



HAL
open science

Détection et quantification des *Legionella* spp dans l'eau par méthode de PCR en temps réel : validation par rapport à la culture

Pierre-Alain Falconnet

► To cite this version:

Pierre-Alain Falconnet. Détection et quantification des *Legionella* spp dans l'eau par méthode de PCR en temps réel : validation par rapport à la culture. Sciences pharmaceutiques. 2003. dumas-01396409

HAL Id: dumas-01396409

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01396409>

Submitted on 14 Nov 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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2003

N°

7025

**DÉTECTION ET QUANTIFICATION DES *LEGIONELLA SPP*
DANS L'EAU PAR MÉTHODE DE PCR EN TEMPS RÉEL :
VALIDATION PAR RAPPORT À LA CULTURE**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ÉTUDES
SPECIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

DIPLÔME D'ÉTAT

Pierre-Alain FALCONNET

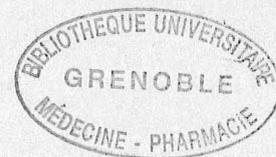
[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 21 octobre 2003

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

- Président de jury : Madame le Professeur R. Grillot
Membres : Monsieur le Professeur M. Maurin
Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
Monsieur le Professeur J.P. Stahl
Monsieur le Docteur J. Croizé



* La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2003

N°

**DÉTECTION ET QUANTIFICATION DES *LEGIONELLA SPP*
DANS L'EAU PAR MÉTHODE DE PCR EN TEMPS RÉEL :
VALIDATION PAR RAPPORT À LA CULTURE**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ÉTUDES
SPECIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE**

DIPLOME D'ÉTAT

Pierre-Alain FALCONNET

[Données à caractère personnel]

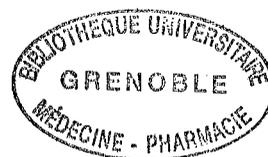
MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 21 octobre 2003

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président de jury : Madame le Professeur R. Grillot

Membres : Monsieur le Professeur M. Maurin
Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
Monsieur le Professeur J.P. Stahl
Monsieur le Docteur J. Croizé



* La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur P. DEMENGE
Vice-Doyen : M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	(Emérite)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Organique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique Pharmacie et Génétique
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique – Bromatologie
RIBUOT	Christophe	Pharmacologie Cardio-Vasculaire
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique
----------------	---------	--------------------

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharma. Clinique et Biotech.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BRUGERE	Jean-François	Parasitologie
BURMEISTER	Wilhelm	Physique ou Virologie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DÉSIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie Moléculaire Structurale
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie et virologie clinique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie C
KRIVOBOK	Serge	Botanique – Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie Organique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxicol.Ecotox.
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
TAILLANDIER	Georges	Chimie Organique
VILLEMAIN	Danielle	Mathématiques
VILLET	Annick	Chimie Analytique

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale
-----------	----------	-----------------

Comme Minerve apparut, sortie tout armée du cerveau de Jupiter, il y aura des maladies infectieuses nouvelles, des maladies d'avenir ...

Charles Nicolle, bactériologiste et prix Nobel de médecine (1928)

Remerciements

A Madame le Professeur R. Grillot
pour l'honneur qu'elle nous fait de présider ce jury de thèse

A Monsieur le Professeur M. Maurin
nous apprécions sa disponibilité et ses conseils
nous le remercions de nous avoir confié ce travail
et de bien vouloir être notre juge

A Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin
pour nous avoir accueilli dans son laboratoire
et fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse

A Monsieur le Professeur J.P. Stahl
pour l'honneur qu'il nous fait de bien vouloir juger notre travail

A Monsieur le Docteur J. Croizé
ses connaissances et son enthousiasme nous ont stimulé tout au long de notre cursus
nous le remercions pour son soutien constant et pour avoir accepté de juger ce travail

A Annick Lagier

pour son aide précieuse et sa rigueur

A Odile Genoulaz et Gérard Bargues

pour leur disponibilité, leurs conseils et leur bonne humeur

A Carol, Christine et Isabelle

pour l'excellente ambiance de travail qu'elles ont su créer

A Brigitte et Céline

pour leur amitié et leur humour

A toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie

pour leur accueil chaleureux

A mes parents, qui m'ont donné tout leur amour et leur affection, pour leur soutien sans faille pendant toutes ses années d'études. Ce travail est également le leur

A mes frères et à ma sœur Marie-Odile

A ma grand-mère

A Caroline, pour sa confiance et son amour, pour m'avoir accompagné tout au long de ces années d'études et pour sa capacité à ensoleiller chacune de mes journées

A Madeleine et Hervé, pour leur soutien et la pertinence de leurs conseils

A mes amis

SOMMAIRE

INTRODUCTION	6
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1- Historique	9
2- Taxonomie	10
3- Principaux caractères bactériologiques des <i>Legionella spp</i>	12
4- Ecologie des légionelles	16
4.1. Interactions entre les légionelles et les protozoaires de l'environnement aquatique	16
4.2. Association avec les biofilms	17
4.3. Principaux réservoirs artificiels des légionelles	18
5- Epidémiologie des légionelloses	21
5.1. Données générales	21
5.2. Modes de contamination	22
5.3. Sources de contamination	22
5.4. Lieux de contamination	24
6- Aspects cliniques des légionelloses	26
6.1. Maladie des légionnaires	26
6.2. Manifestations extra-pulmonaires	27
6.3. Fièvre de Pontiac	28
6.4. Formes asymptomatiques	29
7- Diagnostic des légionelloses	29
7.1. Mise en culture des prélèvements	29
7.2. Immunofluorescence directe	31
7.3. Sérologie	31
7.4. Recherche d'antigènes solubles urinaires	32
7.5. Amplification génique	34
7.6. Stratégie diagnostique	35
8- Traitement des légionelloses	36

9- Politique de prévention des légionelloses en France	37
9.1. Surveillance épidémiologique.....	37
9.2. Prévention primaire des légionelloses.....	38
9.3. Prévention secondaire des légionelloses.....	41
10- Recherche des <i>Legionella spp</i> dans les environnements aquatiques artificiels par mise en culture	42

MATERIEL ET METHODES / RESULTATS **46**

Introduction **47**

A. Mise au point et évaluation de la limite de détection, de la sensibilité, de la spécificité et de la reproductibilité de deux protocoles de PCR quantitative en temps réel pour le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau **49**

1- Objectifs	50
2- Matériel et méthodes	50
2.1. Souches bactériennes.....	50
2.2. Extraction de l'ADN des souches bactériennes.....	50
2.3. Dénombrement des <i>Legionella spp</i> dans un échantillon d'eau par la technique des Unités Formant Colonies.....	52
2.4. Détection et quantification des <i>Legionella spp</i> et de <i>L. pneumophila</i> par PCR quantitative en temps réel.....	53
2.5. Etude de la sensibilité et de la spécificité.....	61
3- Résultats	63
3.1. Limite de détection et « seuil de positivité ».....	63
3.2. Reproductibilité.....	65
3.3. Droite d'étalonnage avec standard externe.....	69
3.4. Sensibilité et spécificité.....	74

B. Test de détection et de titrage différentiel <i>Legionella pneumophila</i> / <i>Legionella anisa</i> par PCR en temps réel	76
1- Objectif.....	77
2- Méthode.....	77
3- Résultats.....	78
C. Test de quantification de <i>Legionella pneumophila</i> dans un mélange avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
1- Objectif.....	84
2- Méthode.....	84
3- Résultats.....	85
D. Etude comparative entre la PCR et la méthode normalisée AFNOR T90-431, pour la quantification de <i>Legionella pneumophila</i> sur des eaux artificiellement chargées	86
1- Objectif.....	87
2- Méthode.....	87
2.1. Préparation d'eaux artificiellement chargées en <i>L. pneumophila</i>	87
2.2. Recherche et dénombrement des <i>Legionella spp</i> dans les échantillons d'eau par la méthode générale d'ensemencement direct et de filtration sur membrane : norme AFNOR T90-431.....	87
2.3. Adaptation de la norme à notre manipulation.....	90
2.4. Recherche et quantification de <i>L. pneumophila</i> par PCR.....	91
3- Résultats.....	91
3.1. Seuils de positivité.....	92
3.2. Perte de bactéries liée à la filtration.....	93
3.3. Différence entre les résultats de quantification par PCR et les résultats de quantification par les UFC.....	93
3.4. Effet des traitements de décontamination.....	94

E. Application des méthodes de PCR quantitative au dénombrement des *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* sur les eaux reçues en routine au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble : étude comparative avec la méthode normalisée AFNOR T90-431 95

1- Méthode	96
1.1. Nature des échantillons.....	96
1.2. Gestion des échantillons.....	96
1.3. Analyse par PCR quantitative des échantillons.....	96
1.4. Interprétation des résultats des PCR quantitatives.....	96
1.5. Etude comparative.....	98
2- Résultats	98
2.1. Recherche de <i>Legionella spp</i> négative à la fois par ensemencement et par les deux techniques de PCR.....	99
2.2. Recherche positive en <i>L. pneumophila</i> par ensemencement et par les deux techniques de PCR.....	99
2.3. Recherche de <i>Legionella spp</i> négative par ensemencement mais positive en PCR <i>Legionella spp</i> et <i>L. pneumophila</i>	105
2.4. Recherche négative à la fois par ensemencement et par PCR <i>L. pneumophila</i> , mais positive en PCR <i>Legionella spp</i>	106
2.5. Recherche positive en <i>Legionella taurinensis</i> par ensemencement et positive en PCR <i>Legionella spp</i> et <i>L. pneumophila</i>	108
2.6. Corrélation globale entre les résultats des PCR et ceux de la méthode normalisée pour l'ensemble des prélèvements.....	109
 DISCUSSION	 111
 CONCLUSION	 132

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **135**

ANNEXES **148**

Introduction

L'importance médicale des bactéries du genre *Legionella* a été reconnue pour la première fois en 1976, au décours d'une épidémie de pneumopathie parmi les participants d'un congrès de l'American Legion à Philadelphie. Depuis, l'incidence des légionelloses est en constante augmentation. C'est une infection commune, qui constitue la quatrième cause de pneumopathie communautaire. Il s'agit d'un problème de santé publique, qui bénéficie en particulier d'une couverture médiatique importante.

L'inhalation de gouttelettes d'eau aérosolisées à partir d'environnements hydriques colonisés par les *Legionella spp*, constitue le principal mode d'acquisition des légionelloses. Paradoxalement, cette infection est la conséquence de l'urbanisation et de l'amélioration des conditions de vie. En effet, la création d'environnements aquatiques artificiels, favorables à la multiplication des *Legionella spp*, et à leur dissémination sous forme d'aérosols, est à l'origine de l'émergence de la légionellose.

La prévention des infections à *Legionella spp* est basée sur la mise en œuvre de moyens permettant de réduire et de contrôler la prolifération de ces bactéries dans les installations à risque. La recherche et le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau constitue un des outils clef de la prévention.

Notre travail consiste, dans une première partie, en une revue de la littérature, composée d'une description des bactéries du genre *Legionella*, de leur écologie, de leur pathogénicité, des outils diagnostiques et des attitudes thérapeutiques recommandées. Nous terminerons cette première partie par l'étude des moyens de prévention. Nous aborderons notamment les limites des méthodes de mise en culture pour la recherche et le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau.

Dans une deuxième partie, nous exposerons un travail expérimental de mise au point et d'évaluation d'une technique de PCR en temps réel appliquée à la quantification des *Legionella spp* dans l'eau. L'objectif est de déterminer si la PCR peut répondre aux insuffisances de la culture et ainsi représenter une alternative.

Synthèse bibliographique

1. Historique :

Les 21-24 Juillet 1976 se déroula la 58^{ième} convention de l'American Legion à l'hôtel Bellevue Straford de Philadelphie (Pennsylvanie) ; sur les 4400 participants, 182 tombèrent grièvement malade et 29 décédèrent d'une pneumopathie sévère. La maladie des légionnaires était décrite pour la première fois (1).

Les remarquables investigations menées pas le Center for Disease Control (CDC) aboutirent à l'isolement d'une nouvelle bactérie (1) appelée, du fait des circonstances épidémiologiques, *Legionella pneumophila* (2).

Des études rétrospectives permirent par la suite d'identifier *L. pneumophila* comme agent responsable de deux épidémies plus anciennes et similaires sur le plan épidémiologique (3). Il s'agissait d'une épidémie de pneumopathie fébrile dans le district de Columbia en 1965 (81 personnes atteintes dont 12 décès) et d'une épidémie qui s'était déclarée en 1968 à Pontiac (Michigan) (3,4). Cette dernière n'avait causé aucun décès et s'était manifestée par une forte fièvre (fièvre de Pontiac) accompagnée de myalgies et de symptômes neurologiques.

De la même façon, l'analyse de diverses sérothèques a permis d'imputer à *L. pneumophila* d'autres épidémies ou cas sporadiques dont le plus ancien remonte à 1947. A l'époque, la bactérie avait été isolée à partir d'un cobaye chez lequel on avait inoculé le sang d'un patient atteint d'une affection respiratoire fébrile. La bactérie n'avait pu être mise en culture et fut désignée plus tard comme un agent « Rickettsia-like » (5).

Les nombreux travaux menés depuis ont montré que l'environnement aquatique naturel et artificiel était le réservoir de la famille des *Legionellaceae*. L'urbanisation et les progrès technologiques ont donné la possibilité à cette bactérie de se développer dans nos installations techniques, d'être diffusée sous forme d'aérosols, puis inhalée – l'inhalation étant la voie de contamination communément admise. Ainsi, les réseaux collectifs de distribution d'eau chaude, les douches, les bains bouillonnants, les circuits de refroidissement à eau des systèmes de climatisation, les humidificateurs d'air, les brumisateurs... sont autant d'installations à risque qui font partie de notre environnement quotidien et qui sont à l'origine des cas de légionellose, en progression ces dernières années en France et dans le monde.

