionelles

3.3.1 Mécanisme de contamination des tours à partir du milieu extérieur

Les TAR sont contaminées à partir de l'extérieur soit par l'air soit par l'eau d'appoint. La contamination est directe par apport de légionelles dans l'eau d'appoint et indirecte par apport de nutriments ou autres micro-organismes véhiculés par l'air ou l'eau (31). Les légionelles prolifèrent ensuite sur l'ensemble des surfaces qui sont en contact avec l'eau. Cette prolifération est favorisée par la formation de biofilm, et la présence de micro-organismes (amibes, algues et protozoaires). Les gouttelettes contenant les légionelles sont ensuite dispersées dans l'environnement et pourront contaminer des individus (31).

3.3.2 Le mode de fonctionnement

L'air sortant des TAR est appelé panache. Ce panache est composé de vapeur d'eau, de gouttelettes d'eau de recondensation et d'eau provenant du circuit à traiter en cas de système ouvert. Ces eaux sont susceptibles de contenir des légionelles qui vont être disséminées dans l'atmosphère (31).

Les installations constituant un risque de propagation sont donc essentiellement les tours ouvertes ou les tours hybrides ouvertes et dans une moindre mesure, les tours ouvertes avec échangeur accolé.
Les tours qui fonctionnent par voie sèche ou par utilisation des nappes phréatiques ne constituent pas un risque de propagation des légionelles (31).
Les éléments favorisant le développement des légionelles dans les circuits ouverts sont le volume de la tour et l'accès difficile à ses composants (30). En effet un volume important à traiter favorise le développement du biofilm et ainsi la multiplication des légionelles. De plus, l'accessibilité difficile aux rampes de dispersion, au corps d'échange, à l'échangeur, et aux canalisations complique le nettoyage et le détartrage, ce qui facilite également le développement de biofilm.

Les systèmes fermés ou à échangeurs accolés sont moins à risque de prolifération des légionelles car le liquide à traiter n'est pas directement en contact avec l'air. Pour les échangeurs accolés, le circuit d'eau à traiter est plus court ce qui limite la propagation des légionelles. Cependant, ces systèmes sont moins puissants et ont un coût plus important. De plus, comme les systèmes ouverts, le volume de la tour et l'accessibilité difficile à ses composants facilite le biofilm et la propagation des légionelles (30).

Pour les tours hybrides ouvertes ou fermées, le risque de propagation des légionelles est nul lorsqu'elles fonctionnent en mode sec (31). Lorsqu'elles fonctionnent en mode évaporatif, le risque est identique à celui d'un système ouvert pour les tours hybrides ouvertes, et à celui d'un système fermé pour les tours hybrides fermées (30).

3.3.3 La conception

Le risque de prolifération des légionelles est étroitement associé à la formation de biofilm.

L'hydraulique (présence de zones mortes, la faible vitesse de circulation de l'eau) va favoriser le développement de biofilm par dépôt des micro-organismes et des matières en suspension (31).

L'utilisation de certains matériaux comme le polystyrène, le polypropylène (9), le polychlorure de vinyle (PVC), et le polybutylène plastique (32) vont également favoriser l'attachement du biofilm.

Enfin l'élimination du biofilm est rendu d'autant plus difficile que l'accès aux surfaces nécessitant un nettoyage et un entretien régulier est limité (31).

3.3.4 L'exploitation

Les modalités d'exploitation des installations de refroidissement peuvent également favoriser la propagation des légionelles. En effet, les périodes d'arrêt/marche créent des zones mortes temporaires ce qui permet le détachement de biofilm et donc des légionelles par les forces hydrauliques lors de la remise en marche. Les chocs et travaux facilite également le détachement du biofilm (31).

Enfin le défaut de maintenance et d'entretien entrainant dépôt de tartre et de la corrosion, va permettre l'attachement et le développement du biofilm et des légionelles (1).

3.3.5 Influence du climat et de la saison

La majorité des épidémies liées à une TAR a eu lieu à la fin de l'été ou en automne (33). Ceci s'explique par une croissance plus rapide des légionelles pendant les périodes de chaleur et une dissémination facilitée durant les périodes de précipitations (37). L'augmentation du taux d'incidence de la légionellose est ainsi corrélé à l'augmentation de la température de la pression atmosphérique (34) et du volume des précipitations (35, 36).

3.4 Prévention

3.4.1 Systèmes limitant la prolifération des légionelles

Un certain nombre d'éléments de conception sont susceptibles de limiter la prolifération des légionelles.

Ainsi le pare gouttelettes, situé en haut de la tour, limite le risque de dispersion dans l'air de gouttelettes potentiellement infectées par les légionelles (30).

La rampe de dispersion quant à elle doit permettre une dispersion à des pressions faibles pour éviter les éclaboussements (30).

Les matériaux utilisés doivent être choisis en fonction de leur résistance à l'entartrage et à la corrosion et le bassin de rétention qui permet de récupérer l'eau non évaporée doit être fermé et non poreux (30).

Enfin pour les systèmes avec échangeur, celui-ci doit résister à l'entartrage, la corrosion et l'encrassement (30).

3.4.2 Maintenance et entretien

La réalisation de plans de maintenance et d'entretien est obligatoire. Ils consistent au nettoyage physique des surfaces accessibles et non accessibles par des jets à forte pression, circulation à contre-courant et à forte vitesse dans les éléments non démontables (échangeurs) et un nettoyage chimique par bio détergents de toutes les surfaces en contact avec l'eau (31).

Le nettoyage mécanique est réalisé sur l'installation ou une partie de l'installation à l'arrêt tandis que le nettoyage chimique peut être réalisé soit à l'arrêt (en complément d'une action mécanique) soit lorsque l'installation est en fonctionnement (31).

3.5 Epidémies

La présence de TAR est la cause de nombreuses épidémies de légionelloses.

La première épidémie mettant en cause une TAR a été décrite deux ans après la découverte de la maladie des légionnaires, en 1978 à New York. Il y a eu dix-sept cas confirmés et trois

décès parmi les personnes travaillant dans le quartier de Manhattan et dans un rayon de 11km de la TAR incriminée (38).

Dans les années 80 il y a eu 15 épidémies de légionellose décrites dans le monde, aux Etats-Unis, en Australie et en Europe (39 à 52). La majorité (14 épidémies) ont eu lieu en été ou en automne tandis que deux d'entre-elles (Manhattan et Stafford) ont eu lieu au printemps (42, 47). Le nombre de cas confirmés correspondant à des patients présentant une pneumonie aigue confirmée biologiquement variait de 3 (51) à 86 (42) avec une létalité variable de : 0% (42, 46, 51) à plus de 30% (44, 47). Les épidémies ayant le taux de mortalité le plus élevé correspondaient à des légionelloses nosocomiales dues à une tour adjacente ou une installation de refroidissement appartenant à un hôpital (39, 44, 46). La distance maximale entre la tour et les lieux visités par le patient était d'environ 3.2 km (49). Le facteur de risque le plus fréquemment retrouvé est le tabagisme actif (50, 51).
La surveillance et l'entretien des tours n'étant pas règlementés et du fait du peu de recommandations, le nettoyage et la désinfection préventifs des tours n'étaient pas toujours réalisés de façon efficace, voire étaient inexistants (49). De plus après une épidémie de légionellose ou un contrôle environnemental positif pour la recherche de légionelles, les mesures prises pour désinfecter les tours n'étaient pas toujours adéquates et parfois même la tour n'était pas arrêtée (40, 42, 46, 47). Ces mesures ont pu favoriser des épidémies, en effet, à Stafford, suite à des prélèvements mettant en évidence la présence de *L. pneumophila*, la tour a été désinfectée par chloration et trois mois après, une épidémie est tout de même survenue (47). A Burlington, deux épidémies ont été causées par la même TAR à 1 mois d'intervalle (40). Après la première épidémie l'installation incriminée a été uniquement désinfectée par chloration pendant trois semaines. Dix jours après l'arrêt de la désinfection, de nouveaux cas étaient décrits malgré la négativation des contrôles suite à la désinfection. Par la suite la tour a été de nouveau désinfectée avec du chlore puis arrêtée pour nettoyage et maintenance (40). Cela montre que l'arrêt de la tour est également nécessaire pour réaliser un nettoyage et une désinfection efficaces.

Dans les années 90 : seulement huit épidémies associées à une TAR ont été décrites dans la littérature (53 à 60). La plus importante épidémie a eu lieu dans un hôtel à Sydney en

1993 avec 38 cas confirmés (54). Le nombre de cas confirmés dans les autres épidémies étaient compris entre 11 et 34 (53, 55 à 60). Cinq épidémies ont eu lieu en été ou en automne (53, 54, 55, 57, 58), une autre a eu lieu en hiver (60) et une est survenue au printemps (59). Le taux de létalité était variable en fonction de la population touchée, le plus élevé étant de 27 % à Fall River en 1993 (53). Comme pour les autres épidémies, le tabagisme était le facteur de risque le plus retrouvé (53, 54, 55, 59, 60), les autres facteurs de risque impliqués étant les maladies cardiovasculaires et l'alcoolisme chronique (54). Une origine multifocale a été suspectée dans plusieurs épidémies puisque plusieurs tours adjacentes étaient contaminées par la même souche (53, 58, 59, 60). Cela fait suspecter une contamination possible entre les tours par des légionelles contenues dans l'air humide. A Fall River, l'enquête avait révélé que le nettoyage n'était pas régulièrement réalisé, et que le traitement par biocide était réalisé de façon intermittente (53). Cela montre bien l'importance de réaliser régulièrement, selon un plan défini le nettoyage et la désinfection des tours.

Dans les années 2000, 18 épidémies ou cas groupés ont été décrits (61 à 78) dont 6 épidémies majeures avec un nombre de cas supérieur à 100 (61, 63 à 66, 70). Le nombre de cas confirmés était très variable allant de 7 à 449 cas pour l'épidémie de Murcia (64, 71). Le taux de mortalité est diminué par rapport aux épidémies de 1978 à 1999 puisqu'il est inférieur à 10% pour la majorité des épidémies (61 à 65, 68, 69, 72, 74, 76 à 78). Cette diminution pourrait être expliquée par une identification des cas plus précoce du fait de la présence d'une réglementation à cette époque et donc une prise en charge des cas de légionellose plus rapide. A Rennes, dans l'Ontario, dans le Nord Pas de calais et à Cherokee, le taux de mortalité était compris entre 20 et 30 % (70, 71, 73, 75). Deux de ces épidémies (dans l'Ontario et à Cherokee) ont concerné des patients hospitalisés ce qui pouvait expliquer ces taux de mortalité plus élevés (71, 73). L'âge médian des cas confirmés était supérieur à 52 ans et le principal facteur individuel favorisant était le tabagisme puisqu'il est retrouvé dans 12 épidémies (70 à 72, 74, 75, 76, 69, 70, 72, 74, 76, 77). Les autres facteurs de risque retrouvés étaient le diabète (61, 62, 65, 66, 74, 77), les maladies cardiovasculaires (61, 62, 74), l'alcoolisme chronique (66, 67, 74, 77) et l'immunodépression (65, 74, 77).

La majorité des cas se situaient dans un rayon de moins de 3 km (63 à 65, 67, 69, 71, 74, 78). Cependant, il a été constaté que les aérosols pouvaient être transportés sur de plus longues

distances puisqu'une étude révélait en effet des cas situés dans un rayon de plus de 10 km (70).
Le caractère saisonnier de ces épidémies est également retrouvé puisque mis à part 2 épidémies (70, 75), celles-ci ont toutes eu lieu en été ou en automne. Dans plusieurs études, il est retrouvé l'influence de certaines conditions météorologiques. En effet, certaines épidémies ont eu lieu soit après des périodes de fortes chaleurs (62, 64, 67, 68, 77, 78) soit après des périodes de fortes humidités (62, 67, 74).
Un défaut d'entretien ou de désinfection des tours a été décrit avant certaines épidémies (62 à 66, 69, 74).

Depuis 2010, sept épidémies et cas groupés ont été décrites, (79 à 85), avec un nombre de cas compris entre 8 et 334 (82, 85). Le taux de létalité était inférieur à 10 % pour la majorité des épidémies (79, 80, 81, 83, 84, 85) sauf pour les cas groupés de légionellose à Meudon (37 %). Ce taux est expliqué par le fait que la tour était située à proximité d'une EHPAD, l'âge médian était de 91 ans (82). L'âge médian de l'ensemble des épidémies était supérieur à 56 ans. Le tabagisme apparaissait également comme le principal facteur favorisant (81, 83, 84). Toutes les épidémies sont survenues pendant l'été ou l'automne (80, 82, 83, 84, 85), à l'exception de celle d'Ulm (79) et celle d'Edinburgh (81) qui ont eu lieu respectivement en hiver et au printemps. Les cas confirmés se situaient dans un rayon allant de deux km à onze km (80, 82, 83, 85). A Meudon, au Portugal et en Allemagne, des phénomènes de fortes chaleurs associés à de fortes humidités avaient eu lieu avant les épidémies (82, 84, 85).

4. La surveillance environnementale

De nombreuses épidémies et cas de légionellose, dont la source était le réseau intérieur de distribution d'eau chaude sanitaire, sont également survenus, par exemple à l'hôpital George POMPIDOU, où celle-ci a été très médiatisée, le nombre de cas confirmés était alors de neuf avec quatre décès (86). Compte-tenu de leur très forte implication dans la survenue de cas de légionelloses, les réseaux intérieurs de distribution d'eau chaude sanitaire et les TAR font l'objet d'une surveillance réglementée vis à vis de la présence de légionelles.

4.1. Réglementation

4.1.1. Eaux chaudes sanitaires

Depuis l'arrêté du 1er février 2010 (20), les eaux chaudes sanitaires correspondant aux installations de production de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire alimentant les établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux, les établissements pénitentiaires, les hôtels et les résidences de tourisme, les campings et autres établissements recevant du public font l'objet d'une surveillance mise en œuvre par le responsable des installations. Cette surveillance repose sur des mesures de température régulières en fonction du type d'installation. Selon l'arrêté de novembre 2005 (87), les températures doivent être supérieures ou égale à 55°C à la production et de 50°C aux points d'usage. Cette surveillance inclut également des analyses de légionelles qui doivent être réalisées au moins une fois par an en différents points du réseau. La recherche et le dénombrement de *L. spp* et de *L. pneumophila* doivent être réalisés par culture selon les modalités mentionnées dans la norme NF T90-431 (88). Si les réseaux d'eau chaude ne sont pas utilisés pendant plusieurs semaines, des purges doivent être effectuées ainsi que des prélèvements dans les deux semaines qui précèdent l'accueil du public (20). Les résultats doivent être connus du directeur avant l'accueil du public.
La quantité de *L. pneumophila* doit être inférieure à 1000 UFC/L au niveau de tous les points d'usage à risque (20). Lorsque le seuil n'est pas respecté, le responsable des installations doit prendre sans délai des mesures correctives nécessaires.

Ces mesures correctives peuvent reposer sur la mise en œuvre d'un traitement thermique ou chimique (89).

Le traitement thermique curatif recommandé est le choc thermique à 70°C pendant 30 minutes (90). Ce traitement a un effet transitoire (91, 92, 93) puisqu'à l'arrêt du traitement, on observe une ré-augmentation des légionelles. Après plusieurs traitements thermiques répétés on peut même observer un phénomène de résistance de *L. pneumophila* (91, 93), ce traitement n'ayant plus aucun effet sur les légionelles. De plus les amibes résistant à des températures

supérieures à 70°C (94), elles permettent de protéger les légionelles de cette température élevée et sont sources de contamination du réseau. L'utilisation de ce type de traitement présente un certain nombre d'inconvénients comme le risque de brûlures profondes aux points d'usage et l'usure de certains matériaux ne résistant pas à cette température. Ces chocs peuvent également entrainer une mise en suspension de particules qui peuvent ensuite créer des colmatages voire des zones mortes dans lesquelles se réfugient les bactéries (89).

Concernant les traitements chimiques, les plus utilisés sont à base de chlore.
Un des traitements préventif recommandé est la chloration en continu avec un chlore libre à 1 mg/l (90).
Le traitement curatif recommandé est le choc chloré qui consiste à injecter soit 100mg/l de chlore libre pendant 1h ou 50mg/l pendant 12 h ou même 15mg/l pendant 24h (90).
Ce type de traitement présente également des inconvénients, puisque comme le traitement thermique, les amibes vont résister au chlore et protéger ainsi les légionelles (94) de l'action chimique du chlore**.** La chloration en choc va également faciliter la corrosion et donc favoriser le développement des bactéries (95).
Il est donc préférable d'agir en amont en mettant en œuvre les mesures nécessaires pour limiter durablement la contamination du réseau.

4.1.2. Tours aéroréfrigérantes

La surveillance des TAR est régie par l'arrêté du 14 décembre 2013 (21) qui précise que l'exploitant doit réaliser une analyse méthodique des risques (AMR) de prolifération et de dispersion des légionelles sur l'installation, dans le but d'identifier ces risques et de les limiter. Un plan d'entretien et un plan de surveillance doivent ensuite être définis pour la gestion de ce risque. L'analyse des risques doit être revue au moins une fois par an et en cas de changement de traitement ou modification de l'installation (21).

Le plan d'entretien définit les mesures préventives visant à détruire ou diminuer par des actions mécaniques ou chimiques le biofilm ainsi que le taux de légionelles. Une intervention de nettoyage doit être effectuée au moins une fois par an.

Un plan de surveillance doit en parallèle être établi pour s'assurer de l'efficacité des mesures préventives (21). Celui-ci précise également les mesures à mettre en œuvre en cas d'augmentation de la concentration en *L. pneumophila*.

Après un arrêt prolongé et un redémarrage, une analyse à la recherche de *L. pneumophila* doit être réalisée dans les 48h à une semaine après le redémarrage effectif.

Pour toute nouvelle installation ou changement de traitement, l'exploitant informe l'inspection des installations classées et démontre l'efficacité du traitement par des analyses hebdomadaires à la recherche de *L. pneumophila* pendant au moins deux mois et jusqu'à trois analyses consécutives inférieures à 1000 UFC/L.

Les analyses microbiologiques de recherche et dénombrement de *L. pneumophila* doivent être effectuées au moins une fois par mois ou tous les deux mois en fonction de la puissance de la TAR (96). La méthode utilisée pour ces analyses est la culture selon la norme NF T90-431 (88).

Le point de prélèvement doit être déterminé par l'exploitant et le prélèvement est réalisé par des personnes habilitées et formées. Si une injection choc de biocide a été effectuée, un délai de 48h doit être respecté avant de réaliser des prélèvements pour éviter que le biocide ne fausse le résultat des analyses.

Le laboratoire en charge des analyses doit être accrédité selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 (97) et doit rendre ses résultats sous accréditation.

Les résultats doivent être présentés selon la norme NF T90-431 (88) ou toute autre méthode reconnue par le ministère en charge des installations classées (21). Le rapport d'analyse doit fournir les renseignements sur les coordonnées de l'installation, la date, l'heure de prélèvement, la température de l'eau, la date et l'heure de réception de l'échantillon, la date et l'heure du début de l'analyse, le nom du préleveur, la référence et la localisation des points de prélèvements, l'aspect de l'eau prélevée, le pH, la conductivité et la turbidité de l'eau au point de prélèvement, ainsi que la nature et la concentration cible pour les produits de traitement utilisés dans l'installation (21).

La concentration d'alerte en *L. pneumophila* est de 1000 UFC/L. Une concentration supérieure ou égale à 100000 UFC/L impose l'arrêt immédiat de la tour et des mesures curatives et correctives. Lorsque la concentration est comprise entre 1000 UFC/L et 100000 UFC/L, le responsable doit également réaliser des actions correctives et curatives même si l'arrêt ne

s'impose pas (21). L'efficacité de ces mesures est évaluée par la réalisation de nouvelles analyses.

Le traitement curatif est réalisé avec des biocides oxydants (chlore ou brome) ou non oxydants utilisés en choc. Ceux-ci doivent être réalisés après nettoyage permettant l'élimination de biofilms par des procédés chimiques ou physiques (98). Le responsable des tours doit décider du traitement et s'assurer de son efficacité. Les biocides oxydants sont également utilisés en continu dans le cadre du traitement préventif de l'installation durant sa période de fonctionnement (98). Ils sont injectés en continu de manière à maintenir une concentration résiduelle suffisante pour maintenir le taux de *L. pneumophila* en dessous de 1000 UFC/L. Ils peuvent être associés à d'autres produits comme les inhibiteurs d'entartrage et de corrosion.

4.2. Analyses environnementales

La réglementation qu'il s'agisse des TAR ou des réseaux intérieurs de distribution d'eau chaude sanitaire impose l'accréditation selon la norme NF EN ISO/CEI 17025, des laboratoires réalisant les prélèvements et les analyses pour la recherche de légionelles. Cette accréditation, qui atteste de la compétence du laboratoire à réaliser les analyses relevant de sa portée, est délivrée par le Comité français d'accréditation (Cofrac), qui est l'unique instance nationale d'accréditation (99).

4.2.1. Norme NF EN ISO/CEI 17025 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais

Cette norme comporte les exigences auxquelles doivent satisfaire les laboratoires d'essais et d'étalonnage pour apporter la preuve qu'ils gèrent un système de management de la qualité et qu'ils sont techniquement compétents et capables de produire des résultats techniquement valides (97). Elle couvre les essais et/ou les étalonnages effectués au moyen de méthodes normalisées ou non, ou grâce à des méthodes développées par le laboratoire. Il

existe deux normes pour la recherche de légionelles dans les eaux : la norme NF T90-431 (88) qui concerne la culture la norme NF T90-471 (100) pour la PCR.