L'augmentation du nombre de sujets à risque (personnes âgées, tabagisme, traitement immunosuppresseurs,...) ainsi que les progrès du diagnostic et du système de déclaration, expliquent également la multiplication des cas observés.

Les dernières épidémies importantes ou médiatiques en France sont celles de la Coupe du Monde de football en 1998 à Paris (6), celle de l'Hôpital Européen Georges Pompidou en 2000/2001 (7) et celles de l'agglomération de Montpellier et Poitiers durant l'été 2003.

2. Taxonomie :

Après l'isolement de la bactérie responsable de la maladie des légionnaires, les analyses génotypiques et phénotypiques aboutirent à la création d'une nouvelle famille de bactéries : les *Legionellaceae* (2).

Seul le genre *Legionella* constitue cette famille. Certains auteurs ont proposé de diviser les *Legionellaceae* en trois genres : *Legionella*, *Fluoribacter* et *Tatlockia* (8). Cependant cette classification fut peu employée par les laboratoires car aucun marqueur phénotypique ne permettait de distinguer ces genres. De plus, des études récentes de l'analyse de la séquence de l'ARN ribosomal 16 S confirment que la famille des *Legionellaceae* est un sous-groupe unique monophylgénétique de la subdivision gamma-2 des protéobactéries (figure 1) (9). L'observation d'une diversité génétique au sein d'un même séro groupe et de variations phénotypiques au sein de souches génétiquement homogènes a conduit Brenner et coll à subdiviser l'espèce *L. pneumophila* en trois sous-espèces: *L. pneumophila* subspecies *pneumophila*, *L. pneumophila* subspecies *fraseri* et *L. pneumophila* subspecies *pascullei* (10). Sur le plan phylogénétique, la bactérie la plus proche des *Legionella* est *Coxiella burnettii*, agent de la fièvre Q (figure 1) (11).

Le nombre d'espèces et de sérogroupes du genre *Legionella* est en augmentation permanente. Il y a actuellement 49 espèces comprenant 71 sérogroupes (12,13). Certaines de ces espèces ont été identifiées à la fois à partir de prélèvements humains et de l'environnement, d'autres uniquement à partir de l'environnement (tableau I).

Certaines légionelles sont incapables de se développer sur les milieux de culture usuels, ce sont des bactéries à développement intracellulaire obligatoire nécessitant des co-cultures de protozoaires ou d'amibes. On les prénomme *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs)(14). Ces LLAPs ne forment pas un groupe phylogénétiquement distinct et unique au sein du genre *Legionella*; elles représentent différentes espèces distribuées dans tout le genre (15) et correspondent actuellement à quatre nouvelles espèces : *L. lytica*, *L. drozanskii*, *L. rowbothamii* et *L. fallonii* (16).

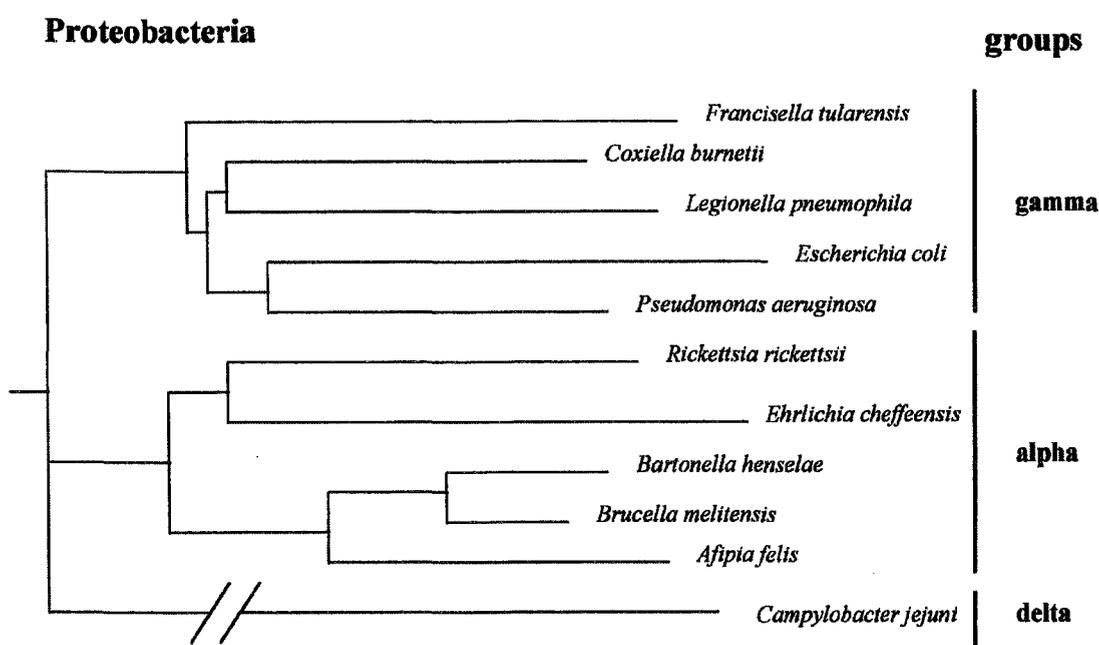
L'établissement de la relation phylogénétique des nouvelles espèces de *Legionella* est basée sur l'étude de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S (17).

Tableau I : espèces de *Legionella* et sérogroupes (12,13)

Espèce	Nombre de sérogroupes	Nombre de sérogroupes rencontrés en pathologie humaine
<i>L. pneumophila</i>	15	15
<i>L. bozemanii</i>	2	2
<i>L. dumoffii</i>	1	1
<i>L. micdadei</i>	1	1
<i>L. longbeachae</i>	2	2
<i>L. jordanis</i>	1	1
<i>L. wadsworthii</i>	1	1
<i>L. hackeliae</i>	2	2
<i>L. feeleeii</i>	2	2
<i>L. maceachernii</i>	1	1
<i>L. birminghamensis</i>	1	1
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	1
<i>L. gormanii</i>	1	1
<i>L. sainthelensi</i>	2	2
<i>L. tucsonensis</i>	1	1
<i>L. anisa</i>	1	1
<i>L. lansingensis</i>	1	1
<i>L. erythra</i>	2	1 (séro groupe 2)
<i>L. parisiensis</i>	1	1
<i>L. oakridgensis</i>	1	1
<i>L. spiritensis</i>	2	0
<i>L. jamestowniensis</i>	1	0
<i>L. santicrucis</i>	1	0
<i>L. cherrii</i>	1	0
<i>L. steigerwaltii</i>	1	0
<i>L. rubrilucens</i>	1	0
<i>L. israelensis</i>	1	0
<i>L. quinlivanii</i>	2	0
<i>L. brunensis</i>	1	0
<i>L. moravica</i>	1	0
<i>L. gratiana</i>	1	0
<i>L. adelaidensis</i>	1	0
<i>L. fairfieldensis</i>	1	0
<i>L. shakespearei</i>	1	0
<i>L. waltersii</i>	1	0
<i>L. genomospecies</i>	1	0
<i>L. quateirensis</i>	1	0
<i>L. worsleiensis</i>	1	0
<i>L. geestiana</i>	1	0
<i>L. nautarum</i>	1	0
<i>L. londoniensis</i>	1	0
<i>L. taurinensis</i>	1	0
<i>L. lytica</i>	1	0
<i>L. drozanskii</i>	1	0
<i>L. rowbothamii</i>	1	0
<i>L. fallonii</i>	1	0
<i>L. gresilensis</i>	1	0
<i>L. beliardensis</i>	1	0
<i>L. busanensis</i>	1	0

Récemment une classification basée sur l'étude de la séquence du gène du « macrophage infectivity potentiator » (*mip*) des *Legionella spp* a été développée ; cette méthode a permis de distinguer sans ambiguïté les 39 espèces de légionelles étudiées (18).

Figure 1 : arbre phylogénétique montrant les relations entre *L. pneumophila* et d'autres espèces appartenant aux protéobactéries (19)



3. Principaux caractères bactériologiques des *Legionella spp* (20,21):

Les légionelles sont des bacilles fins à Gram négatif faiblement colorés par la safranine, non acidorésistants, non sporulés, non capsulés, mesurant 0.3 à 0.9 μm de diamètre sur 1.5 à 5 μm de longueur et pouvant donner des formes filamenteuses de 20 μm et plus après culture in vitro.

Le génome de *L. pneumophila* est constitué de 3 335 940 paires de bases. Pour l'instant il n'est pas totalement séquencé.

La membrane cytoplasmique des *Legionella* est caractérisée par la présence d'une quantité importante d'ubiquinones. Ces ubiquinones sont retrouvées chez d'autres bacilles à Gram négatif mais ont une structure particulière chez *Legionella*. Les chaînes latérales isoprénoïdes fixées sur

le noyau 1-4 benzoquinone se distinguent par leur nombre d'unités isoprènes supérieur à ce qui est habituellement observé (10 à 14 unités) et par leur degré d'insaturation.

La paroi des légionelles contient une proportion d'acides gras ramifiés pouvant représenter jusqu'à 90 % de l'ensemble des acides gras, ce qui est également un élément particulier à ces bactéries. En effet les acides gras ramifiés sont fréquents chez les bactéries à Gram positif mais rarement rencontrés chez les bactéries à Gram négatif et toujours retrouvés en faible quantité. L'étude de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse et en ubiquinones par chromatographie liquide haute performance peut être utilisée pour classer les différentes espèces de légionelles en plusieurs groupes et aider à leur identification.

La plupart des légionelles sont mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires ou subpolaires (tableau II), cependant l'expression de ces flagelles est inconstante et pourrait être température dépendante.

Sur le plan biochimique, les légionelles sont relativement inertes, non fermentaires et n'utilisent pas les hydrates de carbones pour leur croissance. L'uréase est négative, l'oxydase est généralement négative ou faiblement positive, la catalase est positive pour toutes les espèces (excepté *L. worsleiensis*) et la plupart des espèces hydrolysent la gélatine (tableau II). Même si quelques autres espèces possèdent aussi la capacité d'hydrolyser l'hippurate, ce test peut être utilisé comme critère présomptif pour distinguer *L. pneumophila* des autres *Legionella*.

La culture des légionelles est difficile et dans la grande majorité des cas, ces bactéries ne se développent pas sur les géloses nutritives usuelles telles que les géloses au sang. En effet, la caractéristique du genre *Legionella* est l'exigence en L-cystéine et la culture nécessite un milieu complexe. Le milieu standard pour l'isolement des *Legionella* est le milieu BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract) qui contient de la L-cystéine, de l'extrait de levure qui est une source riche en nutriments, des sels de fer et de l' α -cétoglutarate qui stimulent la croissance. Ce milieu est également additionné de charbon activé qui neutralise les composés toxiques (peroxydes, radicaux libres) qui peuvent apparaître après autoclavage des géloses ou après leur exposition à la lumière. Enfin, un tampon ACES [Acide N-(2-acétamido)-2-amino-éthanesulfonique] permet de maintenir un pH compris entre 6.85 et 6.95, optimal pour le développement des légionelles. Ce sont des bactéries aérobies strictes dont la croissance est favorisée par la présence de dioxyde de carbone à une concentration de 2.5 à 5 %. Des concentrations supérieures pourraient être inhibitrices. La température de croissance optimale est de 35-37° C. D'une manière générale, les

colonies sont visibles en 3 à 7 jours, parfois plus, elles sont grisâtres, de consistance muqueuse, polymorphes et ont un aspect de « verre brisé » lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire. Quelques espèces présentent une fluorescence (bleue, jaune-verte ou rouge) lorsque les colonies sont observées sous lumière de Wood (fluorescence à 366 nm) (tableau II). Un pigment « melanin-like » brun entraînant le brunissement d'un milieu dépourvu de charbon et contenant de la L-tyrosine ou de la L-phénylalanine, peut être observé chez certaines espèces (tableau II). Bien que le milieu BCYE α soit le milieu de référence pour l'isolement des légionelles, il est important de noter que de rares souches de *L. pneumophila* et d'autres espèces peuvent parfois se développer sur des milieux usuels tels que des géloses chocolat. A l'opposé, les LLAPs ne se développent pas sur milieu BCYE α et nécessitent une co-culture avec des protozoaires. Ce phénomène peut également être observé avec certaines souches de *L. pneumophila* (22,23).

Tableau II : caractéristiques des espèces de *Legionella* (20,21,24-27)

Espèce	Catalase	Oxydase	Gélatinase	Mobilité	Hydrolyse de l'hippurate	Pigment brun	Auto-fluorescence
<i>L. pneumophila</i>	+	+ f	+	+	V	+ ^a	/
<i>L. bozemanii</i>	+	Sérogroupe 1 : +f Sérogroupe 2 : -	+	+	-	+	Bleue
<i>L. dumoffii</i>	+	-	+	+	-	+ ^a	Bleue
<i>L. micdadei</i>	+	+	+/-	+	-	-	Jaune-verte
<i>L. longbeachae</i>	+	V	+	+	-	+	Jaune-verte
<i>L. jordanis</i>	+	+	+	+	-	+	/
<i>L. wadsworthii</i>	+	-	+	+	-	-	Jaune-verte
<i>L. hackeliae</i>	+ f	Sérogroupe 1 : +f Sérogroupe 2 : -	+	+	-	+	/
<i>L. feeleii</i>	+	Sérogroupe 1 : - Sérogroupe 2 : V	-	+	Sérogroupe 1 : +f Sérogroupe 2 : -	+ ^a	/
<i>L. maceachernii</i>	+	+	V	+	-	+	/
<i>L. birminghamensis</i>	+	V	+	+	-	-	Jaune-verte
<i>L. cincinnatiensis</i>	+	-	+	+	-	+	Jaune-verte
<i>L. gormanii</i>	+	-	+	+	-	+	Bleue
<i>L. sainthelensi</i>	+	Sérogroupe 1 : + Sérogroupe 2 : -	+	+	-	+ ^a	/
<i>L. tucsonensis</i>	+	-	+	+	-	-	Bleue
<i>L. anisa</i>	+	V	+	+	-	+	Bleue ^a
<i>L. lansingensis</i>	+	+	-	+	-	-	/
<i>L. erythra</i>	+	Sérogroupe 1 : + Sérogroupe 2 : V	+	+	-	+	Rouge ^a
<i>L. parisiensis</i>	+	+	+	+	-	+	Bleue
<i>L. oakridgensis</i>	+	-	+	-	-	+	/

Espèce	Catalase	Oxydase	Gélatinase	Mobilité	Hydrolyse de l'hippurate	Pigment brun	Auto-fluorescence
<i>L. spiritensis</i>	+	Sérogroupe 1 : + Sérogroupe 2 : -	+	+	^a	+	/
<i>L. jamestowniensis</i>	+	-	+	+	-	+	/
<i>L. santicrucis</i>	+	+	+	+	-	+	/
<i>L. cherrii</i>	+	V	+	+	-	+	Bleue
<i>L. steigerwaltii</i>	+	-	+	+	-	+	Bleue
<i>L. rubrilucens</i>	+	-	+	+	-	+	Rouge ^a
<i>L. israelensis</i>	+	-	+ f ^a	+	-	-	/
<i>L. quinlivanii</i>	+	-	+	+	-	+	/
<i>L. brunensis</i>	+	-	+	+	-	^a	/
<i>L. moravica</i>	+	+ f	+	+	-	^a	/
<i>L. gratiana</i>	+	+ f	+	+	-	-	Bleue
<i>L. adelaidensis</i>	+	-	+	+	-	-	/
<i>L. fairfieldensis</i>	+	+ f	-	-	-	-	/
<i>L. shakespearei</i>	+	+ f	+	+	-	-	/
<i>L. waltersii</i>	+	+	+	+	^a	-	/
<i>L. genomospecies</i>	+	-	+	+	-	+	/
<i>L. quateirensis</i>	+	-	+	+	-	+	/
<i>L. worsleiensis</i>	-	-	+	+	-	+	/
<i>L. geestiana</i>	+	-	+	+	^a	^a	/
<i>L. nautarum</i>	+	+	-	-	-	-	/
<i>L. londoniensis</i>	+ f	-	+	-	^a	+	/
<i>L. taurinensis</i>	+	+	+	+	-	-	Rouge ^a
<i>L. lytica</i> (LLAPs)	+	-	ND	ND	ND	ND	Bleue
<i>L. drozanskii</i> (LLAPs)	+	-	ND	ND	ND	ND	/
<i>L. rowbothamii</i> (LLAPs)	+	-	ND	ND	ND	ND	Bleue
<i>L. fallonii</i> (LLAPs)	+	+f	ND	ND	ND	ND	/
<i>L. gresilensis</i>	+	+	+	+	+	-	/
<i>L. beliardensis</i>	+	V	+	+	-	-	/
<i>L. busanensis</i>	+	+	+	+	+	-	/

^a : De rare souches sont négatives ou faiblement positives

+f : Positif faible

V : Variable

ND : Données non disponibles

4. Ecologie des légionelles :

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement, leur réservoir est essentiellement hydrique (12,28,29). On les retrouve principalement dans les eaux douces naturelles de surface (lacs, étangs, rivières) et les environnements humides (14,28). Les légionelles peuvent également être isolées dans les sols humides comme les terreaux où *L. longbeachae* est l'espèce la plus fréquemment identifiée (12,30-32). Par contre cette dernière espèce ne survit pas dans les sols desséchés (31).

A partir de leur milieu naturel, les légionelles colonisent des environnements hydriques artificiels créés par la main de l'homme où elles rencontrent des conditions favorables à leur prolifération (33,34), en particulier des températures supérieures aux températures ambiantes. En effet les légionelles peuvent se multiplier entre 25 et 42° C avec une température optimale de croissance à 35-37° C (12,35).

4.1. Interactions entre les légionelles et les protozoaires de l'environnement aquatique :

Les légionelles ne se développent pas dans l'eau stérile. La présence d'autres microorganismes est nécessaire à leur croissance (34,36). Les eaux douces naturelles et les eaux douces artificielles (réseau d'eau potable) sont fréquemment contaminées par des protozoaires (37-41). Ainsi, une étude Allemande de 1998 réalisée sur le système de distribution d'eau chaude de plusieurs hôpitaux a montré que 52 % des échantillons recueillis contenaient des amibes libres (42). Les légionelles ont la capacité de se multiplier au sein de ces protozoaires. Ce phénomène observé pour la première fois en 1980 (43) est actuellement bien documenté (12,29,36,44-46). La croissance des légionelles a été démontrée sur au moins 15 espèces d'amibes libres et deux espèces de protozoaires ciliés (12). Diverses observations suggèrent que les protozoaires de l'environnement et en particulier les amibes libres sont les facteurs les plus importants pour la survie des légionelles (36,43,47-49). La multiplication extracellulaire des légionelles n'a été décrite que sur les milieux de culture de laboratoire (12) sinon il semble que ces bactéries soient incapables de se développer en l'absence d'une cellule hôte et sont donc considérées comme des parasites des protozoaires (29,36). Certaines espèces de légionelles sont incapables de croître sur les milieux de laboratoire et nécessitent une co-culture avec des amibes. Il s'agit des LLAPs (14)

et de certaines souches au sein d'espèces capables habituellement de croître sur milieu axénique (22,23,36,50). Il est établi que *L. pneumophila* se multiplie dans les réseaux d'eau des hôpitaux seulement lorsque des amibes libres sont également présentes (37).

Les légionelles se multiplient au sein de vacuoles à l'intérieur des amibes (51), résistant à la digestion par ces protozoaires, ce qui révèle une adaptation de ces bactéries vis à vis de leur hôte (29). Les légionelles ont des exigences nutritives complexes qui sont en fait apportées par l'environnement intracellulaire offert par les protozoaires (12,50). *L. pneumophila* peut persister pendant longtemps dans ces vacuoles, même lorsque les conditions ne permettent pas sa multiplication (52). Les amibes libres possèdent une forme kystique de résistance vis-à-vis du milieu extérieur leur permettant de survivre à des variations importantes de température, de pH ainsi qu'à l'action des agents désinfectants (37,45,53). Les légionelles qui se développent dans les amibes libres bénéficient alors de cette protection et il a été observé que les légionelles extracellulaires étaient plus sensibles aux fluctuations de température, de pH, d'osmolarité, à l'action des biocides et des agents désinfectants (29,50,54,55). Les amibes libres vont également servir à la propagation à distance des légionelles et à l'ensemencement du milieu après lyse amibienne (29).

L'association des légionelles avec les protozoaires semble donc être le facteur majeur de la présence continue de ces bactéries dans l'environnement (29).

4.2. Association avec les biofilms :

Les légionelles sont communément associées aux biofilms qui recouvrent la paroi des tuyauteries des systèmes de distribution d'eau (56). Ces biofilms représentent en fait un réservoir important de légionelles puisque la colonisation peut atteindre jusqu'à 10^5 UFC/cm² (57). Ces bactéries sont plus fréquemment retrouvées par écouvillonnage du biofilm qu'à partir de l'eau courante (12), suggérant que la majorité des légionelles dans les canalisations sont associées aux biofilms (58).

Les biofilms sont un refuge pour de nombreux microorganismes et ont y retrouve notamment les protozoaires support de la multiplication des légionelles (12,56). Bien que *L. pneumophila* soit incapable de se développer en l'absence de cellule hôte, des études ont permis de montrer que cette bactérie était capable de survivre de façon extracellulaire dans le biofilm (12,36,56). Au sein des biofilms, les légionelles sont particulièrement tenaces (12), y compris aux traitements chlorés et aux autres biocides (59). Elles bénéficient à la fois de la protection par les protozoaires qui les

contiennent et par la matrice des biofilms. Les biofilms fournissent donc un moyen de survie et de dissémination pour les légionelles (56) et jouent un rôle dans la pérennité de la contamination des réseaux (60-62).

4.3. Principaux réservoirs artificiels de légionelles :

4.3.1. Réseaux d'eau chaude sanitaire :

Les principales études environnementales concernent la recherche de légionelles dans les réseaux collectifs de distribution d'eau chaude (hôpitaux, hôtels, immeubles collectifs et du tertiaire). La prévalence rapportée varie de 30 à 70 % avec des concentrations variant de 50 UFC/l à 1 million d'UFC/l (35). Les données concernant les installations individuelles sont plus restreintes mais il semble cependant que le nombre d'installations contaminées soit inférieur (6-37%) (35,50). Ceci est en partie lié au plus grand nombre de systèmes avec chauffe-eau instantané sans réservoir d'eau chaude.

Dans les systèmes de distribution et les réservoirs d'eau froide la fréquence d'isolement des légionelles est moindre, de l'ordre de 11% selon une étude Anglaise (35).

La température de l'eau est un des facteurs influençant la colonisation. En effet, ces bactéries se développent préférentiellement à une température supérieure à la température ambiante, mais sont inactivées si la température devient trop élevée. La colonisation des points d'eaux périphériques dans les maisons et les hôpitaux a été corrélée à une diminution de la température de l'eau chaude qui devient trop basse pour tuer ces bactéries (20). Lorsque la température de consigne de l'eau chaude dans les circuits est inférieure à 50°C (63) ou 60°C (64) il a été constaté que la colonisation de systèmes était plus fréquente. De plus, la présence de zones favorables au développement des légionelles a été observée. Il s'agit de la partie basse des ballons d'eau chaude où la température est plus faible qu'en partie haute. Les ballons d'eau chaude horizontaux sont plus colonisés que les ballons verticaux car la zone mal chauffée est plus importante (35). La présence de tartre et de sédiments dans les ballons anciens et mal entretenus favorise la contamination par les légionelles (35).

L'organisation du système de distribution de l'eau influe sur le risque de colonisation du réseau. L'existence de zones où l'eau peut stagner (bras morts), tels que des points d'eau jamais utilisés,

des points d'eau supprimés mais dont la canalisation est laissée en place, favorisent le développement des légionelles (65). Les robinets aérateurs (65), les absorbeurs de chocs (35) et les pommeaux de douche ont été mis en cause comme des réservoirs potentiels de légionelles. Chaque point d'eau dans une installation collective pourrait être le siège d'un site écologique particulier contenant sa propre flore microbienne avec des espèces et des sérotypes variant d'un point d'eau à l'autre (20,66).

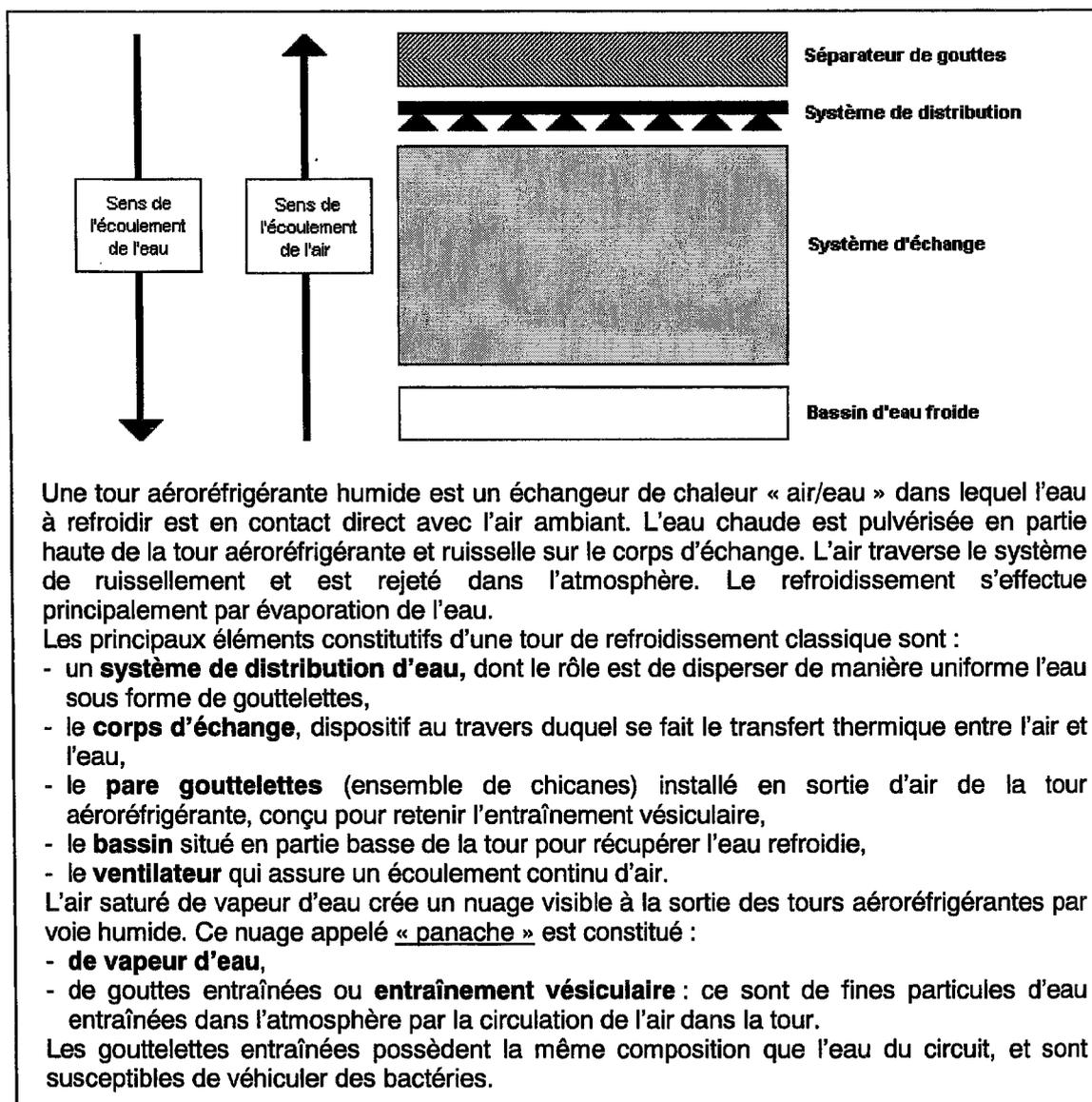
Certaines substances chimiques ainsi que les composants de plomberie en métal et les produits de corrosion associés influencent le développement des légionelles. Le zinc, le fer, le potassium, le calcium, le magnésium, le caoutchouc, la silicone et certains matériaux plastique favorisent la croissance de ces bactéries. Le cuivre, l'argent et le plomb ont une activité inhibitrice. On constate ainsi que la colonisation est moindre dans les canalisations en cuivre et plus importante lors de l'utilisation de certains caoutchoucs synthétiques et du chlorure de polyvinyle (PVC). A une température de 50° C, les légionelles ne survivent plus sur les surfaces en cuivre alors qu'il faut atteindre 60° C pour des matériaux tels que le polybutylène et le PVC (50,58,67-69).