4.2.2. Mise en culture des prélèvements d'eau

La méthode de recherche et dénombrement par mise en culture est décrite dans la norme NF T90-431 : « 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 ». Il s'agit en France de la méthode de référence pour tout type d'eau.

La norme NF T90-431 établit des règles pour la réalisation des phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques de la mise en culture des eaux pour la recherche et le dénombrement de *Legionella*. La dernière version applicable date de novembre 2014 (88).

Elle est applicable pour les eaux propres correspondant aux eaux destinées à la consommation humaine comme les piscines, les eaux thermales, les eaux chaudes sanitaires. Elle est également applicable aux eaux sales telles que les eaux de TAR, les eaux industrielles ou les eaux de surface.

Les prélèvements doivent être effectués dans des récipients stériles et contenant du thiosulfate pour les eaux traitées par du chlore, du brome ou de l'ozone afin de neutraliser les oxydants qui pourraient inhiber le développement des légionelles (88).

Le principe de la méthode repose sur un ensemencement direct et après concentration des échantillons sur gélose GVPC. Pour les eaux propres, l'étape de concentration est réalisée par filtration sur une membrane en nitrate ou esters de cellulose qui est ensuite déposée sur la gélose GVPC. Les eaux sales, quant à elles, sont concentrées par centrifugation ou filtration sur membrane en polycarbonate, la membrane sera ensuite déposée dans un récipient contenant de l'eau purifiée constituant le concentrât. Le concentrât obtenu est ensuite ensemencé directement sur gélose GVPC puis après traitement thermique à 50 +/- 1°C, traitement acide (pH =2) et traitement associé acide et thermique.

Les géloses sont ensuite incubées à 36 +/- 2°C dans une enceinte thermostatée pendant 8 à 11 jours.
Les géloses doivent être ensuite examinées au bout de 3 à 4 jours et au minimum à trois reprises jusqu'à la fin de la durée d'incubation.
Les colonies suspectes sont blanches, grises, bleues, ou violettes avec un bord entier et présentent un aspect en verre dépoli à la loupe binoculaire et un contour de couleur variable. Sur la membrane ces colonies sont généralement plus petites et plus bombées mais gardent les mêmes caractéristiques.
Les différents types de colonies suspectes doivent ensuite être distingués et dénombrés. Chaque type de colonies suspectes doit être repiqué sur gélose BCYE avec L-cystéine et sur gélose BCYE sans L-cystéine qui sont ensuite incubées à 36 +/- 2°C pendant 2 à 4 jours.
Les légionelles ayant besoin de cystéine pour se développer, la présence de colonies sur la gélose sans L-cystéine infirme la présence de légionelles.
Les colonies présentant un aspect caractéristique et ne se cultivant que sur gélose BCYE avec L-cystéine sont considérées comme étant des légionelles. *L. pneumophila* est ensuite suspectée en cas d'absence de fluorescence sous la lampe de Wood. L'identification de *L. pneumophila* est ensuite confirmée par immunofluorescence directe ou séro-agglutination.

L'immunofluorescence permet d'identifier *L. pneumophila* à partir d'une culture. Cette technique repose sur le principe de la réaction antigène anticorps : les anticorps marqués contenus dans le réactif vont se lier à une protéine de la membrane externe de *L. pneumophila*. *L. pneumophila* est ensuite identifié sous microscope à fluorescence ou il apparaît sous forme de bacille ou de coccobacille fluorescent vert-pomme. Tous les sérogroupes de *L. pneumophila* peuvent être détectés par cette technique. Une fluorescence faible peut être observée pour d'autres microorganismes comme *Staphylococcus aureus* et certains *lactobacillus* (101).

La technique d'agglutination au latex permet d'identifier à partir d'une culture *L. pneumophila* sérogroupe 1, sérogroupe 2-14 et de détecter d'autres légionelles (*L. longbeaehae, L. bozemanii, L. dumoffii, L. gormanii, L. jordanis, L. micdadei, L. anisa*) (5). Les anticorps dirigés contre les légionelles sont fixés sur des particules de latex. En présence

du sérogroupe présentant l'antigène correspondant à l'anticorps du réactif, il se produit une agglutination quasi immédiate des particules. Des réactions croisées sont décrites entre *L. pneumophila* sérogroupe 1 et sérogroupe 9 et entre le réactif test pour *L. spp* et d'autres *Legionella* (*L. parisiensis*, *L. sainthelensi*, *L. steigerwaltii*, *L. wadsworthii*, *L. santicrucis*, *L. tusconensis*, *L. gratiana*, *L. cincinatiensis*) (102).

4.2.3. Détection et quantification par PCR

L'utilisation de la PCR pour la recherche de légionelles est décrite dans la norme NF T90-471 : «Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *L. pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaine (qPCR)» (100).

Il s'agit d'une norme récente la première version date de 2010, la version actuellement en vigueur est celle de juin 2015.

Elle décrit les exigences à respecter pour la mise en œuvre des phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques de la PCR légionelles, ainsi que les différentes étapes à réaliser pour valider la méthode de la PCR.

4.2.3.1. Principe

La PCR en temps réel est une technique de biologie moléculaire qui consiste à amplifier une séquence d'ADN extrait, spécifique de *Legionella* ou *L. pneumophila*. Ces fragments sont ensuite détectés grâce à des sondes fluorescentes. La réaction de PCR nécessite des amorces, des sondes, une enzyme, la Taq DNA polymérase et des desoxynucléotides triphosphates (dNTPs). Les amorces vont reconnaitre la séquence à amplifier et s'hybrider à celle-ci. La Taq DNA polymérase utilise les amorces et les dNTPs pour allonger l'ADN et créer des copies appelées amplicons sur lesquels vont s'hybrider des sondes spécifiques marquées par un fluorochrome qui émet de la fluorescence uniquement après l'hybridation aux amplicons. Cette fluorescence est ensuite mesurée par le lecteur optique du thermocycleur (103). La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide des données de fluorescence qui sont

collectées à chaque cycle de PCR et qui représentent la quantité de produits amplifiés à l'instant T. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine (ADN de *L. spp* ou *L. pneumophila*) moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point défini comme le Ct (cycle threshold ou cycle seuil) apparait en début de phase exponentielle (103). Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est par conséquent pas impacté par les éléments limitants identifiés lors de la phase de plateau, c'est pourquoi ce type de PCR est particulièrement précis et reproductible.

4.2.3.2. Mise en œuvre

Comme pour la culture, les prélèvements doivent être réalisés dans des récipients stériles et contenant du thiosulfate pour les eaux traitées par des biocides oxydants.
Afin de détecter et quantifier les légionelles par cette technique, plusieurs étapes analytiques sont nécessaires à savoir la concentration, l'extraction et l'amplification.

L'étape de concentration consiste à filtrer l'eau à tester sur une membrane en polycarbonate. Seules les membranes en polycarbonate ou dérivés peuvent être utilisées car elles ont une faible capacité d'absorption des protéines et de l'ADN qui reste ainsi sur la membrane. Cette membrane est ensuite pliée et placée dans un cryotube contenant le réactif de lyse.

Lors de l'extraction, la lyse des légionelles est réalisée par choc thermique et en milieu alcalin par incubation des cryotubes pendant 15 minutes à 95 +/- 5°C dans un bain marie. La lyse va permettre la libération de l'ADN des légionelles.

Après purification, l'ADN récupéré est ensuite amplifié grâce aux sondes et à la solution d'amplification contenant la Taq, les amorces et les dNTPs qui vont être déposés dans chaque puit de la plaque de PCR. Les sondes et la solution d'amplification sont spécifiques à *L. pneumophila* ou *L. spp*. Les extraits d'ADN, les standards permettant la réalisation de la gamme d'étalonnage et les contrôles sont ensuite déposés sur la plaque dans ces mêmes puits.

La plaque est ensuite déposée dans le thermocycleur pour y subir 49 cycles de températures répétés. Chaque cycle se divise en trois étapes :

- la dénaturation à une température de 95°C pendant 15 secondes qui va permettre la dissociation de l'ADN en simples brins,
- l'hybridation permettant l'hybridation des amorces sur la séquence à amplifier grâce au refroidissement jusqu'à 50 °C pendant 20 secondes,
- l'élongation à 72 °C pendant 30 secondes, la DNA polymérase à l'aide des dNTPs va synthétiser les brins complémentaires à partir des amorces hybridées sur les brins.

Les sondes marquées par un fluorochrome permettant de détecter et quantifier l'ADN, vont se fixer lors de la phase d'hybridation, l'intensité de la fluorescence augmente lors de la phase d'élongation (103). La fluorescence, proportionnelle à la quantité d'amplicons générés, est mesurée à chaque cycle (103). Le résultat obtenu est représenté sous forme de courbes sigmoïdes avec en ordonnée la fluorescence et en abscisse le nombre de cycles. Au cours des premiers cycles la fluorescence est très faible puis elle augmente de façon exponentielle pour finalement atteindre un plateau (103). La quantification est réalisée à partir du cycle seuil (Ct) de l'échantillon qui correspond au nombre de cycles où la fluorescence émise dépasse une valeur seuil supérieure au bruit de fond. La quantité d'ADN contenu dans les échantillons est quantifiée en comparant les Ct mesurés des échantillons aux Ct générés à partir de la gamme d'étalonnage.

4.2.4. Avantages et inconvénients de la recherche par culture et par PCR

La culture permet le dénombrement des légionelles viables (104, 105), mais également l'isolement de la souche pour identifier le sérogroupe et réaliser un typage afin de la comparer avec une souche clinique.

Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients avec notamment une très faible sensibilité puisque celle-ci est seulement de 10 à 30% (104). Ce résultat s'explique par la présence de flore interférente pouvant empêcher le développement de légionelles sur les milieux de culture (105). De plus, la recherche par mise en culture ne permet pas la mise en

évidence des légionelles viables mais non cultivables qui peuvent être pathogènes (104, 105) et peuvent de nouveau se multiplier par co-culture avec les amibes (106). Enfin compte tenu du temps nécessaire à la culture des légionelles, le résultat définitif est obtenu au bout de huit à onze jours ce qui retarde la mise en place d'actions curatives et correctives.

La PCR en temps réel présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide que la méthode conventionnelle avec la possibilité de rendre un résultat dans la journée, tout en permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. La PCR est également plus sensible que la culture (104) puisqu'elle permet la mise en évidence des légionelles viables mais non cultivables (104, 105).

Cependant la qPCR présente un certain nombre d'inconvénients comme l'absence d'identification précise pour *L. spp* et le défaut d'identification du sérogroupe pour *L. pneumophila*. De plus l'eau peut contenir des inhibiteurs de PCR tels que les minéraux, les ions, les microorganismes ou encore des débris (107) qui peuvent entraîner une sous-estimation de la quantité de légionelles voir entraîner des faux négatifs (105). Ce phénomène peut néanmoins être limité par la présence d'un contrôle interne dans la solution d'amplification de certains kits de PCR. Ce contrôle va en effet permettre de détecter d'éventuels phénomènes d'inhibition en étant amplifié en même temps que les fragments d'ADN mais en étant détecté par une sonde marquée d'un fluorochrome différent (108).

Un des principaux inconvénients de la PCR reste la détection de cellules mortes (104, 105, 109) susceptibles d'induire une surestimation du résultat. Cependant cet inconvénient peut être limité par l'utilisation d'agents intercalants tels que le bromure d'éthidium (BET) ou l'iodure de propidium. En effet, ces agents vont interagir avec l'ADN des cellules mortes ; ces cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, ces agents rentrent donc facilement dans le noyau (104). Dans un deuxième temps, l'amplification de ces cellules va être inhibée par traitement à la lumière (110). L'utilisation de ces agents diminue de façon significative la quantité de cellules mortes amplifiées (110, 111). Cependant ces deux agents ont des effets cytotoxiques sur les cellules viables (111, 112).

4.2.5. Etudes comparatives entre la PCR et la culture.

A ce jour, la méthode de référence reste la recherche et le dénombrement par mise en culture dans les eaux propres et eaux sales.

Cependant, plusieurs études ont été réalisées afin de comparer les résultats de la PCR en temps réel à ceux de la méthode par culture. Les premières études comparatives effectuées en 2001 (113, 114) ont montré que la PCR était plus sensible que la culture sauf pour une étude réalisée en 2003 ou 66 % des échantillons d'eau potable positifs se révélaient positifs en culture et négatifs en PCR. Cependant la quantité de légionelles sur ces échantillons était faible et probablement en dessous de la limite de détection pour la PCR (115).

Dans la majorité des études, parmi les échantillons positifs, le pourcentage d'échantillons positifs en PCR et négatifs en culture était compris entre 25 et 50 % (115 à 128). Pour trois études dont une portait sur plus de 100 échantillons d'eau potable (129), ce pourcentage était compris entre 10 et 20% (129, 130, 131), à l'inverse pour deux études le pourcentage d'échantillons positifs en PCR et négatifs en culture était supérieur à 60 % (125, 132). Selon le type d'eau testé ce pourcentage est donc variable mais il est en général plus élevé dans les TAR (128, 130) pouvant atteindre plus de 60 % des échantillons positifs (125). Ce pourcentage est diminué en dessous de 20 % lorsque l'iodure de propidium ou le bromure d'éthidium est utilisé en complément de la PCR (116, 131).
Le pourcentage d'échantillons positifs en culture et négatifs en PCR était en général inférieur à 10% (114, 116, 117, 122, 125, 126, 128, 129, 132) voire souvent nul (113, 116, 117, 119, 120, 124, 130).

En 2011, l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a réalisé une étude sur les différentes méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires et les TAR (7). A l'issue de ce travail, les deux méthodes recommandées sont la qPCR et la culture car ce sont les seules méthodes normalisées. Dans son rapport d'expertise l'ANSES préconise de laisser le choix au gestionnaire d'utiliser soit la méthode par la culture soit la méthode par PCR en fonction de

l'accessibilité de l'analyse et la présence ou non d'une flore interférente ou d'inhibiteurs. En cas d'urgence, il est néanmoins recommandé de réaliser la qPCR afin de rendre un résultat rapidement. Cependant, dans ce cas, il est nécessaire de mettre quelques prélèvements en culture afin d'isoler la souche et d'identifier le sérogroupe (7).

Ce rapport précise également la difficulté d'établir des valeurs cibles pour la PCR car les valeurs cibles recommandées pour les eaux chaudes sanitaires et TAR sont exprimées en UFC/L pour la culture, alors que les résultats de la quantification par qPCR sont obtenus en unités génome (UG) par litre. L'ANSES propose cependant, après avis d'expert, des valeurs cibles sur les résultats de la surveillance des légionelles. Dans le cas des eaux chaudes sanitaires la valeur cible d'action proposée pour *L. pneumophila* est de 5.10^3 UG/L (7). Pour les eaux de TAR, la valeur cible d'action proposée pour *L. pneumophila* est de 5.10^3 UG/L et la valeur cible d'arrêt de l'installation est de 5.10^5 UG/L (7). Ces valeurs ont été proposées en attente d'études comparatives entre les 2 méthodes avec un grand nombre d'échantillons.

Un appel à candidature lancé le ministère de l'écologie, a eu lieu de mars 2016 à avril 2016 pour une étude de la pertinence des méthodes analytiques par culture et par PCR pour le contrôle des eaux de TAR ; l'objectif étant de pouvoir proposer à terme la méthode par q-PCR dans la règlementation comme méthode de dénombrement de *L. pneumophila*.

Compte-tenu de ces évolutions réglementaires pressenties et des avantages non négligeables présentés par la qPCR, il a été décidé de valider cette méthode de détection et de quantification des légionelles au laboratoire d'Hygiène du CHU de Rouen.

Deuxième partie : travaux personnels : vérification de la méthode qPCR *L. pneumophila* dans les eaux de tours aéroréfrigérantes

1. Objectifs et principes

Le projet de mettre en œuvre la qPCR légionelle au laboratoire date de 2010 et fait suite à une contamination des eaux de réseau par *L. pneumophila* d'un des bâtiments de l'hôpital ayant nécessité en urgence la réalisation d'un grand nombre de prélèvements. Ce projet a ensuite été repris lors de la revue de direction en 2012 et l'achat d'un thermocycleur a été inscrit au plan d'équipement en 2014.

En 2015, lors des analyses effectuées pour la recherche de légionelles dans les eaux de TAR du CHU, le laboratoire s'est retrouvé confronté à une série de résultats ininterprétables. Devant l'absence de résultats et le risque constitué par la présence de ces tours, possiblement contaminées par *L. pneumophila*, dans l'enceinte de l'hôpital, il a été décidé de procéder, en parallèle à des analyses par qPCR, des modalités analytiques développées en interne ayant rapidement montré leurs limites. Afin de garantir la fiabilité des résultats, il a donc rapidement été décidé de s'orienter vers l'utilisation d'une solution commerciale, certifiée tierce partie. Cette certification permet, en effet, de garantir les performances intrinsèques du kit commercial sur la base d'un protocole de validation primaire conforme aux exigences de la norme NF T90-471 et d'une évaluation secondaire de la méthode par le laboratoire. C'est sur cette validation secondaire de la méthode de quantification par qPCR de *L. pneumophila* dans les eaux de TAR qu'a porté le travail présenté ci-après. En effet, dans la mesure où la réglementation des TAR précise que seule la présence de *L. pneumophila* implique des mesures correctives et étant donné qu'il n'y a pas, à l'heure actuelle, d'épidémie à *Legionella* autre que *pneumophila* à partir des TAR, il a été choisi de limiter la vérification de méthode au seul paramètre de *L. pneumophila*.

2. Matériels et méthode

2.1 Analyse de risque

Afin d'identifier les étapes critiques du processus analytique, nous avons réalisé une analyse de risque par la méthode des 5M (matériel, méthode, main d'œuvre, milieu et matière) et à l'aide d'un diagramme d'Ishikawa.

2.2 Kit commercial

Il existe deux fournisseurs proposant des kits PCR légionelle certifiés conformes aux normes NF T90-471 et ISO/TS 12869. Cependant, seul le laboratoire Bio-Rad® proposait un système « ouvert » présentant l'avantage de pouvoir être utilisé pour d'autres applications. Par conséquent, c'est donc les kits Aquadien™ et iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* de chez Bio-Rad® qui ont été retenus par le laboratoire d'hygiène pour réaliser l'extraction et la quantification de *L. pneumophila* dans les TAR.

2.3 Equipements et locaux

La certification tierce partie, pour être valable, impose l'utilisation de l'équipement préconisé par le fabricant à savoir pour Bio-Rad® le thermocycleur CFX96. Le laboratoire a donc acheté ce modèle de thermocycleur en novembre 2015.

En l'absence de locaux spécifiques pour l'extraction et pour la préparation du MIX au laboratoire d'hygiène, il a été décidé d'utiliser les locaux du laboratoire de parasitologie.

Les équipements nécessaires à la mise en œuvre de la technique comme les pipettes, l'enceinte thermostatée à 5°C pour la conservation des réactifs, la rampe de filtration, les chronomètres, le bain marie et la centrifugeuse, ont ensuite été répertoriés afin de s'assurer si nécessaire de leur suivi métrologique. La vérification du thermocycleur a également été planifiée.

2.4 Matrice

L'eau de TAR utilisée pour la vérification de méthode correspond à une matrice complexe. En effet, elle peut être constituée de différents minéraux, ions et micro-organismes. Elle peut aussi contenir des produits chimiques utilisés pour nettoyer et désinfecter la TAR. Pour la réaliser la vérification, les eaux des TAR du CHU de Rouen ont été prélevées dans des flacons contenant du thiosulfate afin de neutraliser les agents oxydants.

2.5 Préalables à la validation de méthode

Avant de démarrer la validation de méthode proprement dite, il a été nécessaire de mettre en place un certain nombre de prérequis identifiés lors d'une analyse de risque menée au préalable, comme le suivi métrologique des équipements critiques, la rédaction du mode opératoire de réalisation de la PCR ainsi que la formation et l'habilitation des opérateurs susceptibles d'intervenir aux différentes étapes de la validation.
En fonction des paramètres à vérifier il a fallu estimer au plus juste le nombre de kits nécessaire afin d'effectuer les commandes.
Enfin il a été établi un plan de vérification réparti sur au moins 5 jours de manipulations avec 3 opérateurs différents afin de respecter les exigences de la norme notamment en termes de vérification de la reproductibilité intermédiaire.

2.6 Protocole de vérification du kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* sur les eaux de tours aéroréfrigérantes

La norme NF T90-471 décrit l'ensemble des critères de performance à vérifier pour la PCR légionelle. Il est ainsi nécessaire de vérifier l'inclusivité et l'exclusivité des sondes, la limite de quantification, la limite de détection, la droite de calibrage, le rendement et la robustesse pour chaque matrice considérée.

2.6.1. Inclusivité/exclusivité :

L'étude de ces 2 paramètres permet d'évaluer la sensibilité et la spécificité du kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*.

L'inclusivité correspond à la capacité des sondes et des amorces à détecter le micro-organisme recherché.
Selon la norme NF T90-471, pour *L. pneumophila*, les 15 sérogroupes doivent être testés. La quantité pour chaque souche testée doit être de 100 UG/puits. Celle-ci étant estimée à partir de la mesure de la densité optique d'une suspension bactérienne.