La présence du biofilm est comme nous l'avons vu précédemment un facteur favorisant la colonisation des réseaux par les légionelles et contribuant à la pérennité de la contamination. Certains matériaux comme le polybutylène, le polypropylène, le polyéthylène réticulé, le polychlorure de vinyle surchloré peuvent être favorables à l'apparition de ce biofilm (35). L'impact bénéfique de certains matériaux s'estompe avec le temps. Une fois le biofilm installé, il semble qu'il n'y ait plus de différence entre les matériaux vis-à-vis des concentrations de *Legionella spp* mesurées (35).

4.3.2. Tours aéroréfrigérantes :

La conception des tours aéroréfrigérantes utilisées en climatisation favorise le développement des légionelles (figure 2) (35). Dans le secteur tertiaire, après avoir contrôlé un panel de 70 installations entre 1985 et 1999, le laboratoire d'hygiène de la ville de Paris a mis en évidence que 75 % des équipements contrôlés présentaient des concentrations égales ou supérieures à 1000 UFC/l (35). Dans une autre étude, 90 % des tours aéroréfrigérantes contrôlées étaient contaminées par des légionelles et *L. pneumophila* était isolée dans 50 % des cas (70).

Figure 2 : schéma et principe d'une tour aéroréfrigérante « humide » (71)



4.3.3. Autres réservoirs artificiels (35,50):

De nombreux environnements humides artificiels peuvent héberger des légionelles, tels que les bains à remous ou à jet utilisés par la balnéothérapie et le thermalisme, les spas, les jacuzzis, les humidificateurs d'air, les brumisateurs, les fontaines décoratives, les équipements de thérapie respiratoire par aérosols, les machines à glace, les biofilms se développant dans les tuyauteries d'appareil de soins dentaires ... ou encore les eaux usées puisqu'il a été démontré que le nombre de légionelles ne diminuait pas significativement lors des étapes de traitement de l'eau.

5. Epidémiologie des légionelloses :

5.1. Données générales :

La légionellose représente 2 à 15 % des pneumopathies communautaires nécessitant une hospitalisation (12,72). C'est la quatrième cause de pneumopathie communautaire (72,73).

L. pneumophila est responsable d'environ 90 % des cas et 80 % des cas sont liés au séro groupe 1 (21). Les autres espèces les plus fréquentes en pathologie humaine sont *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii* et *L. bozemanii* (21).

En France en 2002, 1021 cas de légionellose ont été déclarés à l'institut national de veille sanitaire (InVs) ce qui représente une incidence de 1,7 cas/100 000 habitants ; l'incidence européenne était de 1 cas/100 000 habitants. Depuis 1997, le nombre de cas de légionellose déclarés augmente en moyenne de + 29 % par an. Ce phénomène ne reflète pas forcément une augmentation du risque mais plutôt des progrès dans le domaine de la surveillance, du diagnostic et de la déclaration. La proportion des légionelloses nosocomiales était de 10 % en 2002 versus 20 % en 2000, ce qui peut être interprété comme le début de l'impact des efforts réalisés dans les établissements de santé, cependant il est trop tôt pour conclure. Le taux de létalité varie selon les pays et les années ; il était de 13 % en France en 2002.

La légionellose frappe surtout les personnes âgées avec une incidence maximale chez les plus de 80 ans. Le sexe masculin est le plus souvent touché (12,35,74) et les principaux facteurs de risque sont :

- l'immunosuppression en particulier les traitements par corticoïdes, mais également les traitements immunosuppresseurs chez les transplantés, les traitements cytostatiques ou encore les hémopathies malignes,
- les maladies pulmonaires chroniques,
- le tabagisme,
- le diabète,
- l'insuffisance rénale sévère,
- l'éthylisme chronique.

Chez les enfants, la légionellose est une infection rare. Dans la majorité des situations, la maladie survient chez des enfants immunodéprimés. Les cas observés chez des nouveau-nés ont essentiellement été associés à l'utilisation d'une ventilation mécanique (72). Il a également été décrit des cas secondaires à des accouchements en milieu aquatique (75).

5.2. Modes de contamination :

Le principal mode de contamination par les légionelles est l'inhalation de gouttelettes d'eau contenant les bactéries, de taille suffisamment petite (1 à 5 μm) pour leur permettre d'atteindre les alvéoles pulmonaires (72,76).

Il existe des cas de transmission plus anecdotiques tels que la micro-aspiration d'eau contaminée lors de fausses routes alimentaires en particulier chez des personnes présentant des problèmes de déglutition (35,76). La micro-aspiration d'eau contaminée secondairement à l'utilisation de sondes nasogastriques a également été incriminée dans plusieurs cas de légionelloses nosocomiales (72,77).

Enfin, la manipulation de terreaux a été impliquée dans la survenue de cas de légionellose à *L. longbeachae* (30,32). Le mode de transmission reste mal élucidé, il est possible que des aérosols contenant des légionelles soient formés lors de l'arrosage des plantations.

La contamination par voie digestive après ingestion d'eau ainsi que la transmission interhumaine n'ont pas été décrites (35,76).

5.3. Sources de contamination :

Les sources de contamination connues, impliquées dans la transmission de la légionellose sont en fait les réservoirs hydriques de ces bactéries à partir desquels la formation d'aérosols est possible (tableau III).

Le rôle des systèmes de distribution d'eau potable contaminés par des légionelles est maintenant bien établi dans la transmission de ces bactéries (72,78). Les systèmes de distribution d'eau chaude ont pu être associés à la survenue d'épidémies nosocomiales (38,79-81), d'épidémies lors de séjours dans des hôtels (73,82,83) et à des cas isolés en milieu résidentiel (84).

Tableau III : principales sources de contamination par les légionelles (76)

Type d'eau	Source de contamination
Eau potable	Douches Robinetteries Equipements de thérapeutique respiratoire
Eau non potable	Tours aéroréfrigérantes Bains à remous Fontaines décoratives Brumisateurs ultrasoniques

Différentes études ont montré que les douches et les robinetteries pouvaient produire des aérosols contenant des légionelles dans des microgouttelettes respirables (78), et le lien épidémiologique entre ces installations et la survenue de cas de légionellose a été établi (38,78,81).

Les nombreuses investigations menées au décours des diverses épidémies ont montré de façon évidente que les tours aéroréfrigérantes et les aérocondenseurs étaient des sources d'infection par les légionelles (28,50,72,85,86). Les conditions au sein de ces appareils sont idéales pour le développement de ces bactéries et nombre de ces installations sont donc contaminées (76). De plus ces appareils produisent des panaches d'aérosols qui peuvent soit être inhalés directement par passage à proximité (35,76) soit passer dans la prise d'air d'un système d'aération et être inhalés à distance (85-87). Ce mode de transmission a le plus souvent été documenté lorsque les cas étaient situés dans un périmètre proche des installations (<100 mètres) (76-86). Cependant des données suggèrent que ces bactéries peuvent être transmises à partir des tours aéroréfrigérantes après avoir été véhiculées sur des distances plus longues (1,6 à 3,2 km) (76,88,89). Ce phénomène peut être favorisé par un temps venteux mais surtout chaud et humide propre à la diffusion et à la survie des légionelles (88).

L'eau potable peut également être à l'origine de légionelloses lors de l'utilisation d'instruments de soins respiratoires (72,76). Dans les hôpitaux avec des systèmes de distribution d'eau contaminés, l'utilisation de l'eau du robinet pour nettoyer ces instruments représente un risque réel : des gouttelettes contenant les bactéries peuvent être retrouvées dans les appareils après leur rinçage (76,77).

D'autres sources d'aérosols ont été identifiées et impliquées dans la transmission de la maladie, il s'agit notamment des bains à remous ou à jets (50,72,76,90,91), des fontaines décoratives (35,50,76), des machines à glace (35,50) et des humidificateurs d'air (72). Une des épidémies les plus caractéristiques eut comme origine un brumisateur ultrasonique installé dans une épicerie.

Cet appareil qui produisait un nuage de buée au dessus de l'espace de vente fut responsable de 28 cas parmi les clients (92).

5.4. Lieux de contamination :

Les facteurs favorisant la colonisation des sources de contamination potentielles ont été décrits précédemment lors de l'étude de l'écologie des légionelles. Cependant, afin de comprendre l'épidémiologie des infections, il est intéressant de reprendre certains points. Deux facteurs principaux permettent d'expliquer la plus fréquente colonisation des installations de grande taille (hôpitaux, hôtels, immeubles de logements collectifs et de bureaux...). Il s'agit de la température trop basse en certains points des réseaux d'eau chaude sanitaire. Ce problème est en fait plus fréquemment retrouvé dans ce type d'installation où il peut exister des réservoirs d'eau chaude de grande taille avec des zones parfois mal chauffées et où l'eau qui circule en boucle peut atteindre des températures trop faibles dans les zones les plus éloignées du système de production. Deuxièmement, l'existence de zones de stagnation, de « bras morts », qui sont plus volontiers retrouvés dans les installations étendues.

L'existence de longues périodes de non-utilisation ou d'utilisation intermittente du réseau d'eau chaude sont deux facteurs favorisant la pullulation des légionelles et qui permettent de comprendre en partie l'épidémiologie des légionelloses. Ce phénomène est en effet particulièrement observé en période hivernale dans les campings, les résidences secondaires, et en basse saison dans les hôtels.

Enfin, d'autres éléments sont importants à connaître pour expliquer certains cas isolés ou épidémiques. Il s'agit du problème des installations anciennes et/ou mal entretenues sujettes à l'accumulation de tartre favorisant le développement du biofilm et la multiplication des légionelles. Certains travaux (vibrations) peuvent également être à l'origine de contaminations, en particulier des travaux de plomberie qui peuvent provoquer des détachements de biofilm contenant des légionelles et entraîner des concentrations momentanément très élevées de ces bactéries dans le système de distribution (35,80).

Concernant le risque de contamination via les tours aéroréfrigérantes, il a été démontré que les dispositifs industriels étaient moins souvent associés à des cas de légionelloses que les appareils

du secteur tertiaire. Ceci a été corrélé à la conception, à l'implantation et au mode d'exploitation de ces systèmes (35).

L'origine de la contamination par les légionelles n'est en fait identifiée que dans un faible pourcentage des cas, principalement à la suite d'épidémies. Les lieux les plus souvent rapportés sont les établissements de santé, les hôtels, les campings, les stations thermales, les immeubles de bureaux, les bateaux de croisière, les commerces ou encore à l'extérieur près des sources libérant des aérosols infectés, en particulier les tours aérorefrigérantes (35,53,74,93).

Jusqu'à présent, les cas sporadiques qui représentent la majorité des cas (12,21,35,74,76,93) n'ont pas fait l'objet d'enquêtes environnementales systématiques permettant de déterminer les sites de contamination de ces malades. En fait, certains de ces cas pourraient être des cas épidémiques non identifiés (76), d'autres pourraient résulter d'une exposition dans des domiciles individuels (50) ou encore d'une exposition à des aérosols de tours aérorefrigérantes transportés sur de longues distances dans l'atmosphère (76).

Si l'on considère les 1021 cas de légionelloses déclarées en France en 2002 (74), une exposition à risque dans les 10 jours précédant le début de la maladie a été rapportée pour 438 malades (43 %). Il s'agissait d'un séjour dans un hôpital ou une clinique (10 %), un séjour dans un hôtel, un camping ou un bateau de croisière (12 %), un séjour dans une résidence temporaire (3 %), un séjour dans une maison de retraite ou un autre type d'établissement de santé (3 %), une notion de voyage (2 %), un séjour dans une station thermale (1 %), une éventuelle exposition sur le lieu de travail (3 %), d'autres expositions (8 %).

En 1987, le groupe de travail EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infection) a lancé un programme de surveillance de la légionellose associée aux voyages et a mis en évidence que les voyages représentaient un facteur de risque d'acquisition de la maladie. Ainsi en 1990, sur 2136 cas de légionellose déclarés en Europe, 439 (20.6 %) étaient associés aux voyages (93). L'infection est dans ce cas généralement liée à la fréquentation d'hôtels, de campings et d'établissements thermaux. Les points de départ peuvent être les systèmes de climatisation, les réseaux d'eau chaude sanitaire, les piscines thermales ou les bains à remous.

Certaines professions peuvent être exposées à un risque accru d'acquisition de légionellose. Des cas ont été rapportés chez des ouvriers travaillant sur des systèmes sanitaires ou de climatisation (chauffagistes). Toute personne utilisant de l'eau sous pression pulvérisée à l'air libre est théoriquement susceptible d'être contaminée (mineurs, laveurs de voitures, ravalements de

façades, pompiers...). Dans certaines entreprises (imprimeries, industries textiles, fabrication de papier, transformation du bois...) la production exige des taux d'humidité élevés et l'emploi d'installations d'humidification potentiellement contaminantes.

6. Aspects cliniques des légionelloses :

La grande majorité des infections humaines peut être imputée à *L. pneumophila* beaucoup plus rarement à *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* et *L. anisa*. Cependant chacune des autres espèces est à priori capable d'entraîner le même type de symptomatologie (12,20).

Le spectre des manifestations cliniques de la légionellose est large, il comprend des formes asymptomatiques, des infections bénignes, des formes sévères et de possibles évolutions létales.

On distingue classiquement deux entités cliniques principales : la maladie des légionnaires et la fièvre de Pontiac.

6.1. Maladie des légionnaires :

La maladie des légionnaires correspond à une pneumopathie plus ou moins sévère. Il s'agit de la forme clinique la plus fréquemment décrite. Le taux d'attaque est de 0,1 % à 0,5 % (35), et la durée d'incubation est de 2 à 10 jours (21,35). Le début est généralement brutal avec fièvre élevée excédant souvent 40° C, frissons, malaise, myalgies, céphalées, anorexie, toux et dyspnée. La toux est peu productive et lorsque des crachats sont émis, ils sont généralement purulents et plus rarement sanglants. Une douleur thoracique parfois intense est présente et peut évoquer une embolie pulmonaire lorsqu'elle est accompagnée d'hémoptysies. Des troubles gastro-intestinaux peuvent être associés, en particulier une diarrhée aqueuse dans 20 à 40 % des cas (72), plus rarement, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales. Une bradycardie, des troubles rénaux (protéinurie, hématurie, insuffisance rénale) et des signes neurologiques (confusion voire agitation et délire) peuvent également accompagner cette infection.

Une hyponatrémie et une augmentation des transaminases hépatiques sont deux anomalies souvent observées au cours de la maladie des légionnaires (94). Cependant diverses études prospectives ont montré que ces résultats biochimiques n'étaient pas spécifiques et qu'ils ne

pouvaient pas être utilisés pour différencier la maladie des légionnaires des autres causes de pneumopathie (94).

Bien que les infiltrats alvéolaires soient communément associés à la maladie des légionnaires, la radiographie pulmonaire ne permet pas de distinguer cette pathologie des autres causes de pneumopathie (12,20,72,94). Chez les patients immunodéprimés, en particulier ceux sous corticothérapie, on peut observer la formation d'infiltrats nodulaires unilatéraux ou bilatéraux et une cavitation. L'exsudat inflammatoire intense contrastant avec l'absence de crachat correspond à une infection nécrotique qui entraîne la formation d'abcès dans 20 % des cas (20). La progression des infiltrats, malgré un traitement antibiotique adapté, est commune. L'amélioration de l'image radiographique peut nécessiter plusieurs jours après le début de l'amélioration clinique. La complète disparition des infiltrats sur les radiographies peut prendre 1 à 4 mois. Un épanchement pleural est observé chez environ un tiers des patients (72). Un tissu cicatriciel résiduel avec fibrose et insuffisance respiratoire chronique est décrit dans certains cas (20). L'insuffisance rénale aiguë, l'insuffisance respiratoire irréversible et le choc toxi-systémique constituent les trois complications majeures. La maladie évolue vers le décès dans 15 à 20 % des cas (21).

La maladie des légionnaires doit plus particulièrement être suspectée devant le tableau clinique suivant :

- pneumopathie aiguë fébrile bilatérale débutant brutalement,
- infiltrats alvéolaires évidents à la radiographie pulmonaire,
- absence de réponse à un traitement antibiotique à large spectre par pénicilline ou céphalosporine et aminoside,
- survenue chez un sujet dit à risque.

6.2. Manifestations extra-pulmonaires :

Les localisations extra-pulmonaires des infections à légionelles sont rares mais souvent graves. Elles surviennent préférentiellement et quasi exclusivement chez les sujets immunodéprimés (72,94). Ces atteintes sont le plus souvent dues à une diffusion directe par contiguïté avec le poumon ou à une dissémination par voie hématogène. Des bactériémies sont en effet observées dans au moins 20 % des cas de maladie des légionnaires sévères (20,72). Les foyers secondaires à

cette diffusion sont très variés, ils concernent le plus souvent le cœur avec des péricardites, des myocardites et des endocardites principalement sur valve prothétique. Mais également des atteintes du système nerveux central, du tube digestif, du foie (abcès), des reins (pyélonéphrites), de la rate, du péritoine, de la prostate, de la moelle osseuse, de la peau, du tissu sous-cutané (cellulites), des ganglions lymphatiques périphériques, de la thyroïde, du pancréas, des muscles, des testicules et des prothèses endovasculaires (72,94). Ces localisations secondaires peuvent évoluer en même temps que l'atteinte pulmonaire ou ne devenir manifestes que dans les semaines suivant le succès du traitement de la pneumopathie (94).

Un nombre non négligeable d'infections extra-pulmonaires dues à des légionelles ont été rapportées en l'absence de toute pneumopathie. Il s'agit principalement d'infections de plaies chirurgicales, des intestins, du pancréas, des sinus respiratoires, de l'endocarde, du péritoine, de la peau et du tissu sous-cutané (94). Le mode d'infection le plus volontiers décrit est l'inoculation directe de légionelles dans des cicatrices suite à l'utilisation d'eau contaminée pour les soins d'irrigation et de lavage (94). Ainsi, des infections de cicatrices et même des infections cardiaques ont été observées chez plusieurs patients après chirurgie cardiothoracique. Les corps étrangers comme les sutures et les drains ont alors été identifiés comme des facteurs favorisant (72). De la même façon, un cas d'infection de cicatrice de prothèse totale de hanche a été rapporté suite à l'immersion d'un patient dans une baignoire de rééducation contaminée par *L. pneumophila*. Pour d'autres cas d'infections extra-pulmonaires sans pneumopathie associée, l'origine de la contamination n'est pas claire et pourrait résulter de la dissémination bactériémique à partir d'un site occulte (94). Plusieurs cas d'abcès intestinaux à légionelles et même de colites à légionelles suggèrent que l'infection pourrait être contractée suite à l'ingestion d'eau contaminée (94).

Des complications non infectieuses, d'origine immunologique peuvent parfois résulter d'une infection à légionelles, il s'agit de rashes cutanés, d'encéphalites, d'arthrites, de myoglobinuries ou encore d'insuffisances rénales aiguës (20).

6.3. Fièvre de Pontiac (20,21):

La fièvre de Pontiac est une infection peu sévère à *Legionella spp*, souvent d'allure épidémique, présentant un taux d'attaque élevé (>95%) et une incubation courte (1 à 3 jours). Elle se

manifeste comme une infection pseudo-grippale caractérisée par une fièvre, des frissons, des myalgies, des céphalées et éventuellement diarrhée, vertige, malaise ou obnubilation. La pneumonie est absente mais il peut y avoir de la toux. L'évolution est favorable même en l'absence de traitement.

6.4. Formes asymptomatiques :

Les infections à légionelles peuvent être complètement asymptomatiques, ce qui explique la prévalence élevée de la positivité des sérologies légionelles dans la population générale : 5 à 10 % et même jusqu'à 30 % de séroprévalence selon les études (20). En fait cette séroprévalence est sans doute le résultat de plusieurs phénomènes combinés, il peut s'agir d'une séroconversion à la suite d'une maladie des légionnaires, d'une fièvre de Pontiac, d'une séroconversion secondaire à une infection asymptomatique ou encore de réactions sérologiques croisées.

7. Diagnostic des légionelloses :

La recherche d'une infection à *Legionella spp* n'est pas systématique dans le cadre du diagnostic étiologique d'une pneumopathie. En effet, cette solution de facilité est délicate à justifier en terme de rapport bénéfice/coût. Les éléments cliniques, radiographiques et biologiques ne sont pas des éléments spécifiques de diagnostic. De ce fait, l'attitude actuelle consiste à sélectionner un sous-groupe de patients pour lesquels le rendement de ces analyses est plus élevé. Il s'agit de tous les patients dits à risque (affection respiratoire chronique, immunodépression, tabagisme, personnes âgées), des patients atteints d'une pneumopathie sévère nécessitant en particulier une hospitalisation en unité de soins intensifs, des cas de pneumopathies survenant dans un contexte épidémique et des cas nosocomiaux dans une structure dont le réseau d'eau chaude sanitaire est contaminé par les légionelles (95).

7.1. Mise en culture des prélèvements :

La culture demeure le « gold standard » pour le diagnostic des légionelloses (12). C'est la technique la plus spécifique (100%). L'isolement de l'agent pathogène permet d'établir un

diagnostic de certitude (12,20,95). Le milieu BCYE enrichi en α -cétoglutarate est le plus couramment utilisé, il peut être additionné d'albumine sérique bovine qui favorise la croissance de quelques espèces de *Legionella* (12). Pour le diagnostic de la maladie des légionnaires, la culture est principalement réalisée à partir de prélèvements respiratoires. Les lavages broncho-alvéolaires et les aspirations trachéales ou bronchiques sont les prélèvements qui donnent les meilleurs résultats (12,95). Lorsque ce type de prélèvement ne peut être réalisé et que les patients expectorent, les crachats ne doivent pas être négligés, y compris ceux contenant peu de polynucléaires et/ou riches en cellules épithéliales (12,72,95). Les *Legionella spp* peuvent aussi être isolées à partir de biopsies pulmonaires, de liquides pleuraux, du sang et de diverses autres localisations lorsqu'il existe des atteintes extra-pulmonaires (12). Les prélèvements doivent être obtenus de préférence avant toute antibiothérapie. Les *Legionella spp* sont des bactéries fragiles qui survivent difficilement dans les prélèvements, la mise en culture doit donc être réalisée le plus rapidement possible (12,95). Si les échantillons ne peuvent être gérés immédiatement, il est recommandé de les conserver à + 4° C.

Lorsque les échantillons obtenus proviennent de sites non stériles, des milieux sélectifs doivent être utilisés. Les agents antimicrobiens utilisés dans ces milieux peuvent inhiber la croissance de certaines *Legionella spp*, en particulier les *Legionella non-pneumophila*. Il est donc important de toujours ensemercer en parallèle un milieu non sélectif. Chez des patients hospitalisés porteurs de bactéries multirésistantes, l'utilisation de ces milieux est parfois insuffisante pour éliminer les contaminants et un pré-traitement des échantillons par la chaleur ou un tampon acide peut être nécessaire. Ces procédés diminuent la sensibilité de la culture car cette décontamination peut aussi inhiber ou détruire certaines *Legionella spp* (20).

La sensibilité de la culture varie de 10 % à 80 % en fonction des études (12,21,95). Il a été observé que ces résultats de sensibilité étaient fortement influencés par l'expérience du laboratoire qui réalisait l'analyse (12,94). Les délais de croissance sont en moyenne de 3 à 7 jours et ne permettent pas une orientation rapide du diagnostic dès le début de l'évolution de la maladie.

La culture a donc deux principaux avantages, elle constitue un élément de diagnostic de certitude et elle permet une identification complète de l'espèce responsable. La souche bactérienne ainsi obtenue pourra éventuellement être comparée avec des souches d'autres patients et des souches environnementales, ce qui est très utile dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques.

7.2. Immunofluorescence directe :

L'immunofluorescence directe peut être utilisée pour détecter les *Legionella spp* dans les tissus pulmonaires et les sécrétions respiratoires, mais également pour identifier des bactéries isolées en culture (12).

La sensibilité est très faible, de l'ordre de 25 % à 75 % en fonction des études (12,20,21,72,95) et la spécificité de 94 % à 95 %. Cette spécificité peut être beaucoup plus faible si l'analyse est réalisée par un personnel peu expérimenté (94,95).

L'immunofluorescence directe est réalisée avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux reconnaissant tous les sérogroupes de *L. pneumophila* pour la majorité des kits commerciaux (12,21).

La combinaison d'une sensibilité médiocre à un risque élevé de faux positifs explique l'intérêt très limité de cette technique (20,95).

7.3. Sérologie :

La détermination de la présence d'anticorps peut s'effectuer à partir d'un pool d'antigènes polyvalents regroupant plusieurs sérogroupes ou espèces de *Legionella spp*, ou bien en utilisant des antigènes monovalents obtenus à partir d'une seule espèce ou séro groupe. Une séroconversion avec des anticorps dirigés contre des antigènes monovalents de *L. pneumophila* séro groupe 1 est généralement considérée comme un critère hautement prédictif d'une infection récente. Par contre, la sensibilité et la spécificité des tests utilisant des antigènes monovalents d'autres sérogroupes ou espèces de *Legionella*, ne sont pas rigoureusement établies (95). L'emploi de pools d'antigènes polyvalents n'est pas recommandé car il expose à un risque élevé de faux positifs (12). Le diagnostic d'espèce et de séro groupe par sérologie est peu fiable car les réactions croisées sont fréquentes entre les différents membres de la famille des *Legionellaceae* (12,20,95).

Les délais de séroconversion sont variables en fonction des patients. Dans la majorité des cas, une multiplication par quatre du titre des anticorps est obtenue en trois à quatre semaines, mais peut parfois nécessiter plus de dix semaines (12,20,72,95). Il y a donc un risque de faux négatifs si les

sérums sont obtenus trop tôt après le début de l'infection (95). En cas de forte suspicion de légionellose et en l'absence de séroconversion, un troisième prélèvement doit être demandé (95). Une faible proportion de patients ne développe pas d'anticorps malgré un diagnostic certain de légionellose (12,95). Dans tous les cas, le diagnostic sérologique est posé tardivement.