L'exclusivité correspond à la capacité des sondes et des amorces à ne pas détecter d'autres micro-organismes que celui recherché. Différentes souches n'appartenant pas au genre *Legionnella* doivent être testées avec au minimum : *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* et *Stenotrophomonas maltophila.* Ces micro-organismes sont en effet, soit retrouvés dans les mêmes niches écologiques que les légionnelles soit phylogénétiquement proches des légionelles.
D'autres micro-organismes appartenant au genre *Legionella* autre que *L. pneumophila* doivent être également testés parmi : *L. anisa, L. birminghamensis, L. bozemanii, L. cherrii, L. lansingensis, L. cincinnatiensis, L. dumoffii, L. erythra, L. feeleii, L. gormanii, L. hackeliae, L. jordanis, L. longbeachae, L. maceachernii, L. micdadei, L. oakridgensis, L. parisiensis, L. sainthelensi, L. tucsonensis* et *L. wadsworthii*. Pour chaque souche la quantité d'ADN estimée doit être au minimum de 10000 UG/puits. Cette quantité est déterminée par mesure de la densité optique de la suspension bactérienne.

Les critères d'inclusivité et d'exclusivité sont validés si les sondes et amorces utilisées dans le kit donnent les résultats attendus à savoir, positif pour l'inclusivité et négatif pour

l'exclusivité. Ce résultat doit s'observer pour l'ensemble des souches et sérogroupes testés par chaque critère.

2.6.2. Evaluation de la droite de calibrage

2.6.2.1. Réalisation

Selon la norme, cinq gammes minimum composées de quatre niveaux différents de concentration d'unités génome de *L. pneumophila* doivent être réalisés pour vérifier la droite de calibrage. Ces quatre niveaux doivent être obligatoirement préparés à partir d'une souche ATCC de *L. pneumophila* ou à partir de l'étalon primaire. Nous avons donc réalisé cinq gammes composées de quatre niveaux de concentration d'unités génome de *L. pneumophila* à partir des quatre standards fournis avec le kit iQ-Check™. Ces quatre niveaux étaient de : x_1=15 UG/puits (Cf. 2.6.3), x_2=370 UG/puits x_3=3900 UG/puits et x_4= 39000 UG/puits. Cette vérification a été effectuée en condition de reproductibilité intermédiaire comme exigé par la norme puisqu'elle s'est déroulée sur cinq jours différents avec le même opérateur.

2.6.2.2. Analyse statistique

Afin d'évaluer la droite de calibrage, l'alignement des points $x'_1 m_1$ à $x'_p m_p$, a été vérifié, x'_1 à x'_p correspondant au $\log_{10}$ de la quantité d'ADN pour chaque niveau et m_1 à m_p à la moyenne des *Ct* (cycles seuil) mesurés pour chaque niveau. La droite de régression a ensuite été estimée et l'efficacité ainsi que les performances de la régression linéaire ont été vérifiées.

La droite de régression est donnée par l'équation :

$$y = CT_{moyen} = ax_i' + b$$

L'estimation de la pente (a) est estimée par l'équation :

$$a = \frac{covariance\ de\ x'y}{variance\ de\ x_i'}$$

Avec :

$$Variance\ de\ x'_i = \frac{\sum x'^2_i - \frac{(\sum x'_i)^2}{N}}{N-1}$$

$$co\ variance\ x'y = \frac{\sum x'_i T_i - \frac{\sum x'_i \times T_g}{N}}{N-1}$$

- x_i correspond au nombre d'unités génome de *L. pneumophila* contenus dans les standards (i allant de 1 à 4)
- x'_i correspond au log x_i
- N correspond au nombre de répétitions par niveau (5) multiplié par le nombre de niveaux i (4)
- T_i correspond à la somme des Ct mesurés au niveau i
- T_g correspond à la somme des T_i

(b) correspond à l'ordonnée à l'origine qui peut être nécessaire à l'interprétation dans le cas d'une détection qualitative.

L'efficacité évalue le bon déroulement de l'amplification. Elle est calculée selon la formule :

$$e = \left(10^{-\frac{1}{a}} - 1\right) \times 100$$

Elle doit être comprise entre 75% et 125%, ce qui correspond à une pente comprise entre -4.115 et -2.839. Si ce critère n'est pas respecté, le système d'amplification ne peut être validé.

La régression linéaire permet d'évaluer la justesse et la fidélité de la méthode.
Afin de vérifier les performances de la régression linéaire, l'exactitude E_{LINi} est calculée pour chaque niveau de la gamme. Elle doit être inférieure ou égale à 0.15 $\log_{10}$ pour chacun des niveaux.

Elle est calculée selon la formule :

$$E_{LINi} = \sqrt{s'^2_i + biais^2}$$

s'_i correspond à l'écart type des valeurs x'_{ij} avec k-1 degré de liberté calculé selon la formule : $$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{k} x'^2_{ij} - \frac{\left(\sum_{j=1}^{k} x'ij\right)^2}{k}}{k-1}}$$

où :

- x_i correspondant au nombre d'unités génome de *L. pneumophila* contenus dans les tubes réactionnels
- x'_i correspondant au $\log_{10} x_i$,
- k correspondant au nombre de répétitions par niveau,
- $x'ij$ correspondant à la valeur calculée en utilisant l'équation de la droite de calibrage à partir de la valeur y_{ij} mesurée,
- y_{ij} correspondant à la valeur des Ct mesurés au niveau i (i variant de 1 à p) et de rang j (j variant de 1 à p).

Le biais pour chaque point de la gamme est calculé selon la formule :

$$\overline{x'_\iota} - x'_i$$

Où

- $\overline{x'_\iota}$ correspond à la moyenne des x'_{ij}

2.6.3. Vérification de la limite de quantification

2.6.3.1. Réalisation

La limite de quantification (LQ_{pcr}) correspond au premier niveau de la gamme de calibrage.

Selon la loi de Poisson, la limite de quantification ne peut être inférieure à 15 UG si les essais qPCR sur l'échantillon sont réalisés en duplicat. Selon la norme elle doit être vérifiée en condition de reproductibilité intermédiaire (à minima jours différents et/ou opérateurs

différents) sur le premier point de cinq gammes de calibrage. Au laboratoire cinq gammes réparties sur cinq jours ont donc été réalisées, avec une limite de quantification correspondant à 15 UG/puits, obtenue en diluant le standard QS1 du kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*.

2.6.3.2. Analyse statistique

Pour vérifier la limite de quantification, il est nécessaire de calculer son exactitude (E_{LQ}) qui doit être inférieure ou égale à 0,15. Elle est calculée selon la formule :

$$E_{LQ} = \sqrt{(écart\ type\ )^2 + (biais)^2}$$

l'écart type (s) est calculé selon la formule :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{k} x\prime_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^{k} x\prime i\right)^2}{k}}{k-1}}$$

Avec :

- $x'i$ correspondant à la valeur calculée par calibrage inverse du $\log_{10}$ du nombre d'unités génome de *L. pneumophila*, le calibrage inverse étant lui-même calculé en fonction des CT mesurés et de l'équation de la droite de calibrage.
- k correspondant au nombre de mesures de LQ

Le biais est calculé selon la formule :

$$biais = \overline{x'_\iota} - \log(x)$$

Avec :

- x correspondant à la valeur théorique de LQ visée (ici 15 UG)
- $\overline{x'_\iota}$ correspondant à la moyenne des $x'i$

2.6.4. Vérification de la limite de détection

La limite de détection correspond au plus petit nombre d'unités génome générant un résultat positif d'amplification au seuil de 90%. La limite de détection correspond à 5

UG/puits. Elle a été vérifiée au laboratoire, en condition de reproductibilité intermédiaire, en réalisant dix mesures différentes sur deux jours différents et sur dix dilutions indépendantes à partir du standard QS1 du kit.

2.6.5. Vérification du rendement et de la robustesse

2.6.5.1. Réalisation

Le calcul du rendement permet d'évaluer l'efficacité de la méthode dans son ensemble. Il doit être compris entre 25% et 199%.

L'étude de la robustesse quant à elle permet de caractériser l'effet matrice et de vérifier que le rendement n'est pas affecté par le type d'eau analysé.

Comme exigé par la norme, le laboratoire doit au minimum vérifier les rendements sur les matrices utilisées avec un nombre total d'au moins huit analyses sur chaque matrice, en condition de reproductibilité intermédiaire.

La robustesse quant à elle, doit être vérifiée sur des échantillons d'eau stérile et une matrice complexe.

Au laboratoire, le rendement et la robustesse ont été étudiés sur l'eau minérale et l'eau de TAR sur 3 jours différents, avec 3 opérateurs différents et en analysant 8 prélèvements par matrice.

Pour ce faire, les TAR du CHU ont été prélevées la veille ou le jour même de la réalisation de la PCR, les prélèvements étant conservés à température ambiante.

Le jour de l'étude du rendement, une suspension mère a été préparée en inoculant des colonies de *L. pneumophila* (souche WDCM00107) dans 2 ml de tryptone sel.

La concentration en UG/puits de cette suspension mère a ensuite été mesurée par PCR sur trois lyses directes différentes en prenant pour chaque lyse 100 µl de suspension et 900 µl de réactif de lyse (R1) et en diluant le lysat au 1/1000ème afin de ne pas dépasser la limite supérieure de quantification.

Pour chacune des trois valeurs obtenues, la quantité de *L. pneumophila* en UG/mL présente dans la suspension mère est calculée selon la formule :

$$\frac{quantité\ d'adn/puit}{5} \times facteur\ de\ dilution\ \times\ volume\ final\ \times \frac{1000}{100}$$

Soit :

$$\frac{quantité\ d'adn/puit}{5} \times 1000\ \times\ 1000\ \times \frac{1000}{100}$$

La moyenne de ces trois valeurs exprimée en $\log_{10}$ UG/mL sert de référence pour le calcul du rendement.

A partir de cette suspension mère, une gamme de dilution dans du tryptone sel est ensuite réalisée : au 1/10 (d1), 1/100 (d2), 1/1000 (d3), 1/10000 (d4) et 1/100000 (d5). Pour chaque prélèvement, 2 niveaux de dopage sont réalisés en inoculant 200 µl (Vpe) de 2 dilutions différentes d3 et d5 dans un volume de 100 ml minimum d'eau stérile ou d'eau de tours. Ce qui correspond à des quantités de 2 x 10^5 et 2 x 10^3 UG/L. La concentration en UG/L échantillons dopés a ensuite été mesurée en suivant le protocole complet de PCR (extraction, purification, élution et amplification).

2.6.5.2. Analyse statistique

Le rendement est calculé sur chaque échantillon selon la formule :

$$log_{10}(Re\ nd_{Echantillonx}) = B - A + D + log\ \frac{1000}{V_{pe}}$$

Où :

-$log_{10}(Re\ nd_{Echantillonx})$ correspond au logarithme décimal du rendement de l'échantillon x,

- A correspond au $\log_{10}$ de la quantité d'UG par unité de volume de la suspension mère (obtenue après la lyse directe),

- B correspond au $\log_{10}$ de la quantité UG par unité de volume mesuré à partir de l'échantillon dopé,

- D correspond au $\log_{10}$ du facteur de dilution entre la suspension mère et la suspension de dopage il est de 3 pour une dilution au 1/1000ème et 5 pour une dilution au 1/100000ème,
- V_{pe} correspond au volume de la suspension de dopage inoculé en microlitre.

Le pourcentage de rendement est calculé pour chaque échantillon selon la formule :

$$Rendement(\%) = 10^{log10\ Re\ nd\ echantillon} \times 100$$

La moyenne et l'écart type des rendements sont ensuite calculés.

2.7 Suivi des performances de la méthode iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* en routine

2.7.1. Mise en place de contrôles de qualité

Afin de garantir la justesse et la fidélité des mesures par qPCR réalisées par le laboratoire, des contrôles internes et des évaluations externes de la qualité ont été mis en place.

2.7.2. Calcul de l'incertitude de mesure de la méthode

Selon la norme NF T90-471, le calcul de l'incertitude globale de la méthode est basé sur l'exploitation des résultats du rendement. Elle est estimée à partir du biais et de la variance de reproductibilité intermédiaire.
Le biais correspond au rendement moyen sur l'ensemble des matrices. La variance de reproductibilité quant à elle est estimée en utilisant l'ensemble des valeurs obtenues, lors de la validation initiale, pour l'étude du rendement et de la robustesse ainsi que les valeurs de rendement du CIQ.

Une première estimation a été calculée en utilisant uniquement les données de la validation de méthode selon la formule :

$$U_{élargie} = 2 \times \sqrt{Rend^2_{moyen} + s^2}$$

Avec :

$U_{élargie}$	correspondant à l'incertitude globale
s^2	correspondant à la variance de reproductibilité
$Rend_{moyen}$	correspondant à la moyenne de l'ensemble des rendements obtenus.

3. Résultats

3.1 Analyse de risque

Elle a été réalisée grâce à la méthode des 5 M : matériel, main d'œuvre, matière, milieu et méthode (tableau 2). Un diagramme d'Ishikawa a également été normalisé (annexe n°1). Elle a permis la mise en place et/ou la vérification d'un certain nombre de prérequis indispensables à la validation secondaire de la méthode.

Tableau 2 : analyse de risque selon la méthode des 5 M

Famille	Sous-famille	Risque	Mesures de maîtrise et documents associés
Main d'œuvre	Technicien	Prélèvement mal réalisé	Procédure d'habilitation Procédure d'accueil, de formation et d'évaluation d'un personnel non médical Mode opératoire de prélèvements d'une eau de tour aéroréfrigérante
		Mauvais enregistrement, perte de données	Procédure de maîtrise des enregistrements

		Mauvaise manipulation résultat erroné	Procédure d'habilitation Procédure d'accueil, de formation et d'évaluation d'un personnel non médical Mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel
	Biologiste	Validation de résultats erronés Mauvaise interprétation	Procédure d'habilitation Procédure d'accueil, de formation et d'évaluation d'un personnel médical Procédure de validation des résultats
	Secrétaire	Mauvais enregistrement, perte de données	Procédure d'habilitation Procédure d'accueil, de formation et d'évaluation d'un personnel non médical Procédure de maîtrise des enregistrements
		Mauvaise transmission des résultats aux clients	Procédure d'habilitation Procédure d'accueil, de formation et d'évaluation d'un personnel non médical Procédure de communication des résultats aux clients internes Procédure de communication des résultats aux clients externes

Famille	Sous-famille	Risque	Mesure de maîtrise et documents associés
Matière	Contenant du prélèvement	Flacon ne contenant pas de thiosulfate pas de neutralisation des oxydants	Mode opératoire de prélèvement d'une eau de TAR Procédure de gestion des fournitures, de contrôle de conformité et stérilité des

			lots Mode opératoire de dosage du thiosulfate dans les flacons de prélèvement
	Sécurité du préleveur	Contamination avec légionelles présentes dans l'eau de la TAR	Mode opératoire de prélèvement d'une eau de TAR
	Délai d'achemine-ment du prélèvement	Dégradation du prélèvement	Mode opératoire de prélèvement d'une eau de TAR
	Conserva-tion prélèvement	Dégradation du prélèvement	Mode opératoire de prélèvement d'une eau de TAR
	Gestion des déchets	Contamination du laboratoire et des personnels	Procédure d'élimination des déchets
	Traçabilité de l'analyse	Perte de données	Procédure de maîtrise des enregistrements Feuilles de traçabilité associées à l'analyse
	Communica tion des résultats	Pas d'information du client Perte de données	Procédures de communication des résultats aux clients externes et internes
	Archivage des résultats	Perte de données	Procédure de maîtrise des enregistrements

Famille	Sous-famille	Risque	Mesure de maîtrise et documents associés
Milieu	Température ambiante	Dégradation du prélèvement	Procédure générale de métrologie Utilisation du logiciel de suivi des températures
	Enceinte thermostatée	Dégradation des réactifs	Procédure générale de métrologie Procédure de caractérisation des enceintes thermostatiques Utilisation du logiciel de suivi des températures Procédure de confirmation métrologique des voies de l'enregistreur de température
	Locaux dédiés à l'extraction et MIX	Contamination du prélèvement par un autre ADN	Mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel Mode opératoire relatif aux règles de manipulation spécifiques à la biologie moléculaire en bactériologie et virologie
	Nettoyage locaux PSM	Contamination du prélèvement ou du PSM	Procédure d'entretien des locaux Mode opératoire d'utilisation du PSM

Famille	Sous famille	Risque	Mesure de maîtrise et documents associés
Matériel	Thermocycleur	Panne Température non adaptée	Appareil de back-up Utilisation adéquate : mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel Notice fournisseur Vérification métrologique

	Bain marie	Panne Température non adaptée d'incubation	Surveillance température Bain-marie de secours
	Pipettes	Volume de pipetage non adapté	Vérification métrologique des pipettes
	Rampe de filtration	Pas de filtration Contamination entre plusieurs prélèvements	Traçabilité des rampes et frittés Stérilisation des frittés et rampes Désinfection de la rampe : mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel
	Centrifugeuse	Mauvaise utilisation Panne	Mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel Centrifugeuse de secours
	Ordinateur	Panne	Installation possible du logiciel sur différents ordinateurs
	Chronomètre	Temps incorrect	Confirmation métrologique des chronomètres
	Réactifs et consommables	Rupture de stock Utilisation de réactifs périmés	Mode opératoire d'utilisation du logiciel de gestion des stocks Procédure commande réactifs et consommables Procédure de réception et stockage des réactifs et consommables Procédure péremption, traçabilité, conformité des réactifs et consommables
	Membranes en polycarbonate	Utilisation d'un autre type de membrane	Mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel Habilitation du personnel

	Logiciel informa-tique	Mauvaise utilisation Erreur de calculs Panne	Mode opératoire de recherche de légionelles par PCR en temps réel Habilitation du personnel Validation du logiciel SAV

Famille	Sous-famille	Risque	Mesures de maîtrise et documents associés
Méthodes	Detection et quantification de *L.pneumophila* par PCR en temps réel	Méthode non adaptée au besoin et techniquement non valide Méthode non performante dans les conditions du laboratoire Dérive des résultats	Validation de la méthode selon la norme NF T90-471 Utilisation d'un kit PCR légionelle validé tierce partie Mise en œuvre de la validation secondaire de la méthode
	EEQ	Mauvaise manipulation Dérive des résultats	Procédure de gestion de l'EEQ AGLAE Exploitation des rapports d'essai de l'EEQ
	CIQ	Mauvaise manipulation Dérive des résultats	Procédure de gestion des CIQ Mode opératoire PCR

3.2 Prérequis à la validation

3.2.1. Suivi métrologique des équipements

La validité du raccordement au système international de toutes les pipettes utilisées pour l'extraction et la qPCR a été contrôlée. Les pipettes dont la vérification datait d'au moins un an ont été à nouveau étalonnées fin décembre 2015.

Concernant le thermocycleur CFX96, il a été vérifié que les différentes températures utilisées à chaque cycle étaient bien conformes aux températures définies par le fournisseur, grâce à des sondes de température étalonnées et une méthode développée en interne par l'unité de métrologie.

La température du bain marie a également été contrôlée pour s'assurer qu'elle atteigne 95 +/- 5°C, ce qui correspond à la température nécessaire pour lyser l'ADN.

Les enceintes thermostatée de stockage des réactifs n'ont pas nécessité la mise en place d'un suivi supplémentaire, leur cartographie avait déjà été réalisée et leur température fait l'objet d'un suivi en continu.

3.2.2. Rédaction du mode opératoire

Il a été rédigé au moment de la vérification de méthode sur la base de la norme NF T90-471 et des notices du fournisseur (Bio-Rad®). Il a été rédigé par les opérateurs concernés et relu par les biologistes avant d'être intégré au logiciel de gestion documentaire (annexe n°2).

3.2.3. Formation et habilitation

Avant le début de la vérification de méthode, il a été planifié avec le fournisseur la formation des différents opérateurs participants à la vérification de méthode et d'autres techniciens pouvant être amenés à réaliser la PCR. Au total, quatre personnes ont été formées : un interne et trois techniciens. Cette formation portait sur l'ensemble de l'analyse, de l'extraction à l'amplification et l'utilisation du logiciel pour la qPCR *L. spp* et *L. pneumophila*,

ainsi que sur des notions de base portant sur la mise en œuvre des techniques de biologie moléculaire au laboratoire. A l'issue de cette formation des critères d'habilitations ont été formalisés (annexe n°3).

3.3 Vérification de la méthode

La majorité des résultats a été calculée à l'aide d'un tableau Excel. L'ensemble des formules utilisées par ces tableaux a été vérifié manuellement (annexe n°4).

3.3.1. Inclusivité/exclusivité

Comme il est indiqué dans la norme et cette vérification nécessitant un nombre important de réactifs, le laboratoire a récupéré le dossier de validation fourni par le fabricant.

Pour chacune des souches testées l'ADN a été extrait à partir d'une suspension bactérienne pure.
Concernant le critère d'inclusivité, les essais ont été réalisés sur des extraits d'ADN à une concentration de 100 UG par puits. Les 15 sérogroupes de *L. pneumophila* testés ont tous été détectés par le kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*.
Pour le critère d'exclusivité, les essais ont été mis en oeuvre sur des extraits d'ADN à une concentration de 10000 UG/puits. 9 légionelles autre que *L. pneumophila* ont été testées et n'ont pas été détectées par le kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*. De même, les 16 bactéries testées n'appartenant pas au genre légionnelles n'ont pas été détectées par le kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*.

3.3.2. Evaluation de la droite de calibrage

Les points $x'_1 m_1$ à $x'_p m_p$ (correspondant au $\log_{10}$ de la quantité d'ADN estimé en fonction des Ct moyens par niveau) sont tous alignés le long d'une droite (figure 5). Nous obtenons une pente à -3.38, ce qui correspond aux critères exigés par la norme puisque celle-ci doit être comprise entre - 4.115 et - 2.839 (tableau 3). L'efficacité est comprise entre 75 % et

125 % (97.69 %) (tableau 3). De plus, l'exactitude de linéarité pour chaque niveau est bien inférieure à 0.15 log (tableau 4).

La droite de calibrage est donc vérifiée et conforme aux exigences de la norme NF T90-471.

Tableau 3 : estimation de la droite de régression et de l'efficacité

	Niveau testé (UG) : X_i	Log niveau testé (log d'UG) : X'_i	CT obtenus (cycles) : y_{ij}									
QS1	15,00	1,18	35,03	35,48	34,82	35,06	34,81	35,10	35,07	35,33	36,18	35,41
QS2	370,00	2,57	30,54	30,68	30,55	30,47	30,25	30,45	30,41	30,14	30,46	30,28
QS3	3900,00	3,59	27,13	27,22	27,09	27,18	27,05	27,09	26,89	26,96	27,08	27,05
QS4	39000,00	4,59	23,76	23,89	23,85	23,92	23,58	23,62	23,39	23,35	23,60	23,67
		Pente = a	-3,38									
		Ordonnée à l'origine = b	39,17									
		Corrélation (r^2)	1,00									
		efficacité %	97,69									

Tableau 4 : évaluation de la performance de la régression linéaire

Niveau estimé (UG) : X_i	Log niveau estimé (log d'UG) : X'_i	CT obtenus (cycles) : y_{ij}										Ct moyen par niveau	Quantité retrouvée par niveau (log)	Quantité retrouvée par niveau (UG)	Biais	Ecart-type	Exactitude de linéarité
15	1,176091259	35,03	35,48	34,82	35,06	34,81	35,1	35,07	35,33	36,18	35,41	35,229	1,166755267	14,68	-0,01	0,12	0,12
370	2,568201724	30,54	30,68	30,55	30,47	30,25	30,45	30,41	30,14	30,46	30,28	30,423	2,589215488	388,34	0,02	0,05	0,05
3900	3,591064607	27,13	27,22	27,09	27,18	27,05	27,09	26,89	26,96	27,08	27,05	27,074	3,580438808	3805,74	-0,01	0,03	0,03
39000	4,591064607	23,76	23,89	23,85	23,92	23,58	23,62	23,39	23,35	23,6	23,67	23,663	4,590012635	38905,65	0,00	0,06	0,06

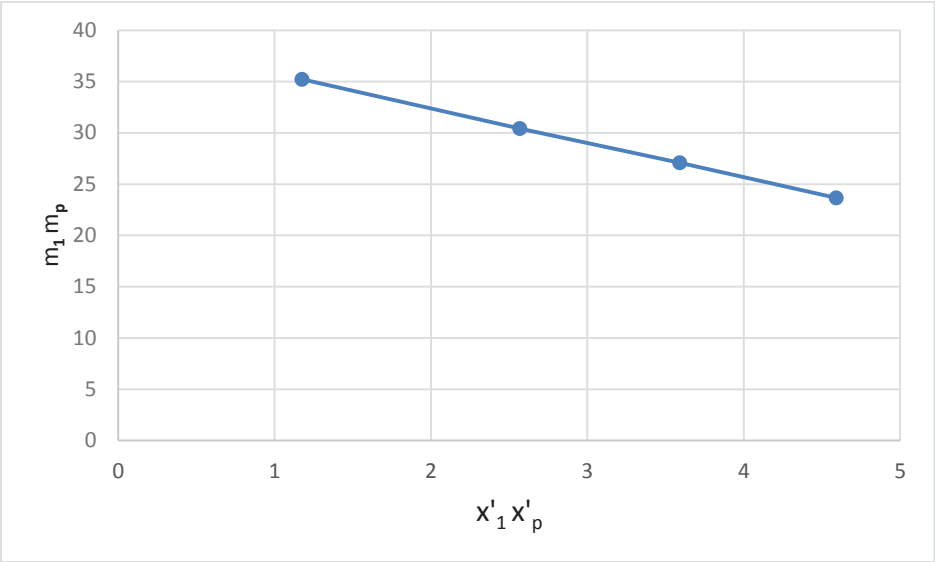


Figure 5 : Alignement des points $x'_1 m_1$ à $x'_p\, m_p$

En abscisse : $\log_{10}$ de la quantité d'ADN contenu dans les standards

En ordonnée : moyenne des *Ct* (cycles seuil) mesurés pour chaque niveau

3.3.3. Vérification de la limite de quantification

Le protocole d'analyse du fournisseur indique que les échantillons doivent être traités en duplicat, la limite de quantification étant fixée à 15 UG/l. Son exactitude a été vérifiée comme étant bien inférieure à 0.15 log (tableau 5). La limite de quantification, par conséquent est donc conforme aux exigences de la norme NF T90-471. Aucune difficulté n'a été rencontrée pour la vérification de ce critère de performance.

Tableau 5 : détermination de l'exactitude de la limite de quantification.

Echantillon	Niveau testé (UG/PCR) x	Ct	Moy Ct	x'i	Quantité (UG/PCR)	moy x'i
LQ1	15	35,03	35,26	1,224	16,8	1,158
		35,48		1,091	12,3	
LQ2	15	34,82	34,94	1,286	19,3	1,251
		35,06		1,215	16,4	
LQ3	15	34,81	34,96	1,289	19,5	1,247
		35,1		1,204	16	
LQ4	15	35,07	35,2	1,213	16,3	1,174
		35,33		1,136	13,7	
LQ5	15	36,18	35,8	0,884	7,7	0,998
		35,41		1,112	12,9	
					Moyenne	1,166
					Ecart-type	0,102
					Biais	-0,0106
					Exactitude de LQ (E_{LQ})	0,103

3.3.4. Vérification de la limite de détection

La limite de détection étudiée était de 5 UG/l. 9 échantillons ont été détectés sur 10 (tableau 6) par la PCR ce qui correspond à 90% de résultats positifs. La limite de détection est donc conforme aux exigences de la norme NF T90-471. Aucune difficulté n'a été rencontrée pour la vérification de ce critère de performance.

Tableau 6 : vérification de la limite de détection

	Limite de détection (LD)	Résultat
Jour n°1	LD1	Positif
	LD2	Positif
	LD3	Positif
	LD4	Positif
	LD5	Positif
Jour n°2	LD6	Négatif
	LD7	Positif
	LD8	Positif
	LD9	Positif
	LD10	Positif

3.3.5. Vérification du rendement et de la robustesse

Cette vérification s'est déroulée sur 3 jours. Une suspension mère de *L. pneumophila* a été réalisée chaque jour. A chaque fois, la concentration en UG/L d'ADN de *L. pneumophila* a été mesurée par PCR grâce à 3 lyses directes. Les quantités moyennes obtenues sont les suivantes :

- J1: 8.76 x 10^8 UG/mL
- J2 :1.25 x 10^9 UG/mL
- J3 : 1.21 x 10^9 UG/mL.

Ces suspensions ont ensuite été diluées et incorporées aux eaux minérales et eaux de TAR afin d'obtenir deux niveaux théoriques de dopage de 200000 UG/L et 2000 UG/L. Au total, 8 échantillons par matrice et par niveau ont été testés ce qui représente 32 échantillons au total.

Pour les eaux minérales avec un niveau de dopage de 200000 UG/L, un rendement moyen de -0.50 log soit 33.74 % (avec un écart type de 12.94 %) a été obtenu (tableau 7). Pour un niveau de 2000 UG/L, un rendement moyen de -0.45 log soit 36.65 % (avec un écart type de 10.45 %) a été observé (tableau 8).

Pour les eaux de TAR, avec un niveau de dopage de 200000 UG/L, le rendement moyen obtenu était de -0.46 log soit 36.72 % (avec un écart type de 15.48 %) (tableau 9). Pour le niveau de 2000 UG/L, le rendement moyen observé était de -0.56 log soit 29.56 % (avec un écart type de 11.33 %) (tableau 10).

L'ensemble de ces rendements moyens est donc bien compris entre 25 % et 199% comme l'exige la norme pour valider la méthode.

Concernant la robustesse, le rendement ne semble pas être affecté par l'effet matrice, cependant elle devra être réévaluée dans le temps grâce au contrôle de rendement mensuel.

Tableau 7 : rendement de la méthode sur la matrice eau minérale avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 200000 UG/L

Echantillon	Suspension mère				Suspension dopée			Facteur de dilution D		Vpe	Rendement	
	n°1 (UG/mL)	n°2 (UG/mL)	n°3 (UG/mL)	Moyenne A (log)	UG/L	Moyenne UG/L	B (log)	valeur	log		log	%
1	928000000	870000000	830000000	8,94204844	40600	40600	4,61	1000	3	200	-0,63	23
					40600							
2	928000000	870000000	830000000	8,94204844	29700	29700	4,47	1000	3	200	-0,77	17
					29700							
3	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	147000	147000	5,17	1000	3	200	-0,23	59
					147000							
4	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	97400	97400	4,99	1000	3	200	-0,41	39
					97400							
5	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	69800	69800	4,84	1000	3	200	-0,54	29
					69800							
6	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	78200	78200	4,89	1000	3	200	-0,49	32
					78200							
7	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	69600	69600	4,84	1000	3	200	-0,54	29
					69600							
8	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	99600	99600	5,00	1000	3	200	-0,38	41
					99600							
										Moyenne	-0,4989513	33,7469451
										Ecart-type	0,1648543	12,9360121

Tableau 8 : rendement de la méthode sur la matrice eau minérale avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 2000 UG/L

Echantillon	Suspension mère				Suspension dopée			Facteur de dilution D		Vpe	Rendement	
	n°1 (UG/mL)	n°2 (UG/mL)	n°3 (UG/mL)	Moyenne A (log)	UG/L	Moyenne UG/L	B (log)	valeur	log		log	%
1	928000000	870000000	830000000	8,94204844	414,3 414,3	414,3	2,62	100000	5	200	-0,63	24
2	928000000	870000000	830000000	8,94204844	378,3 378,3	378,3	2,58	100000	5	200	-0,67	22
3	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	1237,6 1237,6	1237,6	3,09	100000	5	200	-0,30	50
4	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	1004,4 1004,4	1004,4	3,00	100000	5	200	-0,39	40
5	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	973,2 973,2	973,2	2,99	100000	5	200	-0,39	40
6	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	814,6 814,6	814,6	2,91	100000	5	200	-0,47	34
7	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	1186,5 1186,5	1186,5	3,07	100000	5	200	-0,31	49
8	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	829,6 829,6	829,6	2,92	100000	5	200	-0,46	34
										Moyenne	-0,4530973	36,6466767
										Ecart-type	0,1340667	10,4542501

Tableau 9 : rendement de la méthode sur la matrice eau de tours aéroréfrigérantes avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 200000 UG/L

Echantillon	Suspension mère				Suspension dopée			Facteur de dilution D		Vpe	Rendement	
	n°1 (UG/mL)	n°2 (UG/mL)	n°3 (UG/mL)	Moyenne A (log)	UG/L	Moyenne UG/L	B (log)	valeur	log		log	%
1	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	81300 81300	81300	4,91	1000	3	200	-0,49	33
2	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	72900 72900	72900	4,86	1000	3	200	-0,53	29
3	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	68500 68500	68500	4,84	1000	3	200	-0,56	28
4	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	69600 69600	69600	4,84	1000	3	200	-0,54	29
5	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	151000 151000	151000	5,18	1000	3	200	-0,20	63
6	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	61800 61800	61800	4,79	1000	3	200	-0,59	26
7	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	95400 95400	95400	4,98	1000	3	200	-0,40	40
8	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	65000 65000	65000	4,81	1000	3	200	-0,57	27
										Moyenne	-0,4613152	36,7210548
										Ecart-type	0,1617953	15,48162

Tableau 10 : rendement de la méthode sur la matrice eau de tours aéroréfrigérantes avec un niveau de dopage de *L. pneumophila* de 2000 UG/L

Echantillon	Suspension mère				Suspension dopée			Facteur de dilution D		Vpe	Rendement	
	n°1 (UG/mL)	n°2 (UG/mL)	n°3 (UG/mL)	Moyenne A (log)	UG/L	Moyenne UG/L	B (log)	valeur	log		log	%
1	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	519,7 519,7	519,7	2,72	100000	5	200	-0,68	21
2	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	857,1 857,1	857,1	2,93	100000	5	200	-0,46	34
3	1189960400	1120895200	1441094000	9,094596609	1079,6 1079,6	1079,6	3,03	100000	5	200	-0,36	43
4	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	399 399	399	2,60	100000	5	200	-0,78	17
5	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	433,3 433,3	433,3	2,64	100000	5	200	-0,75	18
6	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	529,2 529,2	529,2	2,72	100000	5	200	-0,66	22
7	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	967,9 967,9	967,9	2,99	100000	5	200	-0,40	40
8	1078835000	1249355200	1300877600	9,081292464	991,3 991,3	991,3	3,00	100000	5	200	-0,39	41
										Moyenne	-0,5591285	29,559038
										Ecart-type	0,1744551	11,3259228

3.4 Suivi et maîtrise des performances en routine

3.4.1 Réalisation de CIQ

Afin de vérifier la bonne mise en œuvre de la technique et l'absence de contamination à chaque série de PCR, il a été décidé de réaliser à chaque série un contrôle positif et négatif, ces deux contrôles permettant de vérifier le bon déroulement de l'ensemble de la méthode de l'extraction à l'amplification.

Le contrôle négatif est réalisé en filtrant 500 ml d'eau physiologique stérile.

Le contrôle positif quant à lui est réalisé en diluant une pastille de la souche *L. pneumophila* WDCM 00107 dans 20 ml de tryptone sel et en incorporant 1,5 ml de cette solution dans 100 ml de tryptone sel qui est ensuite filtré dans sa totalité pour subir le même processus analytique que les autres échantillons.

Pour contrôler uniquement le bon déroulement de la réaction d'amplification, il a été décidé d'utiliser le contrôle négatif et le contrôle matériel contenu dans le kit iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila*. Le contrôle négatif permet de garantir l'absence de contamination

ADN lors de la mise en qPCR et le contrôle matériel de s'assurer des performances du calibrage en obtenant la valeur indiquée par le fournisseur +/- 0.2 log.
L'ensemble des résultats obtenus au bout de 12 mois permettront de réévaluer l'incertitude de mesure globale de la méthode.

3.4.2 Mise en place de l'EEQ

Le laboratoire s'est abonné à l'EEQ AGLAE « *Legionella* et *Legionella pneumophila* sur eaux sales par PCR » (programme n°36). Le premier essai de la campagne 2016 a été réalisé en mai 2016 et le laboratoire a obtenu la note de A pour les paramètres *Legionella* et *L. pneumophila*.

3.4.3 Calcul de l'incertitude de mesure de la méthode

Après réalisation des calculs sur les données issues de la validation secondaire, on obtient une première estimation de l'incertitude globale de la méthode égale à 1.04 log (tableau 11).

Tableau 11 : incertitude globale de la méthode

	Rendement échantillon				
Niveau	Eau stérile	Eau de tour	Rend Moyen	Variance	incertitude
200000 UG/L	-0,63	-0,49	-0,499	0,023	1,04
	-0,77	-0,53			
	-0,23	-0,56			
	-0,41	-0,54			
	-0,54	-0,2			
	-0,49	-0,59			
	-0,54	-0,4			
	-0,38	-0,57			
2000 UG/L	-0,63	-0,68			
	-0,67	-0,46			
	-0,3	-0,36			
	-0,39	-0,78			
	-0,39	-0,75			
	-0,47	-0,66			
	-0,31	-0,4			
	-0,46	-0,39			

Cette incertitude globale pourra être évaluée par la suite au regard des valeurs obtenues à l'issue du suivi mensuel des rendements.

3.5 Conclusions quant à la vérification de la méthode

L'ensemble des résultats obtenus à l'issue de la vérification secondaire de la méthode de détection et quantification de *L. pneumophila* dans les eaux de TAR, à l'aide du kit iQ-Check™ Quanti de chez Bio-Rad® est conforme aux exigences de la norme NF T90-471. Cette méthode peut donc être désormais utilisée en routine par le laboratoire. A l'avenir le laboratoire pourrait envisager d'étendre cette vérification afin de détecter et quantifier l'ensemble des légionelles dans les différents types d'eaux.

Troisième partie : travaux personnels détection et quantification par qPCR et culture de *L. pneumophila* dans les eaux de tours aéroréfrigérantes en présence de flore interférente

Au cours de l'année 2015, la présence de flore dans les eaux de tours aéroréfrigérantes a empêché le laboratoire de rendre un résultat concernant l'analyse de légionelles par culture. Ce problème a concerné deux TAR et a duré plusieurs mois. Pour la TAR n°2 la flore a été présente pendant 7 mois consécutifs et il n'a pas été possible de rendre un résultat pendant 5 mois malgré les différents traitements que l'eau avait subi avant la mise en culture. Pour la TAR n°1 la flore interférente a été présente pendant 4 mois dont 3 mois où le rendu des résultats n'a pas été possible. Ce problème s'était déjà produit en 2011 et 2013 mais n'avait duré qu'un seul mois. Le présent travail a donc consisté à réaliser en parallèle la PCR et la culture sur les eaux de tours aéroréfrigérantes dopées par deux flores différentes, afin de montrer que même en présence de flore interférente, quand la culture ne permet pas de rendre un résultat, la PCR nous permet de faire le diagnostic. En février 2014, le laboratoire a également été confronté au même type de problème au cours d'un de ses essais d'EEQ sur eaux sales en raison de la nature exigeante de la flore interférente retrouvée.

1. Matériels et méthodes

1.1. Détermination de la flore

En l'absence de flore interférente naturelle dans les tours au moment de ce travail, les deux flores utilisées ont dû être reconstituées artificiellement par dopage d'eau de TAR. Une des deux flores a été réalisée à partir des résultats obtenus par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) qui avait permis d'identifier *Stenotrophomonas maltophila*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus spp* dans les prélèvements de fin 2015. Pour la deuxième flore, il a été utilisé les souches qui avaient posé problème lors de l'EEQ de février 2014 à savoir *P. aeruginosa* et *Panthoa spp*. Des essais préliminaires ont été effectués afin de déterminer, pour ces flores interférentes, la quantité de germes à introduire

pour empêcher la culture des légionelles à partir d'une suspension dopée à la hauteur de 5.10^5 UG/L.

1.2. Détermination de la quantité de légionelles testée

Deux concentrations de *L. pneumophila* pour chaque flore ont été testées à savoir : 5.10^5 UG/L et 5.10^3 UG/L ce qui correspond aux seuils d'alerte et d'action proposés par l'ANSES pour la PCR dans les eaux de tours aéroréfrigérantes (7) au regard des seuils d'alerte et d'action qui sont fixés à 10^5 UFC/L et 10^3 UFC/L pour la mise en culture.

1.3. Prélèvements d'eau des tours aéroréfrigérantes

Les prélèvements ont été effectués le même jour que la culture et la PCR. L'eau a été prélevée dans des flacons stériles de 1 litre contenant du thiosulfate comme exigé par la norme. L'eau a ensuite été séparée en deux flacons contenant 500ml l'un étant destiné à la PCR et l'autre à la culture.

1.4. Réalisation des suspensions bactériennes

Elles ont été réalisées le jour même des essais, à partir de cultures de moins de 24 heures.
Pour les dopages de flore interférente, une suspension de 3 Mac Farland pour chaque germe autre que *L. pneumophila* a été réalisée. Pour le *P. spp* et le *P. aeruginosa*, plusieurs suspensions de 6.5 Mac Farland de chaque germe ont été effectuées puis regroupées avant inoculation dans l'eau de TAR.

La suspension de légionelles a été effectuée à partir d'une culture de moins de 72 heures d'une souche ATCC de *L. pneumophila*. Une suspension de 1.2 Mac Farland a été réalisée ce qui correspond à environ 10^9 UG/mL de *L. pneumophila* ; concentration mesurée auparavant par lyse directe. Cette suspension a ensuite été diluée à 10^6 UG/ml et 10^4 UG/ml

afin d'obtenir une concentration finale en légionelles de 5.10^5 UG/L et 5.10^3 UG/L lorsque 500 µl de chaque dilution sont incorporées aux eaux prélevées.

1.5. Dopage des eaux prélevées

Pour la première flore interférente, après agitation, 500 µl de chaque suspension de germes ont été incorporés dans les flacons destinés à la culture et la PCR. La suspension de légionelles a également été introduite à hauteur de 500 µl/flacon afin d'obtenir, pour chaque méthode, une concentration de 5.10^5 UG/L et 5.10^3 UG/L.

Concernant la deuxième flore interférente constituée de *Panthoa* et *Pseudomonas aeruginosa*, 3 ml de *P. spp* et *P. aeruginosa* ont été inoculés dans les différents flacons après agitation mécanique. Comme pour la flore précédente, les légionelles ont également été introduites à hauteur de 500 µl par flacon afin d'obtenir les concentrations 5.10^5 UG/L et 5.10^3 UG/L.

1.6. Mise en œuvre des essais

1.6.1. Réalisation de la PCR

Selon les exigences de la norme NF T90-471, les eaux dopées ont été filtrées sur une membrane en polycarbonate. L'ADN a ensuite été extrait et amplifié le jour même. L'eau de TAR sans dopage a également été testée afin de vérifier l'absence de légionelles. Une eau stérile a également été filtrée à titre de contrôle négatif et afin de contrôler le bon déroulement de la PCR, de la filtration à l'amplification.