Le critère de diagnostic par sérologie est une augmentation du titre d'anticorps ($\times 4$) avec un deuxième titre minimum de 128 (20,72,95). Un seul titre élevé (> 256) a longtemps été considéré comme un critère suffisant pour établir un diagnostic présomptif, mais est actuellement considéré comme peu fiable (12,95,96), notamment à cause de la prévalence élevée de ces anticorps dans la population générale. La recherche d'immunoglobulines M spécifiques n'est pas un test fiable pour le diagnostic d'une infection aiguë car ces anticorps peuvent n'apparaître que très tardivement et persister très longtemps (12,20,95).

La spécificité est de l'ordre de 95 % à 99 % si on considère la séroconversion et de 94 % si on considère le titre sur un seul sérum (12,20,21,95). La sensibilité du diagnostic sérologique basé sur l'observation d'une élévation du titre des anticorps varie de 60 % à 80 % en fonction des études (12,20,95). Elle chute à 65 % si on considère uniquement un titre élevé en phase tardive et à 10 % pour un titre élevé précoce (21).

7.4. Recherche d'antigènes solubles urinaires :

Au moins 80 % des patients atteints de légionellose possèdent des antigènes solubles de *Legionella spp* dans leurs urines dès l'apparition des symptômes (21).

Les principaux tests développés sont des méthodes immunoenzymatiques ou immunochromatographiques. Parmi les test immunoenzymatiques, deux sont considérés comme spécifiques de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Binax EIA[®], Binax, Portland, Etats-Unis et Trinity BIOTECH[®], Bray, Irlande) et un troisième (Biotest EIA[®], Biotest AG, Dreieich, Allemagne) est proposé pour détecter tous les sérogroupes de *L. pneumophila* ainsi que les autres espèces du genre *Legionella*. Les tests Binax EIA[®] et Biotest EIA[®] ont des performances similaires avec une spécificité très élevée et des sensibilités respectives de 66,7 % et 63,8 %, améliorées à 86,7 % et 88,9 % si les urines sont préalablement concentrées (97). Il a également été observé que ces deux méthodes pouvaient détecter les antigènes extraits à partir de culture de *L. bozemanii* et de 14 sérogroupes de *L. pneumophila* (97) ; ce type de résultats, attendus avec le test Biotest EIA[®], est

plus surprenant avec le test Binax EIA[®]. Il s'agit en fait de réactions croisées avec le test Binax EIA[®] dont les anticorps polyclonaux reconnaissent des épitopes communs aux *Legionellaceae* (12). En clinique, ces deux tests sont beaucoup moins performants pour la détection d'antigènes des autres espèces ou sérogroupes que pour la détection d'antigènes de *L. pneumophila* séro groupe 1 (98).

Un kit unitaire d'immunochromatographie sur membrane spécifique de *L. pneumophila* séro groupe 1 (NOW *Legionella*[®], Oxoid, Dardilly, France) est disponible. Son intérêt réside dans la rapidité de la méthode (réponse en 15 minutes) et dans sa facilité d'exécution. Ses performances sont comparables à celles des techniques EIA (12,95,99). La spécificité est de 97 % et la sensibilité après concentration préalable de l'urine atteint 80 % (12). Par un phénomène de réaction croisée, ce test permet également de mettre en évidence 16 à 30 % des infections à *Legionella non-pneumophila* (100)

Actuellement, aucun test commercialisé ne permet de détecter tous les sérogroupes et espèces du genre *Legionella*. C'est pourquoi la sensibilité globale de la technique est faible, de l'ordre de 53 % à 56 % ; de ce fait, ces tests ne peuvent pas être utilisés seuls dans le cadre du diagnostic (12). Une étude réalisée sur 317 cas de légionellose a montré que la sensibilité globale des tests Binax EIA[®] et Biotest EIA[®] était respectivement de 86.5 % et 76 % dans le cadre d'infections communautaires et que cette sensibilité chutait à 44.2 % et 45.7 % dans le cadre de légionelloses nosocomiales (101).

La spécificité des techniques par recherche de l'antigène urinaire est très élevée, proche de 100 % (12,72,95). Seuls quelques cas de faux positifs ont été rapportés, principalement chez des patients atteints de maladie sérique (95).

Le délai d'apparition des antigènes dans l'urine est très variable, il est en moyenne de 1 à 3 jours après le début des symptômes (12,95). L'élimination est prolongée sur plusieurs semaines, indépendante de l'initiation d'une thérapeutique adaptée. Moins de 10 % des cas confirmés ont une antigénurie positive plus de 60 jours après le début de la maladie (72), mais dans de rares cas, l'excrétion s'est poursuivie plus de 300 jours (72,95). Cette persistance des antigènes dans l'urine est un avantage mais aussi une limite de la technique, puisqu'un test positif peut ne pas correspondre à une légionellose en phase aiguë et que la rechute ou la récurrence de la maladie ne peuvent pas être évalués par cette méthode.

La recherche d'antigènes urinaires de *Legionella spp* est un outil de diagnostic précoce simple à mettre en œuvre, permettant l'instauration rapide d'un traitement adapté et nécessitant un échantillon biologique facilement disponible.

La mise au point de cette méthode a conduit à la réévaluation de la définition de la maladie des légionnaires en 1995 (96). Actuellement, la positivité de la recherche d'antigènes solubles urinaires est considérée comme un élément suffisant pour affirmer une légionellose. L'utilisation de cette technique a permis d'améliorer considérablement le diagnostic et le nombre de cas déclarés (7).

L'excrétion urinaire d'une lipoprotéine commune à l'ensemble des espèces du genre *Legionella*, a récemment été décrite (102). Elle pourrait être utilisée pour la mise au point d'un test de diagnostic urinaire à large spectre. En effet, le développement de tests capables de détecter de façon fiable et sensible les antigènes urinaires de l'ensemble des sérogroupes et espèces de *Legionella* pathogènes représenterait une avancée majeure et ferait de ces tests un outil diagnostic de choix.

7.5. Amplification génique :

De nombreuses méthodes basées sur l'amplification génique ont été utilisées pour détecter les *Legionella spp* à partir d'une grande variété de prélèvements tels que le sang total, le sérum, l'urine et les sécrétions respiratoires (expectorations, broncho-aspirations, lavages broncho-alvéolaires, écouvillonnages pharyngés ou naso-pharyngés) (12,72,95,103). Les gènes cibles les plus souvent utilisés sont le gène de l'ARN ribosomal 5S et le gène de l'ARN ribosomal 16S pour les techniques spécifiques du genre *Legionella*, et le gène du « macrophage infectivity potentiator » pour les méthodes spécifiques de l'espèce *L. pneumophila*.

Les évaluations initiales de la Polymerase Chain Reaction (PCR) réalisées à partir d'échantillons cliniques indiquaient une grande spécificité mais une sensibilité modérée (12,72). L'amélioration des techniques d'extraction et de purification de l'ADN a permis d'augmenter la sensibilité de la PCR. L'avènement des méthodes de PCR couplées à une détection spécifique en temps réel des séquences amplifiées, par l'intermédiaire de sondes marquées, a permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité. Ainsi, lorsque la PCR a été réalisée sur des prélèvements du tractus respiratoire inférieur, des sensibilités égales voire supérieures à la culture ont été obtenues (12,103-108).

Cependant les études restent encore limitées et une expérience clinique plus importante est encore nécessaire pour valider ces conclusions (12,20).

En ce qui concerne les prélèvements non respiratoires (urine, sang), l'application de la PCR est séduisante car elle permettrait de contourner le problème des patients qui n'expectorent pas et éviterait la réalisation de prélèvements invasifs. Cependant, les études sont limitées sur de tels prélèvements, et les performances de la PCR dans ces conditions semblent nettement inférieures à celles des PCR réalisées sur des prélèvements respiratoires (95,109).

Les essais récents montrent que les techniques d'amplification génique sont prometteuses pour le diagnostic des infections à *Legionella spp.* Elles présentent l'avantage d'obtenir des résultats en un temps réduit et de permettre le diagnostic des infections quelle que soit l'espèce ou le sérotype en cause (12,72,95,103). Cependant, elles restent encore pour l'instant du domaine des laboratoires spécialisés et aucun kit commercial n'est disponible.

7.6. Stratégie diagnostique :

De façon générale, le diagnostic d'une infection à *Legionella spp* doit s'appuyer sur la recherche de l'antigène urinaire de *L. pneumophila* sérotype 1 associé à la recherche par culture.

La PCR effectuée à partir des sécrétions respiratoires doit être considérée avec attention lorsque celle-ci est réalisable, car sa sensibilité peut être supérieure à la culture. De plus, elle permet de détecter certaines espèces de *Legionella* non cultivables.

Les tests sérologiques ont peu d'intérêt dans la phase aiguë de l'infection mais ils restent un outil intéressant pour le diagnostic rétrospectif et lors d'enquêtes épidémiologiques.

Critères de définition des cas (74):

- Cas confirmé :
 - isolement de *Legionella spp* dans un prélèvement clinique,
 - et/ou augmentation du titre d'anticorps sérique ($\times 4$) avec un deuxième titre minimum de 128,
 - et/ou présence d'antigène soluble urinaire,
 - et/ou immunofluorescence directe positive sur un prélèvement clinique.

- Cas probable :
 - titre unique d'anticorps sérique élevé (≥ 256).

La technique PCR n'est pas reconnue actuellement au niveau européen et national comme méthode diagnostique principale.

8. Traitement des légionelloses :

La mortalité des légionelloses dépend entre autre de la précocité de la mise en place d'une antibiothérapie adaptée. De ce fait, certains auteurs suggèrent que le traitement empirique des pneumopathies communautaires nécessitant une hospitalisation, devrait inclure un antibiotique actif sur les *Legionella spp* (12,72,110).

Jusqu'à présent, aucun essai clinique randomisé, comparant l'efficacité des différents antibiotiques utilisables, n'a été réalisé (12,110). Les recommandations sont donc basées sur l'expérience clinique et les tests *in vitro*.

L'érythromycine a longtemps été l'antibiotique de choix, mais depuis les années 1990 on lui préfère les macrolides plus récents et les fluoroquinolones (tableau IV). Ces molécules présentent une toxicité moindre et une meilleure diffusion dans le tissu pulmonaire ainsi qu'à l'intérieur des cellules (110). La rifampicine est également active vis-à-vis des *Legionella spp*, mais son utilisation en monothérapie expose à un risque de développement de résistances (111,112). D'autres antibiotiques ont été utilisés avec succès mais de façon plus anecdotique (tableau IV). Les fluoroquinolones doivent être préférées chez les patients transplantés car les macrolides et la rifampicine peuvent interférer avec les traitements immunosuppresseurs (72).

Un traitement par voie parentérale est recommandé jusqu'à l'apparition d'une réponse clinique objective (72) et certains auteurs suggèrent l'emploi d'une dose de charge initiale pour les cas sévères et chez les patients immunodéprimés (110). Les antibiotiques disponibles uniquement par voie orale sont donc d'utilisation limitée.

La durée du traitement peut varier de 10 jours à 3 semaines, en fonction du statut immunitaire du patient, de la présence de co-morbidités, de la sévérité des manifestations cliniques, de l'existence de localisations extra-pulmonaires, du délai avant la mise en place d'une

antibiothérapie adaptée, de la réponse initiale au traitement et du profil pharmacocinétique et pharmacologique des molécules utilisées.

Tableau IV : antibiotiques utilisés dans le traitement des légionelloses (72,110)

Antibiotique	Formes galéniques disponibles en France	Posologie
Macrolides :		
- Azythromycine	Formes orales uniquement	500 mg toutes les 24h
- Clarithromycine	Formes orales et intraveineuses	500 mg toutes les 12h
- Roxithromycine	Formes orales uniquement	300 mg toutes les 12h
- Erythromycine	Formes orales et intraveineuses	1 g toutes les 6h (i.v.) 500 mg toutes les 6h (<i>per os</i>)
Fluoroquinolones :		
- Ciprofloxacine	Formes orales et intraveineuses	400 mg toutes les 8h (i.v.) 750 mg toutes les 12h (<i>per os</i>)
- Levofloxacine	Formes orales et intraveineuses	500 mg toutes les 24h
- Ofloxacine	Formes orales et intraveineuses	400 mg toutes les 12h
- Moxifloxacine	Formes orales uniquement	400 mg toutes les 24h
Doxycycline :	Formes orales et intraveineuses	100 mg toutes les 12h
Trimethoprime/ sulfamethoxazole	Formes orales et intraveineuses	160 et 800 mg toutes les 8h (i.v.) 160 et 800 mg toutes les 12h (<i>per os</i>)
Rifampicine	Formes orales et intraveineuses	300 à 600 mg toutes les 12h

Des mécanismes de résistance ont été décrits pour l'érythromycine, la rifampicine et les fluoroquinolones (111-113). C'est pourquoi des associations d'antibiotiques sont parfois utilisées, le plus souvent dans le cadre d'infections sévères ou ne répondant pas au traitement initial. De telles associations exposent à un risque accru de toxicité et d'interactions médicamenteuses et leur intérêt n'est pas démontré (12,110). Il s'agit en général de l'association d'une fluoroquinolone ou d'un macrolide à de la rifampicine (110).

9. Politique de prévention des légionelloses en France :

Les actions des pouvoirs publics vis-à-vis du risque lié aux légionelles se basent d'une part sur la surveillance épidémiologique, d'autre part sur des mesures de contrôle et de prévention, qui sont encadrées par plusieurs réglementations et recommandations.

9.1 Surveillance épidémiologique :

Le décret n° 87-1012 du 11 décembre 1987 a institué la déclaration obligatoire des cas de légionellose afin de suivre l'évolution de l'incidence et de détecter les cas groupés. Face à un constat de sous-déclaration, ce dispositif de surveillance a été renforcé en 1997 (circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose).

Au dispositif national s'ajoute un réseau européen de surveillance de la légionellose acquise lors des voyages, regroupant 36 pays (European Working Group for *Legionella* Infection : EWGLI).