1.6.2. Réalisation de la culture

Parallèlement à la mise en œuvre de la PCR, la mise en culture des échantillons a été réalisée selon la norme NF T90-431. Chaque eau dopée a été ensemencée par étalement directement et en diluant l'échantillon au 1/10ème. Elles ont ensuite été concentrées par

centrifugation, le centrifugat obtenu étant ensemencé par étalement directement puis après avoir subi un traitement thermique de 50°C pendant 30 minutes, un traitement acide pendant 5 minutes et un traitement thermique associé à un traitement acide. Les milieux utilisés pour la mise en culture étaient des milieux GVPC, qui ont ensuite été incubés à 36°C +/- 2 °C pendant 9 jours. Un CIQ reconstitué à partir d'une souche ATCC de *L. pneumophila* a été réalisé en même temps afin de contrôler la performance de la méthode. L'eau de TAR sans dopage a également été mise en culture afin de vérifier l'absence de *Legionella* autre que *pneumophila.*

1.6.3. Lecture des cultures

Conformément aux exigences de la norme NF T90-431, les milieux de cultures ont été examinés à la loupe binoculaire à J3 puis à J5 et J9. Les colonies suspectes, grises ou blanches avec une image en verre dépoli à la loupe binoculaire ont été repiquées sur des milieux BCYE avec et sans L. cystéine, qui ont été incubés pendant 48 heures à 36° +/- 2°C. Les colonies confirmées ont ensuite été dénombrées.

2. Résultats

2.1 Détection et quantification de *L. pneumophila* par qPCR

L. pneumophila a été détectée et quantifiée dans tous les flacons dopés testés (tableau 12). Aucun inhibiteur de PCR n'a été détecté. Pour les eaux dopées par la flore interférente n°1, la quantité de *L. pneumophila* était de $5{,}16.10^5$ UG/L et $3{,}99.10^3$ UG/L. Pour les eaux dopées par *P. spp* et *P. aeruginosa*, la quantité de *L. pneumophila* était de $2{,}02.10^5$ UG/L et $1{,}74.10^3$ UG/L. Le contrôle de l'eau de TAR était négatif pour *L. pneumophila*.

Tableau 12 : résultat de la PCR *L. pneumophila*

	Résultats de la PCR *L. pneumophila* (UG/L)
Flore n°1 : *S. maltophila*, *P. putida*, *K. oxytoca*, *P.aeruginosa* et *B. spp* Légionelles 5.10^5 UG/L	$5,16.10^5$
Flore n°1 : *S. maltophila*, *P. putida*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* et *B. spp* Légionelles 5.10^3 UG/L	$3,99.10^3$
Flore n°2 : *P. spp, P. aeruginosa* Légionelles 5.10^5 UG/L	$2,02.10^5$
Flore n°2 : *P. spp, P. aeruginosa* Légionelles 5.10^3 UG/L	$1,74.10^3$

2.2 Recherche et dénombrement par mise en culture et concentration par centrifugation

Après trois jours d'incubation, aucune colonie suspecte de *L. pneumophila* n'a été mise en évidence sur les eaux dopées. Par contre une flore interférente (annexe n°5) était retrouvée sur les géloses ensemencées directement et à partir du concentrat pur pour les deux types de flore. Pour la flore n°1, une flore était également présente sur la gélose correspondant au traitement acide (tableau 13).

Après cinq jours d'incubation, deux colonies suspectes ont été mises en évidence pour le dopage avec *P. spp*, *P. aeruginosa* et légionelles à 5.10^5 UG/L mais uniquement sur la gélose correspondant au traitement acide (tableau 13). Ces colonies ont été repiquées sur

milieux BCYE avec et sans L. cystéine ce qui a confirmé la présence de légionelles. Sur les autres milieux, les légionelles n'ont pas été détectées (tableau 13).

Enfin, après neuf jours d'incubation, aucune nouvelle colonie suspecte n'a été détectée. Il n'a pas été retrouvé de légionelles dans l'eau de TAR non dopée et le CIQ réalisé était conforme.

Tableau 13 : résultats de la mise en culture

	Direct	Direct 1/10	Concentrat pur	Concentrat traitement acide	Concentrat traitement thermique	Concentrat traitement acide et thermique
Flore n°1 : *S. maltophila, P. putida, K. oxytoca, P.aeruginosa* et *B. spp* Légionelles 5.10^5 UG/L	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	*L. pneumophila* non détectée	*L. pneumophila* non détectée
Flore n°1 : *S. maltophila*, *P. putida*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* et *B. spp* Légionelles 5.10^3 UG/L	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	*L. pneumophila* non détectée	*L. pneumophila* non détectée
Flore n°2 : *P. spp P. aeruginosa* Légionelles 5.10^5 UG/L	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	2 colonies de *L. pneumophila* soit 200 UFC/L	*L. pneumophila* non détectée	*L. pneumophila* non détectée
Flore n°2 : *P. spp P. aeruginosa* Légionelles 5.10^3 UG/L	Flore interférente	Flore interférente	Flore interférente	Négatif	*L. pneumophila* non détectée	*L. pneumophila* non détectée

2.3 Comparaison PCR/culture

Pour les eaux de TAR dopées avec la flore n°1 et *L. pneumophila* à une concentration de 5.10^5 UG/L et 5.10^3 UG/L, bien que la PCR retrouve une quantité de légionelles respectivement de $5.16.10^5$ UG/L et de $3,99.10^3$ UG/L, aucune légionelle n'a poussé sur les milieux de culture quel que soit le traitement appliqué au centrifugat (tableau14).

Concernant les eaux de TAR dopées avec la flore n°2 et *L. pneumophila* à une concentration de 5.10^5 UG/L : La quantité de légionelles estimée en PCR est de $2.02.10^5$ UG/l, alors qu'avec la culture on obtient seulement une concentration de 200 UFC/L (tableau 14).
Avec cette même flore et une concentration de *L. pneumophila* de 5.10^3 UG/L, la quantité de légionelles détectée en PCR était de $1,74.10^3$ UG/L, alors qu'aucune légionelle n'a pas pu été détectée par culture (tableau 14).

Tableau 14 : résultats comparatifs de la PCR versus la culture

	Résultat PCR légionelles (UG/L)	Résultat culture légionelles (UFC/L)
Flore n°1 et *L. pneumophila* 5.10^5 UG/L	$5,16.10^5$	Flore interférente
Flore n°1 et *L. pneumophila* 5.10^3 UG/l	$3,99.10^3$	Flore interférente
Flore n°2 et *L. pneumophila* 5.10^5 UG/L	$2,02.10^5$	Flore interférente Légionelles : 200 UFC/L
Flore n°2 et *L. pneumophila* 5.10^3 UG/L	$1,74.10^3$	Flore interférente

La PCR permet donc la détection et la quantification de *L. pneumophila* malgré la présence de flore interférente. Au contraire, avec la même flore interférente, la culture n'a pas

permis de détecter la présence de *L. pneumophila* ou a entrainé une importante sous-estimation du résultat pour des niveaux de contamination devant normalement entraîner l'arrêt immédiat des TAR.

Discussion et conclusion

La légionellose est une maladie potentiellement grave dont l'origine est environnementale puisque les légionelles se développent dans l'eau lorsque les conditions leurs sont favorables. Elles sont également capables de résister aux conditions défavorables et aux traitements visant à les diminuer, grâce à leur adhésion au biofilm et à leur capacité à parasiter les amibes.

L'homme se contamine en inhalant des gouttelettes d'eaux contaminées par *L. pneumophila*, les sources principales de contamination étant les réseaux intérieurs de distribution d'eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes. Pour les réseaux intérieurs de distribution d'eaux chaudes sanitaires, l'homme se contamine généralement en prenant sa douche, par diffusion d'aérosols. Concernant les tours aéroréfrigérantes, les aérosols contaminés sont propulsés dans l'air et vont ensuite être diffusés sur plusieurs kilomètres autour de la tour pouvant entraîner une exposition voire une contamination importante des populations aux alentours. De nombreuses épidémies ont ainsi été décrites notamment à cause des tours aéroréfrigérantes. Il apparait donc essentiel de détecter la prolifération de légionelles dans les installations de refroidissement le plus précocement possible afin d'éviter la survenue d'épidémies massives.

La méthode de référence actuelle pour la recherche de *L. pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes est la mise en culture. Cependant, cette méthode a pour principaux inconvénients de ne permettre un résultat définitif qu'au bout de 8 à 11 jours et d'avoir une faible sensibilité (104) notamment en présence de flore interférente. De plus, elle ne permet pas non plus l'identification des légionelles viables mais non cultivables potentiellement pathogènes (104, 105). De ce fait, plusieurs techniques alternatives ont aussi été développées pour tenter de réduire le délai de rendu des résultats (7) et améliorer la sensibilité. A ce jour, la

seule méthode qui est normalisée et qui peut être mise en œuvre comme technique complémentaire par les laboratoires de microbiologie de l'environnement est la quantification par amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel.

Au cours de l'année 2015, il a été constaté à plusieurs reprises que la présence de flore interférente sur les milieux de culture empêchait le rendu de résultats interprétables pour la recherche de légionelles dans les eaux de TAR de l'hôpital.

Devant le risque constitué par la présence de ces installations au sein du CHU, il a paru essentiel de valider, pour mettre en place au sein du laboratoire d'hygiène, la PCR légionelle, afin de pouvoir s'assurer de l'absence de *L. pneumophila* même en présence de flore interférente. L'ensemble des résultats obtenus, suite à la vérification secondaire de la méthode, répond aux exigences de la norme NF T90-471 ce qui permet donc son utilisation en routine.

Au cours de cette validation, la vérification de la droite de calibrage, des limites de quantification et de détection n'ont pas posé de problèmes particuliers. En revanche, des difficultés ont été rencontrées pour la vérification du rendement et de la robustesse, puisque initialement certains rendements étaient inférieurs à 25 % ; ceci pouvant s'expliquer par la perte de légionelles pendant l'extraction. En effet, cette technique d'extraction est relativement complexe puisqu'elle nécessite une filtration sur membrane puis un essorage de la membrane contre la paroi du tube ce qui entraine une perte de légionelles à chaque étape. Cette perte de légionelles peut également s'expliquer par la présence de minéraux, de micro-organismes présents dans les eaux de tours aéroréfrigérantes qui vont s'accumuler sur la membrane et rendre l'essorage de la membrane plus compliqué. La perte de légionelles a aussi été constatée pour certaines eaux minérales ce qui peut être expliqué par la complexité du processus d'extraction ou d'une lyse de l'ADN insuffisante. Pour d'autres échantillons dopés provenant de tours aéroréfrigérantes les résultats étaient diminués ou négatifs du fait de la présence d'inhibiteurs. A la suite de ces difficultés, un des référents qualité du fournisseur a été contacté et nous a confirmé que de nombreux laboratoires avaient rencontrés ces problèmes du fait de cette étape d'extraction. Il nous a été conseillé de refaire les échantillons jusqu'à obtenir des résultats conformes, ce qui a été réalisé.

Compte tenu de la réglementation, et en raison du coût important des réactifs, il a été décidé initialement de ne pas réaliser la vérification de méthode pour *L. spp*. En effet, le cout global pour 48 échantillons est d'environ 2000 euros et la vérification complète de la méthode nécessite une quantité importante de réactifs puisque pour réaliser la vérification de *L. pneumophila* dans les eaux de TAR, trois kits iQ-Check™ Quanti *L. pneumophila* de PCR et un coffret d'extraction Aquadien™ ont été utilisés pour un nombre d'échantillon total de 134 (avec contrôles et standards).
Toutefois, les données obtenues pourront être utilisées lors de la validation de la méthode sur les eaux chaudes sanitaires à l'exception du rendement et de la robustesse qui devraient être réévalués avec cette nouvelle matrice.

Concernant la troisième partie de ce travail, il s'agissait de vérifier si des légionelles non mises en évidence par la culture en raison d'une flore interférente importante, pouvaient être détectées et quantifiées par PCR. En l'absence de flore interférente dans les tours au moment de ce travail, la flore a dû être reconstituée pour doper les prélèvements. Pour tous les échantillons testés, la PCR a permis la détection et la quantification de *L. pneumophila* malgré la présence de flore interférente. Pour la flore constituée de *S. maltophila*, *P. putida*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* et *B. spp* (flore n°1), le résultat de la quantification correspondait à la quantité de légionelles inoculées. Pour la flore constituée de *P. spp* et *P. aeruginosa* (flore n°2) la quantité de légionelles était diminuée par rapport à la quantité inoculée, ce qui peut être expliqué par la filtration difficile de l'eau dopée par le *P.spp* et *P. aeruginosa*, ce qui a pu entraîner la perte de légionelles. La culture pour la flore n°1 n'a pas permis de détecter les légionelles. Pour la flore n°2, *L. pneumophila* a été tout de même détectée mais en quantité sous-estimée, très en dessous du seuil d'alerte contrairement à la PCR. La PCR présente cependant quelques inconvénients tels que le coût des réactifs, la détection de cellules non viables (104, 105, 109), l'absence d'identification du sérogroupe et des valeurs cibles qui ne sont pas encore réglementairement définies (7).

Au final, la qPCR appliquée à la détection et quantification de *L. pneumophila* dans les eaux de TAR apparaît comme une bonne alternative à la méthode conventionnelle puisqu'elle

est plus sensible que la culture mais aussi beaucoup plus rapide. Elle permet donc de déclencher plus rapidement des mesures curatives et correctives en cas de contamination des installations afin d'éviter d'éventuels cas de légionellose. Ainsi, à l'avenir, sous réserve d'un complément de validation, le laboratoire pourra également envisager d'étendre l'utilisation de la qPCR aux eaux chaudes sanitaires. Ceci en complément de la surveillance réglementaire par culture qui reste indispensable lors d'investigation après la découverte d'un ou plusieurs cas de légionellose, afin d'isoler la souche et de pouvoir la comparer aux souches cliniques.

Bibliographie

1. Baudart J, Parthuisot N. Les légionelles. Revue Francophone Des Laboratoires. 2014 ; (459), 57–68.

2. Campèse C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud, S. Legionnaires' disease in France. Medecine et Maladies Infectieuses. 2015 ; 45(3), 65–71.

3. Haut conseil de la santé publique. Risque lié aux légionelles guide d ' investigation et d ' aide à la gestion. 2013. http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=400, consulté le 28 mai 2016.

4. Ha T L. La légionellose : un risque environnemental. Archives Des Maladies Professionnelles et de l'Environnement. 2006 ; 67(4), 669–678.

5. Jarraud S, Reyrolle M, Etienne, J. Diagnostic des légionelloses. Revue Française Des Laboratoires. 1999 ; (312), 119–124.

6. Philippe C, Blech MF, Hartemann P. Multiplication intra-amibienne de Legionella pneumophila et rôle potentiel des amibes dans la transmission de la légionellose. Médecine et Maladies Infectieuses. 2006 ; 36(4), 196–200.

7. Anses. Méthode de détection et de dénombrement de Legionella dans l'eau. Rapport d'expertise collective. 2011. https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2009sa0330Ra.pdf consulté le 05 décembre 2015.

8. Levi Y. Ecologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de Legionella pneumophila. Revue Française Des Laboratoires 2001 ; (336), 33-37.

9. Declerck P. Biofilms : The environmental playground of Legionella pneumophila. Environmental Microbiology. 2010 ; 12(3), 557–566.

10. INVS. Distribution du nombre de cas de légionellose en France 2015-2016. http://invs.santepubliquefrance.fr/%20fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees-de-surveillance, consulté le 02 juillet 2016.

11. Drevon J, Navellou J, Piton G, Capellier G. Légionellose. MAPAR. 2006 ; 577–587.

12. Jarraud AS, Reyrolle M, Meugnie H, Etienne J. Légionellose. Encyclopédie Orphanet. 2007.

13. Zahar JR, & Kouatchet A. Les légionelloses : mise au point. Société de Réanimation de Langue Française. 2008 ; 17(3), 206–212.

14. Jarraud S, Laurence C. *Legionella spp*. Référentiel en microbiologie médical 5ème édition. 2015.

15. Jarraud S, Girardo P, Reyrolle M, Etienne J. Legionella. Microbes-edu http://www.microbes-edu.org/professionel/Legionella/legion.html, consulté le 09 décembre 2016.

16. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Journal of Clinical Microbiology. 2002 ; 15(3), 506–526.

17. Centre national de référence des légionelles. Typage moléculaire de légionelles à la recherche de la source de contamination. Fiche d'information. http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=2379089, consulté le 19 mai 2016.

18. Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F et al. Contribution of amoebic coculture to recovery of Legionella isolates from respiratory samples : Prospective analysis over a period of 32 months. Journal of Clinical Microbiology. 2012 ; 50(5), 1725–1726.

19. AFSSAPS. Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte. 2012. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/5e0a0a6ce0725ba42387dc31a14551eb.pdf, consulté le 05 décembre 2015.

20. Ministère de la santé et des sports. 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. Journal officiel de la république française du 09 février 2010.

21. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. Arrété du 14 décembre 2013 A relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l' enregistrement au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l ' environnement. Journal officiel de la république française du 24 décembre 2013.

22. SFHH. Surveiller et prévenir les infections associées aux soins. Hygiènes 2010 ; vol. XVIII-n°4.

23. Article R.3113-4. 1er avril 2010. Code de la santé publique.

24. Article R3113-1. 27 mai 2003. Code de la santé publique.

25. Décret n°2001-671 du 26 juillet 2001 relatif à la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de santé et modifiant le code de la santé publique (deuxième partie : Décrets en Conseil d'Etat). Journal officiel de la république française du 28 juillet 2001.

26. Instrucion n° DGOS/PF2/DGS/RI3/2012/75 du 13 février 2012 relative au signalement externe des infections nosocomiales par les établissements de santé et les structures mentionnées à l'article R.6111-12 du code de la santé publique ainsi qu'aux modalité de gestion des situations signalées.

27. Centre national de référence des légionelles à lyon. http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr/.

28. European Centre for Disease Prevention and Control. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) : Operating procedures.Stockholm : ECDC ; 2012.

29. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. Legionella et tours aéroréfrigérantes, guide de bonnes pratiques. 2001 ; 1–54.

30. CETIAT, Ministère de l'écologie et du développement durable. Les différents procédés de refroidissement d'eau dans les installations industrielles et tertiaires guide technique. 2005 http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/guide_refroidissement.pdf consulté le 14 juin 2016.

31. CLIMESPACE, Ministère de l'écologie et du développement durable. Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissements par dispersion d'eau dans un flux d'air. 2005

http://www.installationsclassees.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Module_1-_Legionelles_et_installations-157M1.pdf consulté le 14 juin 2016.

32. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. 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. 1994 ; 60(5), 1585–1592.

33. Bentham RH, Broadbent CR. A model for autumn outbreaks of Legionnaires ' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. Epidemiology and Infection. 1993 ; 287–295.

34. Conza L, Casati S, Limoni C, Gaia V. Meteorological factors and risk of community-acquired Legionnaires ' disease in Switzerland : an epidemiological study. BMJ 2013 ; 1–6.

35. Hicks L, Rose Jr C, Fields B, Drees M, Engel J, Jenkins P, Whitney C. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. Epidemiology and Infection. 2007 ; 811–817.

36. Karagiannis I, Brandsema P, Van Der Sande M. Warm , wet weather associated with increased Legionnaires ' disease incidence in The Netherlands. Epidemiology and Infection. 2009 ; 181–187.

37. Brandsema P, Euser S, Karagiannis I, Den Boer J, Van Der Hoek W. Summer increase of Legionnaires' disease 2010 in The Netherlands associated with weather conditions and implications for source finding. Epidemiology and Infection. 2014 ; 1-12.

38. Cordes LG, Goldman WD, Marr JS, Friedman SM, Band JD, Rothschild EO et al. Legionnaires' disease in New York City, August-September 1978. Bulletin of the New York Academy of Medicine 1980 ; 56(5), 467–482.

39. Fisher-Hoch SP, O'H Tobin J, Nelson AM, Smith MG, Talbot JM, Bartlett CLR et al. Investigation and control of an outbreak of légionnaires' disease in a district general hospital. The Lancet. 1981 ; (3), 932–936.

40. Klaucke D, Vogt R, Larue D, Witherell L, Orciari L, Spitalny K, Novick L. Legionnaires Disease the Epidemiology of 2 Outbreaks in Burlington Vermont Usa 1980. American Journal of Epidemiology. 1984 ; 119(3), 382–391.

41. Morton S, Bartlett CL, Bibby LF, Hutchinson DN, Dyer JV, Dennis PJ Outbreak of legionnaires' disease from a cooling water system in a power station. British Journal of Industrial Medecine. 1986 ; 43(9), 630–635.

42. Friedman S, Spitalny K, Barbaree J. Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower. Journal of Public Health, 1987 ; 77(5), 568–572.

43. Report of an ad-hoc committee. Outbreak of legionellosis in a community. The Lancet. 1986 ; 2(8503), 380-383.

44. Winter JH, McCartney AC, Fallon RJ, Telfer ABM, Drury JK, Reece IJ, Timbury MC. Rapid diagnosis of an outbreak of Legionnaires' disease at Glasgow Royal Infirmary. Thorax. 1987 ; 42, 596–599.

45. Timbury MC, Donaldson JR, McCartney AC, Fallon RJ, Sleigh JD, Lyon D, Wilson TS. Outbreak of Legionnaires' disease in Glasgow Royal Infirmary: microbiological aspects. The Journal of Hygiene. 1986 ; 97(3), 393–403.

46. O'Mahony MC, Lakhanf A, Stephens A, Wallace JG, Youngs ER, Harper D. Legionnaires ' disease and the sick-building syndrome. Epidemiology and Infection.1989 ; 285–292.

47. O'Mahony MC, Stanwell-Smith RE, Tillett HE, Harper D, Hutchison JG, Farrell ID, Duggal H. V. et al. The Stafford outbreak of Legionnaires' disease. Epidemiology and Infection. 1990 ; 104(3), 361–80.