9.2. Prévention primaire des légionelloses :

Toute installation risquant d'exposer des personnes à des gouttelettes d'eau de taille inférieure à 5 µm doit faire l'objet de mesures préventives. L'objectif est d'éliminer les conditions favorables à la survie et à la prolifération des *Legionella spp* et de limiter leur diffusion sous forme d'aérosols. Les réseaux d'eau chaude sanitaire et les tours aéroréfrigérantes des systèmes de climatisation sont principalement visés, mais également les bains à remous ou à jets, les spas, les jacuzzis, les bains à bulles, les baignoires à brassage, les fontaines décoratives, les brumisateurs, les humidificateurs, les jeux d'eau ...

Les établissements de santé et les établissements thermaux ont l'obligation réglementaire de mettre en œuvre des moyens de prévention, pour l'ensemble de ces installations à risque. Pour l'instant, les autres bâtiments recevant du public (hôtels, campings, administrations...) ne font pas l'objet de dispositions réglementaires mais de recommandations.

En ce qui concerne les tours aéroréfrigérantes, seules les installations à pulvérisation d'eau dans un flux d'air visées par la rubrique 2920 de la nomenclature des installations classées, sont réglementées par des arrêtés préfectoraux.

9.2.1. Limitation du développement des *Legionella spp*

En ce qui concerne les réseaux d'eau chaude sanitaire, trois types d'actions doivent être engagées : lutter contre l'entartrage et la corrosion, éviter la stagnation de l'eau et maintenir l'eau à un niveau de température élevé (> 50° C) depuis la production et tout au long des circuits de distribution. Ainsi, des recommandations concernant la conception, la maintenance, les

consignes de température à respecter, le nettoyage et la désinfection des installations intérieures d'eau chaude sanitaire sont édictées :

- **Circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997** relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose.
- **Circulaire n° DGS/VS4/98/771 du 31 décembre 1998** relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public.
- **Circulaire n° DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002** relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.
- **Circulaire DGS n° 2002/273 du 2 mai 2002** relative à la diffusion du rapport du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) relatif à la gestion du risque lié aux légionelles.

Les mêmes textes édictent des recommandations de maintenance, d'entretien, de désinfection et de conception pour les tours aéroréfrigérantes et sont complétés par le « Guide de bonnes pratiques : *Legionella* et tours aéroréfrigérantes » rédigé par le ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement et le ministère de l'emploi et de la solidarité en septembre 2001, disponible sur le site Internet du ministère chargé de la santé (www.sante.gouv.fr). Les modalités d'entretien et de désinfection des autres installations à risque sont également visées par ces circulaires.

9.2.2. Surveillance de l'état de contamination des installations :

La recherche et le dénombrement des *Legionella spp* ainsi que le suivi de la température de l'eau sont les deux paramètres qui doivent faire l'objet d'une surveillance dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. En ce qui concerne les autres installations à risque, seul le « paramètre *Legionella* » doit être considéré. Les modalités de cette surveillance sont édictées par les circulaires n° DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 et par les recommandations du rapport du CSHPF relatif à la gestion du risque lié aux légionelles. Elles indiquent la fréquence des contrôles, la stratégie d'échantillonnage, les conditions de prélèvement et d'analyse ainsi que les éléments d'interprétation.

D'une manière générale, en l'absence de contamination du réseau, le « paramètre *Legionella* » doit au moins faire l'objet d'une analyse annuelle pour chaque point d'eau étudié. La température doit être mesurée mensuellement ou idéalement en continu. Le contrôle des tours aéroréfrigérantes doit également être annuel.

Les analyses doivent être réalisées par un laboratoire habilité, en utilisant la méthode normalisée AFNOR T90-431.

9.2.3. Actions préconisées en fonction des concentrations en *Legionella* dans les installations à risque :

Le «paramètre *Legionella*» permet de fixer des niveaux cibles au delà desquels des actions doivent être engagées (tableau V et VI).

Tableau V : niveaux de concentration en *L. pneumophila* proposés dans l'eau chaude sanitaire au niveau des points les plus représentatifs, et actions subséquentes (35)

Concentration en <i>Legionella pneumophila</i>	Niveau d'intervention / actions subséquentes
<10 ³ UFC/l	Niveau cible : <ul style="list-style-type: none"> - Entretien régulier des réseaux et équipements - Surveillance régulière de la température et des taux de <i>Legionella spp</i>
≥ 10 ³ UFC/l et < 10 ⁴ UFC/l	Niveau d'alerte : <ul style="list-style-type: none"> - Vérifier l'origine des écarts par rapport aux résultats d'analyses antérieures - Renforcer les mesures d'entretien - Renforcer les contrôles
≥ 10 ⁴ UFC/l	Niveau d'action : <ul style="list-style-type: none"> - Intervention technique pour supprimer l'exposition : interdiction des usages à risque (douches, ...) - Mise en place de moyens curatifs immédiats (choc de produits de désinfection, choc thermique)

Dans les structures hospitalières, pour les patients dits «à haut risque», des mesures préventives particulières sont nécessaires. Elles concernent les immunodéprimés sévères et particulièrement les immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe et les immunodéprimés par corticothérapie prolongée (0.5 mg/kg de prednisone pendant plus de 30 jours ou équivalent) ou récente à haute dose (> 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours ou équivalent). Pour ces patients, l'eau soutirée au niveau de points d'usage à risque doit respecter en permanence une concentration en *L. pneumophila* inférieure au seuil de détection (< 50 UFC/l). Dans les services accueillant régulièrement des patients « à haut risque », il est recommandé de créer des secteurs équipés de «points d'usage sécurisés». Dans ces secteurs, des moyens spécifiques sont déployés afin de respecter des niveaux de concentration en *L. pneumophila* inférieurs au seuil de détection dans l'eau soutirée : microfiltres terminaux constitués d'une membrane de 0.2 µm, dispositifs de production autonome et instantanée d'eau chaude, traitements spécifiques de l'eau.

Les normes de qualité microbiologique des eaux minérales imposent une concentration en *L. pneumophila* inférieure au seuil de détection en tout point d'usage de l'eau utilisée pour les soins (Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'Arrêté du 14 octobre 1937 modifié, relatif au contrôle des sources d'eaux minérales).

Tableau VI : niveaux de concentration en *L. pneumophila* proposés dans l'eau des tours aéroréfrigérantes, et actions subséquentes (35)

Concentration en <i>Legionella pneumophila</i>	Niveau d'intervention / actions subséquentes
<10 ³ UFC/l	Niveau cible : - Mesures d'entretien et de suivi normal
≥ 10 ³ UFC/l et < 10 ⁵ UFC/l	Niveau d'alerte : - Mise en œuvre des mesures nécessaires pour abaisser la concentration en <i>Legionella</i> en dessous de 10 ³ UFC/l
≥ 10 ⁵ UFC/l	Niveau d'action : - Arrêt du fonctionnement du système de refroidissement - Information de l'inspection des installations classées de la DDASS - Vidange, nettoyage, désinfection avant remise en service

Pour les autres installations à risque, le niveau de concentration en *L. pneumophila* doit être inférieur à 10³ UFC/l.

9.3. Prévention secondaire des légionelloses :

Les modalités de cette prévention sont précisées dans la circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 et dans les recommandations de rapport du CSHPF relatif à la gestion du risque lié aux légionelles. Elle repose sur la réalisation d'enquêtes environnementales systématiques :

- dès la survenue d'un cas dans un établissement de santé ou une station thermale,
- dès la survenue de deux cas ou plus en dehors de ces structures.

Cette enquête doit comprendre la recherche des expositions à risque, une expertise technique des sources potentielles avec recherche et dénombrement des *Legionella spp*, et la vérification de leur maintenance. L'objectif est d'identifier la source de contamination et de déterminer les causes éventuelles de la prolifération des *Legionella spp*.

En cas de contamination des sources potentielles de l'infection, des actions curatives doivent être entreprises : décontamination immédiate de l'installation, puis mise en œuvre de moyens au long cours pour éviter la recolonisation.

10. Recherche des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques par mise en culture :

La mise en culture d'échantillons environnementaux représente actuellement la principale méthode pour la recherche et le dénombrement des *Legionella spp*. En France la technique officielle est la norme AFNOR T90-431 dont les détails seront vus ultérieurement. Brièvement, il s'agit d'une méthode par ensemencement après filtration d'un prélèvement d'eau d'un litre. D'autres méthodes peuvent être employées (tableau VII).

Tableau VII : recommandations pour la recherche des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques, selon trois organismes différents (114)

Organisme de référence	Prélèvements conseillés	Méthode de concentration conseillée	Technique de décontamination conseillée	Milieus ensemencés
Veterans Affairs Medical Center (Pittsburg, Pa)	Écouvillonnage de biofilm +++ <i>Eventuellement prélèvement d'eau</i>	Centrifugation	Tampon acide pendant 3 minutes	BCYE, DGVP (Dyes, Glycine, Vancomycin, Polymyxin B)
Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, Ga.)	Écouvillonnage de biofilm suivi d'un prélèvement d'eau	Filtration	Tampon acide pendant 15 minutes	BCYE, GPAV (Glycine, Polymyxin B, Anisomycin, Vancomycin).
Hygiene Institute (Graz, Austria)	Echantillon d'eau	Filtration	Tampon acide pendant 15 minutes	BCYE, GVPC (Glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximide)

Pour un même site de prélèvement, les écouvillonnages de biofilm permettent généralement d'obtenir des taux supérieurs à ceux obtenus à partir des eaux (114). Ceci est expliqué par le fait que les *Legionella spp* se concentrent au sein du biofilm et y adhèrent. Selon certains auteurs, des installations à risque pourraient ne pas être identifiées si l'on se base uniquement sur des analyses réalisées à partir d'échantillons d'eau (114). Les écouvillonnages de biofilm présentent l'avantage d'être peu volumineux, de transport aisé et d'alléger les protocoles, puisque les étapes de concentration ne sont pas nécessaires. La réalisation de ce type de prélèvement n'est cependant pas toujours possible, de plus il n'est pas forcément représentatif des bactéries circulantes et est plus souvent fortement contaminé par d'autres bactéries.

En ce qui concerne la méthode de concentration des échantillons d'eau, la filtration est une technique plus efficace que la centrifugation (114,115). En fonction des filtres utilisés, l'efficacité de la technique de concentration peut varier. Ainsi, il a été observé que les filtres en polycarbonate permettaient d'obtenir de meilleurs résultats que les filtres en cellulose (115). Cette observation, est expliquée par la structure des filtres. Les filtres en cellulose sont constitués de fibres entrecroisées avec des pores tortueux qui ne facilitent pas le relargage des bactéries, tandis que les filtres en polycarbonate sont constitués de pores droit perforés au travers d'une membrane. En fonction des filtres en polycarbonate utilisés, le pourcentage de récupération des bactéries peut également varier (116).

Les agents antimicrobiens contenus dans les milieux sélectifs peuvent inhiber la croissance d'une partie des *Legionella spp* (20,114,117-122). Cette inhibition est variable en fonction du type d'agent antimicrobien utilisé et de l'espèce de *Legionella* considérée (114,118-120,122). Différents milieux BCYE sélectifs sont utilisables et leurs performances sont variables en terme d'inhibition de la croissance de la microflore contaminante et en terme de non-inhibition de la croissance des *Legionella spp*. Ainsi Reinthaler et coll (119) et Wellinghausen et coll (120) ont constaté que le milieu BCYE-GVPC était le plus favorable à la croissance des *Legionella spp* et le plus efficace pour éliminer les bactéries contaminantes.

L'utilisation de milieux sélectifs n'est cependant pas toujours suffisante et un pré-traitement de décontamination des échantillons avant leur ensemencement est parfois nécessaire (114,118,119,121-123). Les *Legionella spp* étant plus résistantes à la chaleur et aux pH acides que les autres espèces bactériennes, des traitements de décontamination par la chaleur ou l'acidité peuvent être proposés. Différents protocoles sont utilisés (114,118,119,121-123). Le temps de contact des échantillons avec un tampon acide peut varier de 3 à 15 minutes, et être éventuellement suivi d'une étape de neutralisation par de la soude. Le traitement thermique est généralement effectué à 50° C pendant 30 minutes. Ces processus peuvent provoquer une perte de viabilité des *Legionella spp* pouvant atteindre 99% (115,118,122,123). La sensibilité aux traitements acides ou par la chaleur est variable en fonction des espèces de *Legionella spp*, et en fonction des souches pour une même espèce (118). Lorsque l'on compare ces procédés de décontamination, il n'y a pas de consensus pour déterminer quelle est la méthode la plus efficace (118,119,122,123). Il est recommandé de toujours réaliser un ensemencement sans traitement

préalable, ce qui peut éventuellement permettre de rattraper des faux négatifs ou des quantifications faussement diminuées.

Nous constatons qu'en fonction des méthodologies utilisées, le dénombrement des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques, peut présenter une grande variabilité. Dans les pays où des seuils d'alerte et d'intervention sont proposés en fonctions des taux de *Legionella spp* retrouvés dans les eaux, il est donc nécessaire d'utiliser des protocoles standardisés pour que les résultats soient exploitables (114). Cependant, même lorsque qu'une technique standardisée est employée, pour un même échantillon d'eau, les résultats peuvent présenter des variations importantes allant jusqu'à deux logarithmes (35). De nombreux facteurs interviennent en effet, tels que les conditions de transport, de conservation des échantillons, et des variations de qualité des milieux de culture qui peuvent être observées en fonction des lots et des fournisseurs. Cette technique est également « manipulateur-dépendante » puisqu'il existe plusieurs étapes critiques tels que la remise en suspension des bactéries à partir du filtre et les étapes de pré-traitement dont les modalités doivent être scrupuleusement respectées pour que les résultats soient reproductibles.