48. Hunt D, Cartwright KA, Smith M, Middleton J, Bartlett CLR, Lee JV et al. An outbreak of legionnaires' disease in Gloucester. Epidemiology and Infection. 1991 ; 133–141.

49. Addiss DG, Davis JP, LaVenture M, Wand PJ, Hutchinson MA, McKinney RM. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of Legionella pneumophila. American Journal of Epidemiology. 1989 ; 130(3), 557–568.

50. Ring BA. Legionnaires' Disease: The Wollongong Experience. Australian Journal of Physiotherapy, 1989 ; 35(3), 167–176.

51. Mitchell E, O'Mahony MC, Watson JM, Lynch D, Joseph C, Quigley C et al. Two outbreaks of Legionnaires' disease in Bolton Health District. Epidemiology and Infection. 1990 ; 104(2).

52. Shelton BG, Flanders WD, Morris GK. Legionnaires' disease outbreaks and cooling towers with amplified Legionella concentrations. Current Microbiology. 1994 ; 28, 359–363.

53. Keller DW, Hajjeh R, DeMaria A, Fields BS, Pruckler JM, Benson RS et al. Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit Legionella species. Clinical Infectious Disease. 1996 ; 22(2), 257–261.

54. Bell JC, Jorm LR, Capon AG. Legionellosis linked with a hotel car park how many were infected? Epidemiology and Infection. 1996 ; 116, 185–192.

55. Whitney CG, Hofmann J, Pruckler JM, Benson RF, Fields BS, Bandyopadhyay U et al. The role of arbitrarily primed PCR in identifying the source of an outbreak of Legionnaires' disease. Journal of Clinical Microbiology. 1997 ; 35(7), 1800–1804.

56. Brown CM, Nuorti PJ, Breiman RF, Hathcock AL, Fields BS, Lipman HB et al. A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. Int J Epidemiol. 1999 ; 28(2), 353–359.

57. Castellani Pastoris M, Ciceroni L, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Flego G et al. Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1997 ; 16(12), 883–892.

58. Heath TC, Roberts C, Jalaludin B, Goldthorpe I, Capon AG. Environmental investigation of a legionellosis outbreak in western Sydney: The role of molecular profiling. Australian and New Zealand Journal of Public Health. 1998 ; 22(4), 428–431.

59. Paradis R, Boulianne N, Allaire S et Gauvain D. Epidémie de légionellose dans la région de Québec Mai-juin 1996. Rapport d'enquète épidémiologique et environnementale.

Centre de Santé Publique de Québec. 1997
http://www.santecom.qc.ca/Bibliothequevirtuelle/santecom/35567000007176.pdf consulté le 16 juin 2016.

60. Formica N, Tallis G, Zwolak B, Carnie J, Beers M. Legionnaires' disease outbreak : Victoria's largest identified outbreak. Commun Dis Intell. 2000 ; 199–202.

61. Fernández JA, López P, Orozco D et Merino J. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, southeastern Spain. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002 ; 21(10), 729–735.

62. Jansà JM, Caylà JA, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador et al. An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: Importance of the first 24 hours in the investigation. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2002 ; 6(9), 831–838.

63. Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon I et al. An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: Investigation and case-control studies. Medical Journal of Australia 2004 ; 180(11), 566–572.

64. Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzalez-Diego P, Jiménez-Bunuales T et al. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerging Infectious Diseases. 2003 ; 9(8), 915–921.

65. Sabria M, Alvarez J, Dominguez A, Pedrol A, Sauca G, Salleras L et al. A community outbreak of Legionnaires' disease : Evidence of a cooling tower as the source. Clinical Microbiology and Infection. 2006 ; 12(7), 642–647.

66. Bennett E, Ashton M, Calvert N, Chaloner J, Cheesbrough J, Egan J, et al. Barrow-in-Furness: a large community legionellosis outbreak in the UK. Epidemiology and Infection. 2014 ; 142(8), 1763–77.

67. Gilles C, Rivière D, Breton I, Cassel A, Doucelin D, Claude J et al. Investigation de cas groupés de légionellose dans l ' agglomération de Poitiers. INVS. 2003.

68. Rota MC, Pontrelli G, Scaturro M, Bella A, Bellomo AR, Trinito MO et al. Legionnaires' disease outbreak in Rome, Italy. Epidemiology and Infection. 2005 ; 133(05), 853.

69. Kirrage D, Reynolds G, Smith GE, Olowokure B. Investigation of an outbreak of Legionnaires' disease: Hereford, UK 2003. Respiratory Medicine. 2007 ; 101(8), 1639–1644.

70. Nhu Nguyen TM, Ilef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D et al. A Community-Wide Outbreak of Legionnaires Disease Linked to Industrial Cooling Towers—How Far Can Contaminated Aerosols Spread? The Journal of Infectious Diseases. 2006 ; 193(1), 102–111.

71. Phares CR, Russell E, Thigpen MC, Service W, Crist MB, Salyers M et al. Legionnaires' disease among residents of a long-term care facility: The sentinel event in a community outbreak. American Journal of Infection Control. 2007 ; 35(5), 319–323.

72. Ulleryd P, Hugosson A, Allestam G, Bernander S, Claesson BEB, Eilertz I et al. Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden- epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. BMC Infectious Diseases. 2012 ; 12, 313.

73. Gilmour MW, Bernard K, Tracz DM, Olson AB, Corbett CR, Burdz T et al. Molecular typing of a Legionella pneumophila outbreak in Ontario, Canada. Journal of Medical Microbiology. 2007 ; 56(3), 336–341.

74. Sala MR, Arias C, Oliva JM, Pedrol A, Roura P, Dominguez, A. Community outbreak of Legionnaires disease in Vic-Gurb, Spain in October and November 2005. Eurosurveillance. 2007 ; 12.

75. InVS. Cas groupés de légionellose , Rennes Décembre 2005 - Janvier 2006. 2006. http://invs.santepubliquefrance.fr//publications/2006/legionellose_rennes/index.html consulté le 29 juin 2016.

76. Dejour Salamanca D, Thos A, Pavageau Y, Cosson C. (2006). Cas groupés de légionellose, Paris-Austerlitz. InVS.

77. Sonder G, Van Den Hoek J, Bovée L, Worp J, Du Ry Van Beest Holle M, Van Steenbergen J et al. Changes in prevention and outbreak management of legionnaires' disease in the Netherlands between two large outbreaks in 1999 and 2006. Eurosurveillance. 2008.

78. Castilla J, Barricarte A, Aldaz J, García Cenoz M, Ferrer T, Pelaz C et al. A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality. Epidemiology and Infection. 2008 ; 136(6), 823–32.

79. Von Baum H, Härter G, Essig A, Lück C, Gonser T, Embacher A, Brockmann S. Preliminary report: outbreak of Legionnaires disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009 - January 2010. Eurosurveillance. 2010.

80. Lévesque S, Plante PL, Mendis N, Cantin P, Marchand G, Charest H et al. Genomic characterization of a large outbreak of Legionella pneumophila serogroup 1 strains in Quebec City, 2012. Plos One. 2014 ; 9(8).

81. McCormick D, Thorn S, Milne D, Evans C, Stevenson J, Llano M et Donaghy M. Public health response to an outbreak of Legionnaires' disease in Edinburgh, United Kingdom, June 2012. Eurosurveillance. 2012 ; 17(28), 1–4.

82. Taouqi M, et Bassi C. Investigation d ' un épisode de cas groupés de légionellose dans les Hauts-de-Seine. InVS. 2012.

83. Burckhardt F, Brion A, Lahm J, Koch H, Prior K, Petzold M et al. Confirming Legionnaires ' Disease Outbreak by. Emerging Infectious Diseases. 2016 ; 22(7).

84. Maisa A, Brockmann A, Renken F, Lück C, Pleischl S, Exner M et al. Epidemiological investigation and case–control study: A legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, august–september 2013. Eurosurveillance. 2015 ; 20(46), 1-9.

85. Shivaji T, Sousa Pinto C, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J et al. A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. Eurosurveillance. 2014 ; 19(50), 1-4.

86. Astagneau P, Boulanger JM, Perronne C, Tricard D. Rapport de la mission d'expertise sur la maîtrise du risque de légionnellose à l'hôpital Européen Georges Pompidou. Rapport n° 2001.043. 2001. http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/014000304.pdf.

87. Ministère de la santé et des solidarités. 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. JO du 15 décembre 2005.

88. AFNOR. 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. NFT 90-431. 2014.

89. Centre scientique et technique du batiment. Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. 2012. http://www.aldeau.com/description_ouvrage.php?id=19, consulté le 10 juillet 2016.

90. Direction générale de la santé. 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.

91. Farhat M, Trouillé M, Briand E, Moletta-Denat, M, Robine E, Fre J. Development of a pilot-scale 1 for Legionella elimination in biofilm in hot water network : heat shock treatment evaluation. Journal of Applied Microbiology. 2010 ; 108(2002), 1073–1082.

92. Mouchtouri V, Velonakis E, Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals , and athletic venues hot water distribution systems contaminated by Legionella species. AJIC. 2007 ; 35, 623–627.

93. Miuetzner S, Farley A, Wald ER, Ge JH. Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling Legionella pneumophila in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. AJIC. 1997 ; 25, 452–457.

94. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Lévi, Y. Amoebae in domestic water systems: Resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. Journal of Applied Microbiology. 2004 ; 97(5), 950–963.

95. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review - Efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Research. 2002 ; 36(18), 4433–4444.

96. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. Arrêté du 14 décembre 2013 B relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement. Journal officiel de la république française du 24 décembre 2013.

97. ISO. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais NF EN ISO / CEI 17025. 2005.

98. Ministère de l'écologie et du développement durable. Traitements pour la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissement. 2006. http://www.pays-de-la-loire.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Guide_traitement_2006.pdf, consulté le 10 juillet 2016.

99. Décret n° 2008-1401 du 19 décembre 2008 relatif à l'accréditation et à l'évaluation de conformité pris en application de l'article 137 de la loi n° 2008-776 du 4 août 2008 de modernisation de l'économie.

100. AFNOR. Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR). NF T90-471. 2015.

101. MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA. Test Kit. Bio-Rad®. 32514.

102. *Legionella* Latex Test. Oxoïd®. DR0800M

103. Denis F, Ploy MC. Diagnostic rapide en bactériologie par recherche d'antigènes. Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2ème édition Elsevier Masson. 2011.

104. Tronel H, Hartemann P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and Legionella spp. Letters in Applied Microbiology. 2009 ; 48(6), 653–656.

105. Díaz-Flores Á, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I et al. Comparing methods of determining Legionella spp. in complex water matrices. BMC Microbiology. 2015 ; 15(1), 91.

106. García MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Kwaik YA. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. Environmental Microbiology. 2007 ; 9, 1267–1277.

107. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology. 1997 ; 63(10), 3741–3751.

108. iQ-Check™ Quanti L. pneumophila. Rapport de synthèse.

109. Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre J. Viability PCR , a Culture-Independent Method for Rapid and Selective Quantification of Viable Legionella pneumophila Cells in Environmental Water Samples. Applied and Environmental Microbiology. 2009 ; 75(11), 3502–3512.

110. Ditommaso S, Ricciardi E, Giacomuzzi M, Arauco Rivera SR, Zotti CM. Legionella in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? Molecular and Cellular Probes. 2015 ; 29(1), 7–12.

111. Scaturro M, Fontana S, Dell'eva I, Helfer F, Marchio M, Stefanetti MV et al. A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect Legionella in water samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2016 ; 85, 283–288.

112. Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable Legionella cells. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2010 ; 63(2), 119–123.

113. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2001 ; 67(9), 3985–3993.

114. Buchbinder S, Trebesius K, Heesemann J. Evaluation of detection of Legionella spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. International Journal of Medical Microbiology : IJMM. 2002 ; 292(3-4), 241–245.

115. Levi K, Smedley J, Towner KJ. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of Legionella pneumophila in hospital and environmental water samples. European Society of Clinical Infectious Diseases. 2003 ; 9(7), 754–758.

116. Yanez MA, Nocker A, Soria-Soria E, Mùrtula R, Martinez L, Catalan V. Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods. 2011 ; 85(2), 124–130.

117. Yanez MA, Barbera VM, Catalan V. Validation of a new seminested PCR-based detection method for Legionella pneumophila. Journal of Microbiological Methods 2007 ; 70, 214–217.

118. Al-Matawah QA, Al-Zenki SF, Qasem JA, Al-Waalan TE, Ben Heji AH. Detection and Quantification of Legionella pneumophila from Water Systems in Kuwait Residential Facilities. Journal of Pathogens. 2012.

119. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B, Ollevier F. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples. Journal of Microbiological Methods. 2007 ; 68, 137–144.

120. Bonetta S, Ferretti E, Balocco F, Carraro E. Evaluation of Legionella pneumophila contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. Journal of Applied Microbiology. 2010 ; 108(5), 1576–1583.

121. Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples. Journal of Applied Microbiology. 2015 ; 119(4).

122. Ditommaso S, Ricciardi E, Giacomuzzi M, Arauco Rivera SR, Ceccarelli A, Zotti CM. Overestimation of the Legionella spp. load in environmental samples by quantitative real-time PCR: Pretreatment with propidium monoazide as a tool for the assessment of an association between Legionella concentration and sanitary risk. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2014 ; 80(4), 260–266.

123. Fittipaldi M, Codony F, Morató J. Comparison of conventional culture and real-time quantitative PCR using SYBR Green for detection of Legionella pneumophila in water samples. www.wrc.org.za. 2010 ; 36(4), 417–424.

124. Krøjgaard LH, Krogfelt KA, Albrechtsen HJ, Uldum SA. Detection of Legionella by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. BMC Microbiology. 2011 ; 11(1), 254.

125. Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. Journal of Applied Microbiology. 2011 ; 110(4), 1032–1044.

126. Morio F, Corvec S, Caroff N, Le Gallou F, Drugeon H, Reynaud A. 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. 2008 ; 211(3-4), 403–411.

127. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of Legionella in clinical and environmental samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2008 ; 62, 125–132.

128. Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, et al. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of Legionella pneumophila in water systems. Applied and Environmental Microbiology. 2007 ; 73(5), 1452–1456.

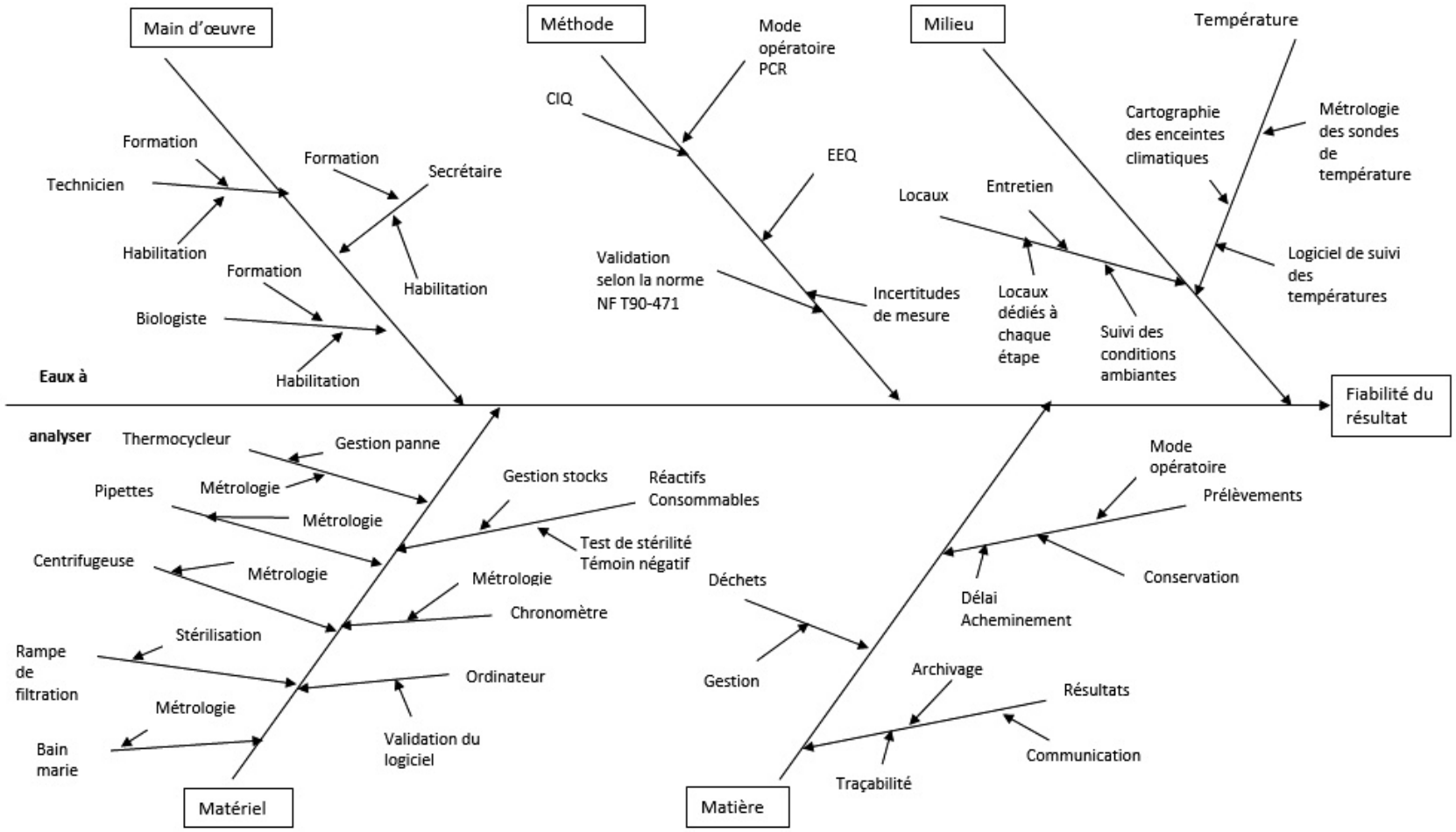
129. Fiume L, Sabattini MAB, Poda G. Detection of Legionella pneumophila in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. Letters in Applied Microbiology. 2005 ; 470–475.

130. Yanez MA, Carrasco-Serrano C, Barbera VM, Catalan V. Quantitative Detection of Legionella pneumophila in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of the dotA Gene. Applied and Environmental Microbiology. 2005 ; 71(7), 3433–3441.

131. Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Specific Detection of Viable Legionella Cells by Combined Use of. Applied and Environmental Microbiology. 2009 ; 75(1), 147–153.

132. Guillemet TA, Lévesque B, Gauvin D, Brousseau N, Giroux JP, Cantin P. Assessment of real-time PCR for quantification of Legionella spp. in spa water. Letters in Applied Microbiology. 2010 ; 51(6).

Annexe n° 1 : diagramme d'Ishikawa



Annexe n°2 : mode opératoire de la PCR

	Type	Réf. Modèle	Réf. Documentaire	Version	Appliqué(e) le
CHU Hôpitaux de Rouen	**04- Mode pératoire (2 signatures)**	**003**	**11802**	**13/09/2016**	**<NE PAS MODIFIER>**
	Pôle Biologie Clinique\microbiologie\hygiène hospitalière				

Labo Hygiène – Recherche de Légionelle Par PCR temps réel

Description de la dernière évolution :		
Nouvelle technique		
	Rédaction	**Approbation**
Nom(s) et fonction(s)	Maud RECHER (Gedi : Rédacteur - CHU\Pôles - Directions\Pôles Médicaux\Biologie Clinique\Microbiologie\Hygiène Hospitalière)	Lise GOURICHON (Gedi : Approbateur - CHU\Pôles - Directions\Pôles Médicaux\Biologie Clinique\Microbiologie\Hygiène Hospitalière
Date	**13/09/2016 16:15:51**	**13/09/2016 16:19:20**

Sommaire

1 Objet 1
2 Domaine d'application 1
3 Référence(s) et document(s) associé(s) 1
3.1 Référence(s) 1
3.2 Document(s) associé(s) 2
4 Définitions et abréviations 2
5 Responsabilités et personne(s) ressource(s) 2
5.1 Responsabilités 2
6 Contenu 2
6.1 Principe 2
6.2 Extraction 2
6.3 Préparation des mix 6
6.4 Réalisation de la PCR 9
Logigramme 8

1 Objet

Ce mode opératoire décrit la technique de recherche de Legionella par PCR en temps réel

2 Domaine d'application

Cette technique peut-être utilisée pour un screening rapide d'un bâtiment ou d'un service et s'applique à tous les types d'eaux : eaux chaudes sanitaires, Tours aéroréfrigérantes…

3 Référence(s) et document(s) associé(s)

3.1 Référence(s)

3.1.1 Liens vers des documents internes

- Mise en culture de Legionella à partir de prélèvements d'eau propre

3.1.2 Références externes

- Norme AFNOR NF T90-471

3.2 Document(s) associé(s)

Guide d'utilisation du kit Aquadien

Définitions et abréviations

PCR : reaction chain polymerase : réaction en chaine par polymérase

5 Responsabilités et personne(s) ressource(s)

5.1 Responsabilités

Technicien de laboratoire

6 Contenu

6.1 Principe

La PCR en temps réel est une technique de biologie moléculaire qui permet une recherche et une quantification d'ADN spécifique.
Elle utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN grâce à une gamme étalon.
C'est une technique rapide qui permet d'effectuer une analyse en moins de 24H.

NB : la biologie moléculaire nécessite le **port de gant obligatoire en nitrile ou en vinyle sans poudre** pour toute manipulation afin d'éviter des contaminations.

6.2 Extraction

6.2.1 Matériel

- Kit d'extraction Aquadien
- Pinces en acier inoxydable stériles
- Pipettes dédiées : 10 µl, 20 µl, 200 µl et 1000 µl
- Pointes stériles avec filtres
- Agitateur magnétique
- Bain marie
- Centrifugeuse
- Vortex
- Membranes en polycarbonate de porosité nominale 0.45 µm.
- Entonnoirs stériles 250 ml

6.2.2 Lyse

Dans le laboratoire d'hygiène :
Allumer le bain marie à 95°C

- **Etape 1 :**

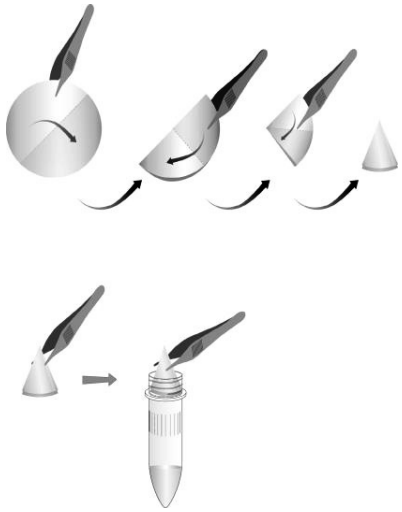
Sous un PSM :
Mettre sur un agitateur magnétique sous la hotte le tampon R1.
Préparer autant de cryotubes du coffret que d'échantillon.
Distribuer 2ml de Tampon R1dans chacun des cryotubes à l'aide de la pipette dédiée (pipette de 1000µl).

Placer un entonnoir puis filtrer 100mL d'eau stérile exempte d'ADN de Legionella sur la rampe de filtration. Enlever les entonnoirs et mettre sur les têtes de filtration de l'éthanol à 70°C. Flamber la rampe afin de la décontaminer. Cette opération est à répéter entre chaque échantillon filtré.

Placer une membrane en polycarbonate sur chaque tête de filtration et un entonnoir.
Dans la mesure du possible, filtrer 1 Litre de l'échantillon comme décrit dans le mode opératoire " Mise en culture de Legionella à partir de prélèvements d'eau propre ".

- **Etape 2 :**

A l'aide d'une pince stérile plier la membrane de filtration en 2, trois fois de suite afin d'obtenir un cône
Introduire ce cône, pointe vers le haut, dans le cryotube.



Bien vortexer pendant 20 sec.
Vérifier que la membrane reste bien immergée dans la solution R1.

De la même façon, faire un témoin négatif en filtrant 500 ml de NaCl.
Faire un témoin positif en diluant une pastille dans 20 ml de Tryptone sel, reprendre 1,5 ml de cette solution dans un flacon de Tryptone sel. Filtrer les 100 ml.

- **Etape 3 :**

Placer les tubes 15 min dans le bain marie à 95°C +/- 5°C, fermer le couvercle.
Vortexer pendant 20 sec.
Essorer la membrane, à l'aide d'un cône stérile de 1 ml, le long de la paroi du cryotube afin de récupérer tout le lysat.
Jeter la membrane à l'aide de la pince.

- **Etape 4 :**

Laisser refroidir les tubes à température ambiante pendant 20 min minimum le temps que la résine du réactif R1 sédimente.
Vérifier que le tube est à température ambiante avant de passer à l'étape de purification.
L'ADN est contenu dans les 1,6 ml de surnageant.

6.2.3 Purification

En parasitologie, pièce d'extraction. Mettre une surblouse et des gants. Allumer la hotte.

- **Etape 5 :**

Préparer autant de colonne de purification que d'échantillon, les placer dans un tube collecteur.
Noter le numéro sur le bouchon du tube.
Prélever 500µl de surnageant (Attention! Ne pas prélever de résine) à l'aide du matériel dédié sous la hotte et le déposer sur la colonne.

Rq : lors du pipetage, si de la résine est prélevée, relâcher les 500µL dans le cryotube et laisser sédimenter durant 5min.
Fermer chaque colonne avec le bouchon du tube collecteur.
Centrifuger 10 min à 6000g ou RCF à 20°C de préférence (en cas de colmatage augmenter le temps de centrifugation sans augmenter la vitesse de centrifugation).
Vider le tube collecteur.

- **Etape 6 :**

Déposer à nouveau 500µL de surnageant sur la colonne de purification.
Centrifuger 10 min à 6000g ou RCF à 20°C de préférence.
Rq : Vérifier que tout le surnageant est bien passé au travers de la colonne. Dans le cas contraire, centrifuger à nouveau.
Vider le tube collecteur.

6.2.4 Elution

- **Etape 7 :**

Déposer 100µL de R2 dans la colonne de purification.
Couvrir la colonne d'un tube collecteur propre et annoté, et retourner l'ensemble en faisant en sorte que la colonne passe du tube collecteur sale au tube collecteur propre.
Jeter le tube collecteur sale.
Centrifuger 3min à 1000g ou RCF. A cette étape, le bouchon ne peut être fermé.
Jeter la colonne de purification.

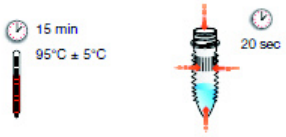
Conserver le tube de récupération contenant les 100µL d''extrait d'ADN.
Il peut-être utilisé directement en PCR ou peut-être congelé à –20°C dans la boite Legionella situé dans le dernier tiroir du congélateur.

Pour l'EEQ AGLAE, prévoir éventuellement une dilution des échantillons dans R2 au 1/100è ou au 1/1000è en cascade (90µl de R2 + 10µl d'échantillon dans des cryotubes de 2 ml).

Logigramme

- Distribuer 2 ml de tampon R1 dans un cryotube
- Placer une membrane en polycarbonate sur la rampe de filtration stérilisée, équipée d'un système de filtration sous vide
- Filtrer de 100 ml à 1 L d'eau

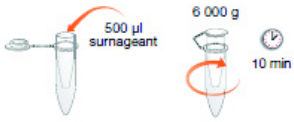
- Plier délicatement la membrane en deux, trois fois de suite
- A l'aide de pinces, placer la membrane dans le cryotube contenant 2 ml de tampon R1
- Vortexer pendant 20 sec



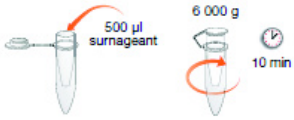
- Incuber pendant 15 min à 95°C ± 5°C dans un bain-marie
- Vortexer pendant 20 sec

- Retirer délicatement la membrane, l'essorer le long de la paroi du tube pour récupérer toute la solution
- Laisser refroidir le cryotube à température ambiante pendant 20 min. La résine du tampon R1 sédimente au fond du tube

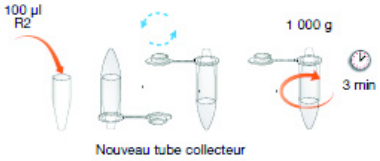
L'ADN est contenu dans les 1,6 ml de surnageant



- Placer une colonne de purification dans un tube collecteur
- Déposer 500 µl de surnageant sur la colonne de purification
- Centrifuger à 6 000 g pendant 10 min
- Vider le tube collecteur



- Déposer de nouveau 500 µl de surnageant sur la colonne de purification
- Centrifuger à 6 000 g pendant 10 min



- Ajouter 100 µl de la solution R2, jeter le tube collecteur
- Couvrir la colonne de purification avec un tube collecteur propre et retourner l'ensemble
- Centrifuger à 1 000 g pendant 3 min
- Jeter la colonne de purification

6.3 Préparation des mix

6.3.1 Matériel

- Kit IQ Check Legionella pneumophila
- Kit IQ Check Legionella spp
- Kit d'extraction Aquadien
- Echantillons extraits
- Pipettes dédiées : 10 µl, 20 µl, 100 µl et 1000 µl
- Pointes stériles avec filtres

6.3.2 Plan de plaque

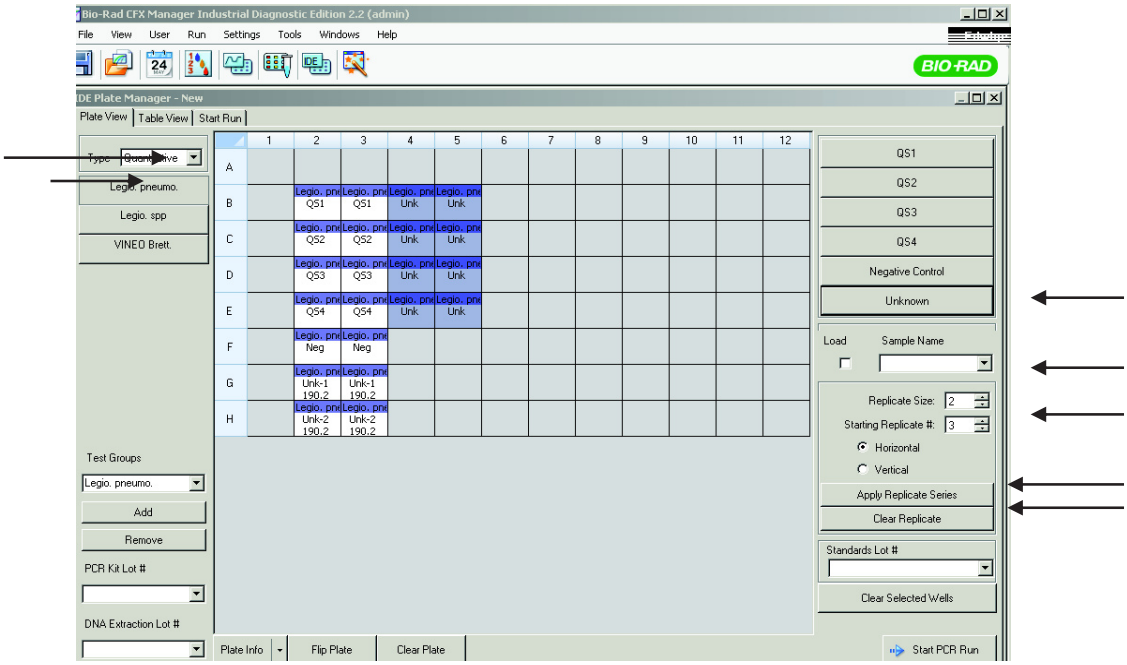
Il est préférable de préparer son plan de plaque au préalable :

Dans le bureau technicien, ouvrir le logiciel "Biorad CFX Manager IDE" en double cliquant sur l'icône.
Fermer la fenêtre "Block status".
Sélectionner dans la fenêtre à gauche "Type" le mode quantitatif dans le menu déroulant puis cliquer sur OK.
Cliquer en dessous sur "Legio. pneumo." puis OK.
Atttention : Ne pas cliquer sur Legio pneumo 1

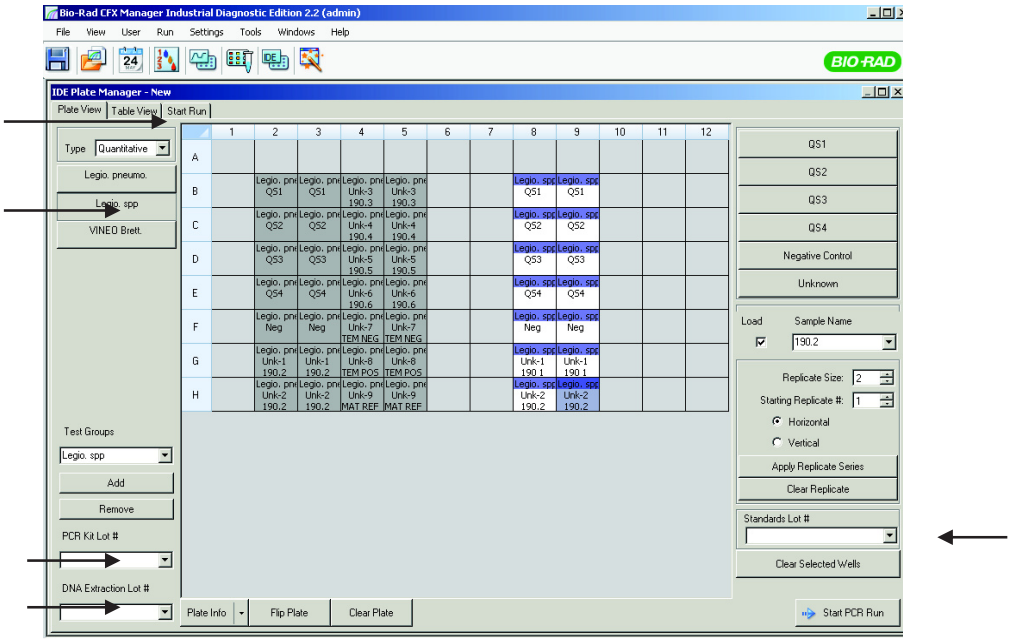
Sur le plan de plaque, dans la mesure du possible, éviter d'utiliser la ligne A et la colonne 1.
Dans le cas où le nombre d'échantillons excéderait 6, utiliser la ligne A et disposer alors les standards, témoin et échantillons verticalement.

Sélectionner deux puits B2 et B3 et cliquer sur "QS1" puis sélectionner à nouveau 2 puits en dessous et cliquer sur "QS2" et ainsi de suite jusqu'au "Negative control".
Sélectionner les puits restants des colonnes 2 et 3 et cliquer sur "Unknown", sélectionner le mode "horizontal" et cliquer sur la touche "Apple replicate Series".
Reprendre les 2 puits en G2 et G3 et saisir dans "Sample Name" le numéro de l'échantillon, cocher la case "load". Faire de même pour les puits H2 et H3.
Suivant le nombre d'échantillon à tester, sélectionner dans les colonnes 4 et 5 autant de lignes que nécessaire, cliquer sur "unknown" et dans "Starting replicate" indiquer 3. Cliquer sur "Apple replicate Series".
Reprendre les puits B4 et B5, rentrer le numéro d'échantillon, cliquer sur "load". Recommencer l'opération autant de fois que nécessaire. Terminer par l'échantillon "matériau de référence".
(Il est aussi possible de faire le plan de plaque en considérant les puits similaires de façon verticale et non pas horizontale.)

Remarque : En PCR quantitative ne pas utiliser le contrôle positif situé dans les coffrets IQ-Check Screen Legionella pneumophila ou spp.



Cliquer sur "Legio. spp" puis 2 fois sur OK.
Procéder de la même façon que précédemment pour les legionella spp.



Imprimer le plan de plaque : Faire un clic droit avec la souris, sélectionner "Print" puis "Landscape" puis de nouveau "Print" puis "Imprimer".

6.3.3 Calcul du volume réactionnel

Au préalable il est nécessaire de calculer les volumes, pour cela il faut connaître le nombre de puits pour chaque mix d'amorce : 8 puits pour la gamme (4x2)
2 puits pour le témoin négatif du coffret (1x2)
2 puits pour le matériau de référence (1x2)
X puits pour les échantillons (Xx2) (dont 1 témoin négatif d'extraction et 1 témoin positif d'extraction si nécessaire)
une marge de pipetage de 8%.

Voici le tableau d'aide au calcul suivant le nombre de puits :

Nombre de puits	Sondes fluo (µL)	Mélange d'amplification	**Nombre de puits**	Sondes fluo (µL)	Mélange d'amplification
12	**65**	**520**	**32**	**173**	**1380**
14	76	608	34	184	1470
16	**86**	**688**	**36**	**194**	**1550**
18	97	776	38	205	1640
20	**108**	**864**	**40**	**216**	**1730**
22	119	952	42	227	1820
24	**130**	**1040**	**44**	**238**	**1900**
26	140	1120	46	248	1980
28	**151**	**1200**	**48**	**259**	**2070**
30	162	1300	50	270	2160

6.3.4 Préparation du mix

En parasitologie, pièce des mix. Mettre une surblouse, se désinfecter les mains et mettre des gants. Allumer la hotte. Aucun matériel ne doit rentrer ou sortir.

Vérifier la présence de 2 tubes pour préparer les mix, éventuellement si le volume est trop important utiliser des cryotubes ou des tubes de prélèvements pour les endotoxines.
Distribuer d'abord le mélange d'amplification puis la sonde fluorescente pour chacun des 2 mix.
Attention : le contenant des réactifs leg spp et leg pneumophila est de la même couleur !!
Vortexer légèrement les réactifs et distribuer.

6.3.5 Répartition du mix

Vortexer légèrement les réactifs et distribuer d'abord celui ayant le volume le plus important.
Vortexer le mélange doucement en évitant les bulles.
Dessiner au feutre sur une plaque le plan précédemment fait au CFX 96.
Répartir 45 µl de mix selon le plan de plaque. Changer de pointe de pipette à chaque nouvelle colonne et vortexer à chaque nouvelle colonne.

6.3.6 Répartition des échantillons

En parasitologie, pièce d'extraction. Mettre une surblouse, se désinfecter les mains et mettre des gants. Allumer la hotte.

On utilise les mêmes standards pour les legionella pneumophila ou spp. Vérifier que la quantité de standards est suffisante avant de commencer les dépots.
Vortexer très délicatement les standards, centrifuger si nécessaire et distribuer 5 µl dans les puits correspondants. Distribuer au milieu du puits sans toucher les bords, aspirer et refouler plusieurs fois sans faire de bulle. Ne jamais pipeter au dessus des autres puits.
Distribuer ensuite 5 µL d'échantillon dans les puits correspondants. Coller le film plastique sur la plaque et déchirer les bords droit et gauche.

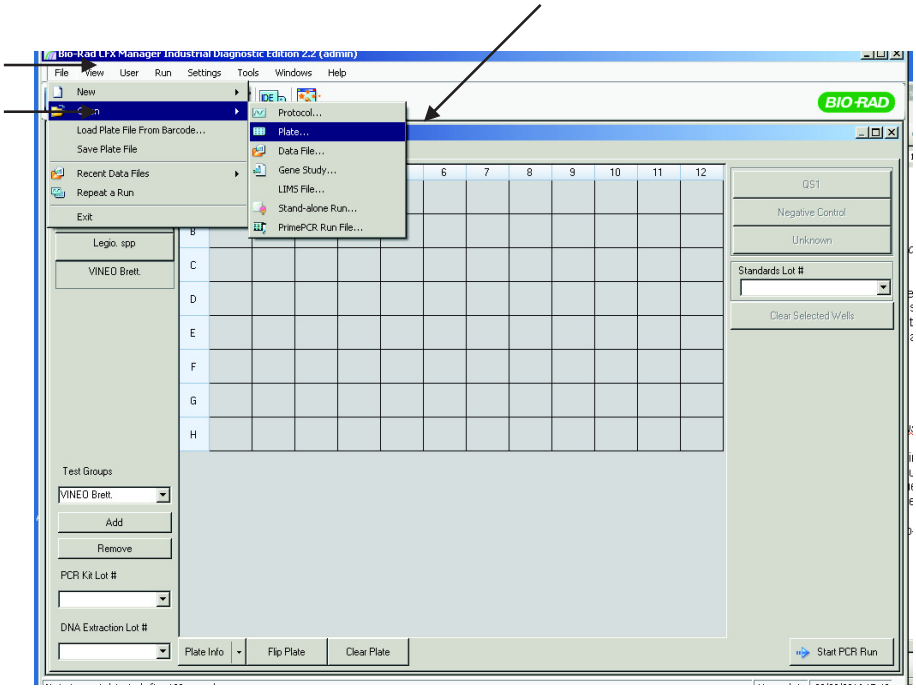
6.4 Réaction d'amplification

Revenir sur le plan de plaque établi dans le bureau des techniciens.
Inscrire le numéro de lot du kit d'extraction, de PCR et des standarts dans les cases correspondantes pour chacun des paramètres legionella pneumophila et spp.
Dans l'onglet "Table View", cliquer sur "Sample type" afin que les répliquats des standards ou échantillons se situent à la suite. Renseigner les valeurs des 4 standards ("Starting Quantity") ainsi que le volume filtré des échantillons s'il est différent de 1 litre (ex : 0.2 pour 200ml) et les dilutions (ex : 1000) si nécessaire dans chacune des 2 catégories legionella pneumophila et spp.
Transférer le plan de plaque sur une clef USB : Cliquer sur "File" en haut à gauche puis "save plate file". Enregistrer sur la clef USB et dans le dossier PCR (commun) sous le nom "année mois jour x PCR x Plaque" ex : 20160126 PCR Plaque.

En parasitologie, pièce des thermocycleurs Mettre une surblouse

Allumer le CFX 96 (interrupteur situé à l'arrière à droite) et l'ordinateur (mot de passe : CHU76).
Brancher la clé USB sur lequel se trouve le plan de plaque et ouvrir les dossiers présents.
Double cliquer sur le dossier du bureau du PC "labo hygiène" puis "plan de plaque".
Glisser le plan de plaque enregistré sur la clé dans le dossier de l'ordinateur.

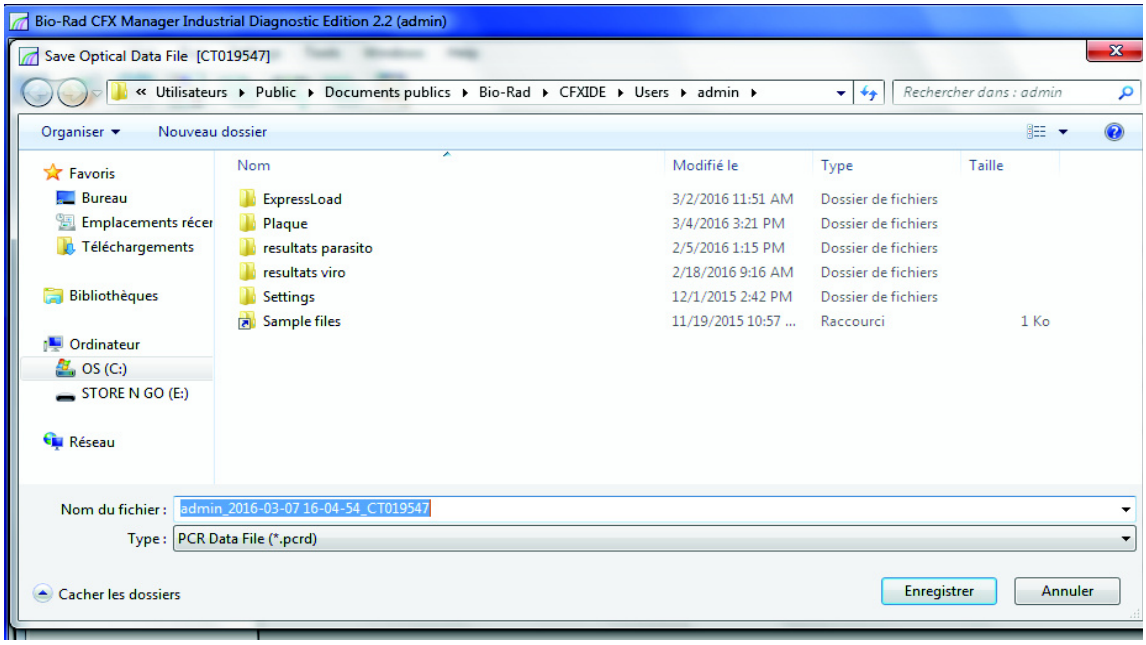
Revenir sur le menu précédent et double cliquer sur l'icône "Bio-Rad CFX Manager IDE".
Cliquer sur "File" puis "Open" et "Plate.



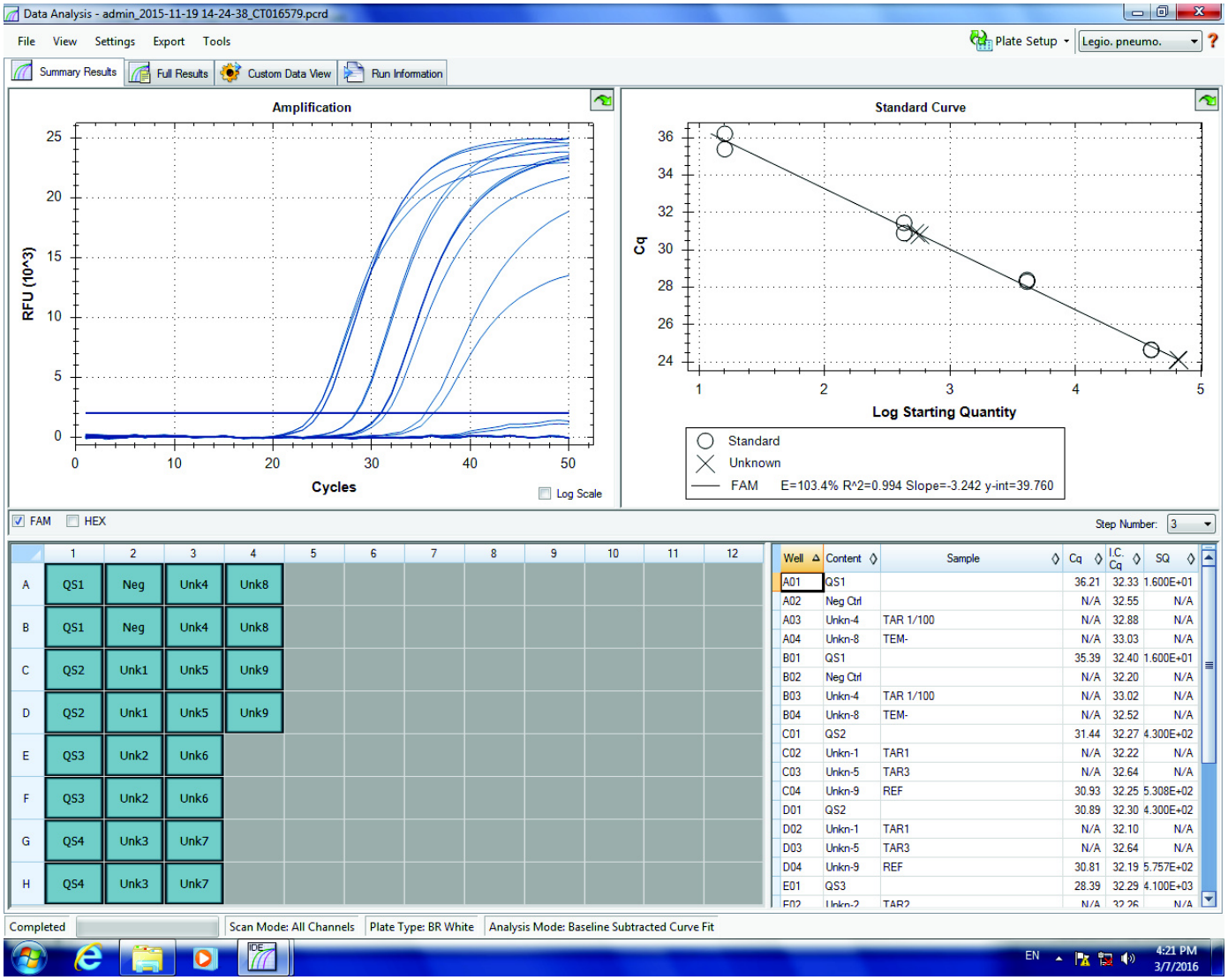
Une fenêtre "Open Plate" s'ouvre, cliquer sur "Bureau", "Labo d'hygiène" puis "Plan de plaque". Sélectionner le plan de plaque utilisé puis "ouvrir".

Mettre la plaque dans le CFX 96 (Puits A1 en haut à gauche) en appuyant sur le bouton devant l'appareil, refermer le couvercle en pratiquant de la même façon.

Cliquer sur "Start PCR Run", une fenêtre s'ouvre.
Rq : Tester la connection du PC et du CFX 96 : Fenêtre IDE Plate Manager du logiciel, cliquer sur "Start Run" puis sur "Open Lid". Si le couvercle ne s'ouvre pas, éteindre les deux appareils et les rallumer.



Cliquer sur "bureau", "labo hygiène" enfin "résultats" et enregistrer.
Lorsque la PCR est terminée, l'écran suivant apparaît :



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QS1	Neg	Unk4	Unk8								
B	QS1	Neg	Unk4	Unk8								
C	QS2	Unk1	Unk5	Unk9								
D	QS2	Unk1	Unk5	Unk9								
E	QS3	Unk2	Unk6									
F	QS3	Unk2	Unk6									
G	QS4	Unk3	Unk7									
H	QS4	Unk3	Unk7									

Well	Content	Sample	Cq	I.C. Cq	SQ
A01	QS1		36.21	32.33	1.600E+01
A02	Neg Ctrl		N/A	32.55	N/A
A03	Unkn-4	TAR 1/100	N/A	32.88	N/A
A04	Unkn-8	TEM-	N/A	33.03	N/A
B01	QS1		35.39	32.40	1.600E+01
B02	Neg Ctrl		N/A	32.20	N/A
B03	Unkn-4	TAR 1/100	N/A	33.02	N/A
B04	Unkn-8	TEM-	N/A	32.52	N/A
C01	QS2		31.44	32.27	4.300E+02
C02	Unkn-1	TAR1	N/A	32.22	N/A
C03	Unkn-5	TAR3	N/A	32.64	N/A
C04	Unkn-9	REF	30.93	32.25	5.308E+02
D01	QS2		30.89	32.30	4.300E+02
D02	Unkn-1	TAR1	N/A	32.10	N/A
D03	Unkn-5	TAR3	N/A	32.64	N/A
D04	Unkn-9	REF	30.81	32.19	5.757E+02
E01	QS3		28.39	32.29	4.100E+03

Pour exporter les résultats en version PDF, cliquer sur "tools" puis "reports", ne rien inscrire dans la fenêtre qui s'ouvre et valider en cliquant sur ok. Enregistrer alors les résultats PDF sur la clef, pour cela aller dans "fichier", "enregistrer sous" puis "fichier PDF". Cliquer sur "ordinateur" , sélectionner la clef et enregistrer les résultats sous le nom "année mois jour PCR leg pn résultat".

L'interprétation des résultats peut être revu avec un praticien référent.

Annexe n° 3 : critères de formation et d'habilitation à la qPCR légionelle

I – FORMATION INTERNE AU SERVICE

Programme de formation :

Le nouvel arrivant doit maîtriser l'ensemble des étapes de la PCR légionelles.
Enregistrement des prélèvements
Réalisation du plan de plaque
Filtration des eaux à analyser. Extraction de l'ADN, purification et dépôts des réactifs et ADN extrait sur la plaque.
Lancement d'une réaction d'amplification par le CFX 96
Lecture et analyse des résultats

Formations au poste de travail :

Tâches réalisées	Date	Nom et visa du formateur

II – CRITÉRES D'ÉVALUATION ET HABILITATION AU POSTE DE TRAVAIL

Décrire les critères d'évaluation de la formation dans chaque items pour tous les niveaux (ex: Les agents sont évalués à l'aide d'un QCM).
Annexes : *(Citez les éventuelles annexes : QCM, éléments de preuve…)*

Niveaux d'habilitation :
Niveau 1 = niveau d'habilitation utilisateur – niveau 2 = niveau d'habilitation utilisateur confirmé – 3 niveau d'habilitation référent ou expert

NIVEAU 1 : Utilisateur			
Critères d'habilitation *(préciser les critères applicables aux différents niveaux d'habilitation le cas échéant)*	**Evaluations**		
	Acquis	**Date**	**Visa formateur**
Documentation ▪ Connaissance mode opératoire de la PCR légionelle (GEDI 11802) ▪ Connaissance des normes NF EN ISO/CEI 17025 et NF T 90-471 ▪ Connaissance des règles de manipulations spécifiques à la biologie moléculaire en bactériologie et virologie (GEDI 15360)	☐		

Méthodes analytiques ▪ Connaissance des techniques analytiques et de leurs bornes ▪ Connaitre et maitriser les équipements nécessaires : rampe de filtration, bain marie, centrifugeuse, thermocycleur ▪ Maitriser les gestes techniques de filtration et de lyse ▪ Maitriser les gestes techniques de purification et d'élution ▪ Maitriser les gestes techniques de dépôts sur la plaque des réactifs d'amplifications, standards, contrôles et prélèvements ▪ Savoir faire fonctionner le thermocycleur ▪ Connaitre les mesures de précaution pour éviter la contamination du prélèvement par de l'ADN ▪ Maitriser les gestes d'asepsie	☐		
Contrôles de qualité ▪ Connaissance des contrôles nécessaires pour assurer la fiabilité des examens (CIQ / EEQ) ▪ Savoir réaliser les contrôles positifs et négatifs nécessaires à chaque série de PCR	☐		
Vérification analytique des examens ▪ Connaissance des règles de vérification analytique des examens ▪ Vérification de la validité de la PCR ▪ Vérification de la conformité du matériel	☐		

Système informatique de laboratoire (SIL) et autres logiciels Connaissance des applications suivantes : ▪ Logiciel BIORAD® pour la PCR ▪ Logiciel Dxlab® pour la saisie et édition des résultats ▪ Logiciel Evisense®	☐		

Si il y a plusieurs niveaux d'habilitation décrire les critères du niveau 1 et les critères additionnels pour le niveau 2 et 3.

NIVEAU 2 Utilisateur confirmé : Critères additionnels au niveau 1 (utilisateur)			
Critères d'habilitation *(préciser les critères applicables aux différents niveaux d'habilitation le cas échéant)*	**Evaluations**		
	Acquis	**Date**	**Visa formateur**
CIQ : Savoir réaliser le contrôle de rendement	☐		

NIVEAU 3 référent ou Expert : Critères additionnels aux niveaux 1 (utilisateur) et 2 (utilisateur confirmé)			
Critères d'habilitation *(préciser les critères applicables aux différents niveaux d'habilitation le cas échéant)*	**Evaluations**		
	Acquis	**Date**	**Visa formateur**
Calculs des rendements et incertitudes de mesure	☐		

III – HABILITATION FORMATEUR

Critères d'habilitation *(préciser les critères applicables aux différents niveaux d'habilitation le cas échéant)*	**Evaluations**		
	Acquis	**Date**	**Visa cadre**
Formateur pour les nouveaux arrivants • Habilitation au poste de travail de niveau 2 ou 3 ou ancienneté au poste • Capacité à transmettre son savoir et à s'adapter au niveau du formé	☐ ☐		

Annexe n°4 : vérification des calculs effectués grâce au tableau Excel

1. Droite de calibrage

1.1. Vérification de la pente a :

a = - 3.38 dans le tableau Excel

$$a = \frac{covariance\ de\ x'y}{variance\ de\ {x_i}'}$$

$$Variance\ de\ {x'}_i = \frac{\sum {x'}_i^2 - \frac{(\sum {x'}_i)^2}{n}}{n-1} = \frac{419.5 - \frac{119.3^2}{40}}{39} = 1.620$$

$$co\ variance\ x'y = \frac{\sum {x'}_i t_i - \frac{\sum {x'}_i X\ t_g}{n}}{n-1} = \frac{3255{,}32 - \frac{119.3X116308}{40}}{39} = -5.53$$

$$a = \frac{-5.53}{1.620} = -3.4$$

1.2. Vérification de l'ordonnée b :

b = 39.17 dans le tableau Excel

$$b = y - ax' = \frac{T_g}{n} - a\frac{\sum x'}{n} = 29.095 - \left(-3{,}414X\frac{119.3}{40}\right) = 39.268$$

1.3. Vérification de l'efficacité :

L'efficacité est égale à 97% dans le tableau Excel pour une pente à -3.3786534

$$e = (10^{\frac{1}{-3.3786534}} - 1)\ X\ 100 = 97\%$$

1.4. Vérification des performances de la régression linéaire :

Vérification de l'exactitude : exemple pour le niveau 15 UG : l'exactitude est de 0.12 avec un biais à -0.01 et un écart type à 0.12

Résultats $x'ij$ calculé en fonction du C_t mesuré (y_{ij}) et en fonction de la droite de calibrage :

y_{ij}	35,03	35,48	34,82	35,06	34,81	35,10	35,07	35,33	36,18	35,41
$x'ij$	1,225 654	1,092 465	1,287 809	1,216 775	1,290 769	1,204 936	1,213 815	1,136 862	0,885 282	1,113 184

$$E_{LIN15} = \sqrt{s'^2_i + biais^2}$$

$$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{k} x'^2_{ij} - \frac{\left(\sum_{j=1}^{k} x'ij\right)^2}{k}}{k-1}} = \sqrt{\frac{13.741 - \frac{(11.667)^2}{10}}{9}} = 0.12$$

$$: biais = \overline{x'_i} - x'_i = 1.16676 - 1.17609 = -0.01$$

$$E_{LIN15} = \sqrt{0.0144 - 0.0001} = 0.12$$

2. Limite de quantification : vérification du tableau Excel

L'exactitude de la limite de quantification est de 0.103

$$E_{LQ} = \sqrt{s'^2_i + biais^2}$$

$$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{k} x'^2_i - \frac{\left(\sum_{i=1}^{k} x'i\right)^2}{k}}{k-1}} = \sqrt{\frac{6.835 - \frac{33.966}{5}}{4}} = 0.10$$

$$Biais = \overline{x'_i} - \log(x) = 1.1656 - 1.176091 = -0.0105$$

$$E_{LQ} = \sqrt{0.01 - 0.00011} = 0.10$$

3. Vérification des calculs de rendement

3.1 Exemple pour le niveau 200000 eaux minérales :

Echantillon n°1

$$Log\ suspension\ mère = \frac{\log 9{,}28.10^8 + \log 8{,}70.10^8 + log 8{,}30.10^8}{3} = 8.94204844$$

$$Log\ echantillon = log 40600 = 4.61$$

$$log facteur\ de\ dilution = log 100000 = 5$$

$$log_{10}(Re\ nd_{Echantillon1}) = 4.61 - 8.994204844 + 3 + log\frac{1000}{200} = -0.63$$

$$Rendement(\%) = 10^{-0.63} X 100 = 23\%$$

3.2 Rendement moyen eaux minérales

$$R_{end} = \frac{-0.63 - 0.77 - 0.23 - 0.41 - 0.54 - 0.49 - 0.54 - 0.38}{8} = -0.499$$

$$R_{end} = \frac{23 + 17 + 59 + 39 + 29 + 32 + 29 + 41}{8} = 33.7\%$$

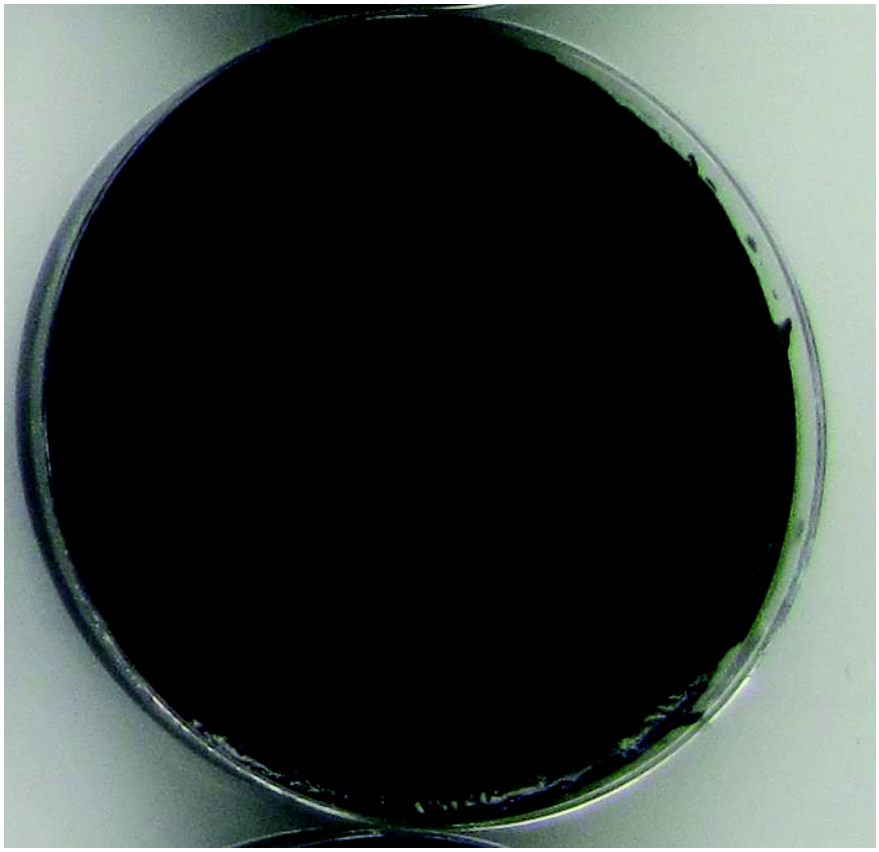
Ecart type :

$$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_x^n Rend^2 - \frac{(\sum_x^n Rend)^2}{n}}{n-1}} = \sqrt{\frac{2.1785 - \frac{(-3.99)^2}{8}}{7}} = 0.16$$

$$s'_i = \sqrt{\frac{\sum_x^n Rend^2 - \frac{(\sum_x^n Rend)^2}{n}}{n-1}} = \sqrt{\frac{10207 - \frac{(269)^2}{8}}{7}} = 12.9\ \%$$

Les calculs sont conformes à ceux du tableau Excel.

Annexe n°5 : photo d'une flore interférente sur milieu GVPC



RESUME

Legionella pneumophila est une bactérie pathogène responsable de nombreuses épidémies. Les sources de contamination les plus fréquentes sont les installations qui favorisent la multiplication des légionelles dans l'eau et les dispersent sous forme d'aérosols. Parmi ces installations, les tours aéroréfrigérantes sont considérées comme particulièrement à risque puisqu'elles vont favoriser la propagation et la dissémination de gouttelettes potentiellement contaminées.

Actuellement, la méthode utilisée par le laboratoire pour rechercher les légionelles dans l'eau est la méthode réglementaire qui repose sur la mise en culture des échantillons par ensemencement direct et après différents traitements (norme NF T90-431). Cependant, cette technique est très peu sensible en présence de flore interférente puisque dans ce cas, il est parfois même impossible de rendre un résultat. Au cours de l'année 2015, le laboratoire a été confronté plusieurs fois à ce problème, sans pouvoir conclure à la présence ou non de *L. pneumophila* dans les eaux de TAR analysées, ce qui a mis en évidence la nécessité de mettre en place une technique alternative.

Les objectifs de ce travail ont donc été de valider la méthode de détection et de quantification de *L. Pneumophila* dans les eaux de TAR par amplification génique et de démontrer son intérêt en présence de flore interférente.
Tout d'abord, les critères de performance exigés par la norme NF T90-471 pour la validation secondaire de la PCR temps réel ont été vérifiés. Cette méthode a ensuite été mise en œuvre, parallèlement à la mise en culture, sur des échantillons d'eaux de TAR dopés avec des flores interférentes reconstituées et des quantités de légionelles proche des niveaux d'alerte et d'action réglementaires.

Au final, la qPCR s'avère très performante pour détecter précocement la présence de *L. pneumophila* même en présence d'une quantité importante de flore interférente. Il semble donc pertinent à l'avenir, d'envisager son utilisation en routine sur des matrices complexes comme les eaux de TAR, en complément de la méthode réglementaire.

MOTS-CLES : légionellose, *Legionella pneumophila*, tours aéroréfrigérantes, flore interférente, qPCR, norme NF T90-471