Les techniques d'ensemencement présentent l'inconvénient de ne pas permettre la mise en évidence de toutes les *Legionella spp* viables dans les échantillons (20,22,120,124-129). Il peut s'agir de souches bactériennes particulièrement fastidieuses ou particulièrement adaptée à la croissance en milieu intracellulaire, d'une inhibition liée au développement d'autres bactéries (115), d'un effet inhibiteur des milieux sélectifs ou encore de bactéries endommagées par les techniques de concentration (120). Selon certains auteurs, 99 % des *Legionella spp* présentes dans un échantillon sont viables mais non cultivables, notamment au niveau des eaux de surface et/ou froides (35). Le résultat des UFC peuvent aussi être faussés par la localisation des *Legionella spp* au sein des amibes. En effet, plusieurs dizaines de *Legionella spp* ainsi regroupées ne vont donner qu'une seule colonie en culture.

La technique de recherche et de dénombrement des *Legionella spp* par mise en culture demeure la méthode de référence, cependant elle manque de précision et de sensibilité (114,115). Il a été rapporté que seulement 10 à 30 % de la totalité des *Legionella spp* présentes dans l'échantillon initial étaient ainsi détectées (125). C'est également une méthode fastidieuse, avec des étapes de pré-traitement des échantillons qui alourdissent la technique. Les délais de rendu de résultats sont longs, puisque des lectures sont effectuées à 3, 7, et 10 jours.

Le manque de sensibilité et de reproductibilité des ces méthodes, explique en partie pourquoi une corrélation entre le degré de colonisation des installations et le risque d'acquisition de légionellose, n'a pour l'instant jamais pu être précisément établie.

Matériel et méthodes/résultats

Introduction

Actuellement, la méthode normalisée AFNOR T90-431 est la technique de référence pour la recherche et le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau. Cependant cette méthode manque de sensibilité, de reproductibilité et n'est pas vraiment adaptée aux prélèvements polymicrobiens. Elle peut de ce fait, sous-évaluer le risque lié aux légionelles.

Face aux limites de cette méthode par mise en culture, d'autres techniques ont été développées (28,35,50,120,125-136). Les applications de biologie moléculaire semblent les plus intéressantes, en particulier depuis l'avènement des techniques d'amplification génique en temps réel quantitatives. Ces techniques permettent de réaliser en un temps l'amplification, l'identification et la quantification de l'acide nucléique présent dans le prélèvement. Elles présentent de plus, par rapport aux PCR classiques, plusieurs avantages substantiels : un temps de réalisation inférieur, la détection et l'identification de l'acide nucléique amplifié se fait parallèlement à son amplification, ce qui réduit considérablement le risque de contamination croisée et de faux positifs.

En nous basant sur les travaux précédemment publiés par Wellinghausen et coll (120), nous allons d'abord évaluer les performances de deux PCR quantitatives en temps réel. La première est spécifique du genre *Legionella*. La seconde est spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila*. Nous allons en particulier étudier la sensibilité et la spécificité de ces techniques ainsi que la reproductibilité des résultats de quantification et la capacité à dénombrer de façon fiable l'ADN des *Legionella spp* en présence d'ADN d'autres espèces bactériennes. Dans un second temps nous allons comparer ces techniques à la méthode normalisée, sur des eaux artificiellement chargées puis sur des prélèvements reçus en routine au laboratoire.

A.

Mise au point et évaluation de la limite de détection, de la sensibilité, de la spécificité et de la reproductibilité de deux protocoles de PCR quantitative en temps réel pour le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau

1. Objectifs :

Mise au point et évaluation de la spécificité, de la sensibilité et de la reproductibilité de deux protocoles de PCR quantitative en temps réel pour la détection et la numération des *Legionella spp* et de *L. pneumophila* dans des échantillons d'eau.

2. Matériel et méthodes :

2.1. Souches bactériennes :

La mise au point de la PCR a été réalisée sur une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152).

L'ADN de cette souche a également été utilisé pour préparer un contrôle positif de PCR et le standard externe servant à l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Pour l'étude de la spécificité, 31 souches de *Legionella spp* et 35 souches correspondant à des espèces n'appartenant pas au genre *Legionella* ont été utilisées (tableau VIII).

Toutes les souches de *Legionella spp* ont été mises en culture sur un milieu « Buffered Charcoal-Yeast Extract » additionné d' α -cétoglutarate (BCYE α , OXOID[®]), à 37° C en aérobiose, en atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂ pendant 72h.

Les autres bactéries ont été mises en culture sur des milieux usuels (gélose Mueller Hinton, gélose Columbia avec 5% de sang de mouton, gélose chocolat avec IsoVitalax[®]), permettant leur croissance optimale.

2.2. Extraction de l'ADN des souches bactériennes :

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir de colonies bactériennes remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile.

2.2.1 Extraction de l'ADN des *Legionella spp* :

Nous avons utilisé un kit d'extraction QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN[®]) suivant le protocole fourni par le fabricant pour l'extraction de bactéries à Gram négatif.

Tableau VIII : souches bactériennes testées par PCR

Espèce et séro-groupe	Origine	Nombre de souches
<i>Legionella pneumophila</i> :		
Séro-groupe 1	Isolats clinique	11
	Environnement	7
Séro-groupe 2-14	Isolats clinique	2
	Environnement	7
Autres espèces de <i>Legionella</i> :		
<i>Legionella longbeachae</i>	Isolat clinique	1
<i>Legionella taurinensis</i>	Environnement	1
<i>Legionella gormanii</i>	NCTC 33297	1
<i>Legionella anisa</i>	ATCC 35292	1
Autres bactéries :		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolat clinique	1
<i>Aeromonas caviae</i>	Environnement	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Isolat clinique	1
<i>Alcaligenes faecalis</i>	CIP 6080T	1
<i>Bacillus pumilus</i>	Isolat clinique	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	Isolat clinique	1
<i>Clostridium perfringens</i>	Isolat clinique	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Isolat clinique	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Isolat clinique	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	1
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	1
<i>Flavobacterium indologenes</i>	Isolat clinique	1
<i>Haemophilus influenzae b</i>	Isolat clinique	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolat clinique	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Isolat clinique	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Isolat clinique	1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Isolat clinique	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Isolat clinique	1
<i>Neisseria mucosa</i>	Isolat clinique	1
<i>Pasteurella multocida</i>	Isolat clinique	1
<i>Proteus mirabilis</i>	Isolat clinique	1
<i>Proteus vulgaris</i>	Isolat clinique	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Environnement	1
<i>Pseudomonas putida</i>	Environnement	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	Isolat clinique	1
<i>Serratia marcescens</i>	Isolat clinique	1
<i>Shigella sonnei</i>	Isolat clinique	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 1228	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Isolat clinique	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Isolat clinique	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Isolat clinique	1
<i>Xanthomonas campestris</i>	Environnement	1

Les prélèvements d'1 ml d'eau ont été centrifugés 15 minutes à 13 000 g et les surnageants ont été éliminés. Les culots de centrifugation ont été repris dans 180 µl d'un premier tampon de lyse (tampon ATL du kit) et 20 µl de protéinase K (20 mg/ml). L'ensemble a été incubé à 56° C pendant 1h. Une seconde étape de lyse a été réalisée à 70° C pendant 10 minutes après ajout de 200 µl d'un deuxième tampon (tampon AL du kit), puis 200 µl d'éthanol ont été ajoutés à ce lysat. L'ensemble a été déposé sur une mini colonne (l'ADN se fixe sur la silice lors d'une étape de centrifugation). Après deux étapes de lavage (tampons AW1 et AW2 du kit), l'ADN a été élué avec 200 µl de tampon d'éluion (tampon AE du kit) puis dosé au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 260 nm. L'ADN extrait a été stocké à -20° C.

2.2.2. Extraction de l'ADN des bactéries n'appartenant pas au genre *Legionella* :

L'ADN des bactéries à Gram négatif non-*Legionella* a été extrait selon le même protocole que celui décrit précédemment. La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif étant plus difficile à lyser, le même kit d'extraction QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®) a été utilisé avec un protocole modifié : le culot bactérien obtenu après centrifugation a été remis en suspension dans 180 µl d'un premier tampon de lyse (lysozyme à 20 mg/ml, tris-HCl pH 8.0 20 mM, EDTA 2 mM, Triton X100 1.2 %), et incubé 30 minutes à 37° C. Une seconde étape de lyse a alors été réalisée avec 200 µl d'un deuxième tampon (tampon AL du kit) et 20 µl de protéinase K (20 mg/ml), le tout a été incubé 30 minutes à 56° C puis 15 minutes à 95° C. Le lysat obtenu a été déposé sur une mini colonne. Les étapes de lavage et d'éluion ont été réalisées comme indiqué précédemment pour *Legionella spp* et les autres bactéries à Gram négatif.

2.3. Dénombrement des *Legionella spp* dans un échantillon d'eau par la technique des Unités Formant Colonies (UFC) :

Plusieurs essais ont nécessité la préparation d'eaux artificiellement chargées en *Legionella spp* par la mise en suspension de colonies de *Legionella spp* dans de l'eau stérile.

Pour la détermination de la quantité de *Legionella spp* dans ce type d'échantillon, nous avons appliqué la technique de dénombrement des UFC, sans concentration préalable de l'échantillon.

Différentes dilutions de raison 10 de chaque échantillon d'eau (pur à 10^{-x}) ont étéensemencées en nappe sur milieu BCYE α (5 géloses par dilution).

L'incubation des milieux s'est effectuée à 37° C en aérobiose, en atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ pendant 72h. Les milieux de culture ont été ensuite observés et la numération des UFC a été réalisée à la dilution permettant l'isolement de colonies bien individualisées les une des autres.

Calcul pour obtenir la concentration bactérienne dans l'échantillon d'eau initial :

- Soit X le nombre total de colonies comptées sur les 5 géloses correspondant à la dilution de lecture 10^{-d} .
- La concentration C en *Legionella spp* dans l'échantillon d'eau était de :

$$C = 10 \times (X/5) \times (1/10^{-d}) \text{ Legionella spp/ml}$$

2.4. Détection et quantification des *Legionella spp* et de *L. pneumophila* par PCR quantitative en temps réel:

2.4.1. PCR quantitative en temps réel sur LightCycler® (ROCHE Diagnostics®) :

a) Principe :

La détection et la quantification des *Legionella spp* par biologie moléculaire a été réalisée par une technique de PCR quantitative en temps réel sur l'appareil LightCycler® (ROCHE Diagnostics®). Une méthode fluorométrique permet à ce système de détecter « en tube fermé » les produits de PCR formés en « temps réel », c'est à dire à chaque cycle d'amplification.

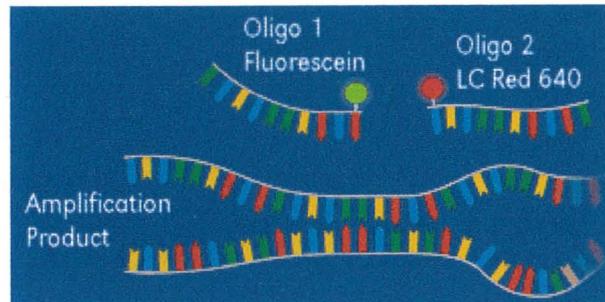
b) Système de détection en temps réel de la quantité d'ADN formée:

Nous avons choisi un système de sondes FRET (fluorescence resonance energy transfer) en tandem. Ce système utilise un couple de sondes d'hybridation portant chacune un fluorophore à une extrémité. Ces sondes ont été dessinées de façon à se positionner très proches l'une de

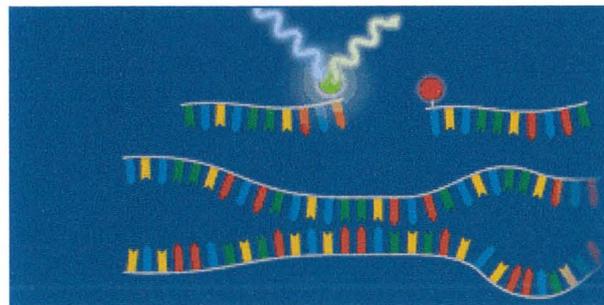
l'autre sur le fragment cible amplifié (1 à 5 bases maximum les séparent) en se présentant mutuellement leur fluorophore (figure 3C).

Figure 3 : principe des sondes FRET en tandem
(source : www.lightcycler-online.com)

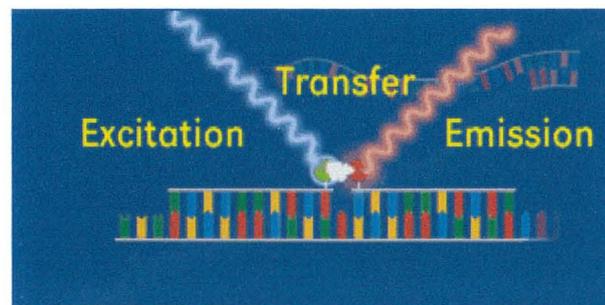
A



B



C



Lorsque les sondes sont libres dans le milieu réactionnel (phase de dénaturation et fin d'élongation), le fluorophore donneur (fluoresceine) est excité par la source lumineuse de l'appareil (son spectre d'excitation recouvre le spectre d'émission de la lampe excitatrice). Ce fluorophore restitue cette énergie par une faible fluorescence à une longueur d'onde non détectée par l'appareil. Le fluorophore accepteur (LC Red 640[®] ou LC Red 705[®]) quant à lui n'est pas excité par la source lumineuse de l'appareil et n'est pas suffisamment proche du fluorophore donneur pour être excité par la lumière que celui-ci émet (figure 3B).

Lors de l'étape d'hybridation des deux sondes sur l'ADN simple brin, les deux sondes sont très proches. Du fait de cette proximité et parce que le spectre d'émission du fluorophore donneur chevauche le spectre d'excitation du fluorophore accepteur, un transfert d'énergie (FRET) peut s'effectuer entre les deux fluorophores. L'énergie émise par le fluorophore donneur excite le fluorophore accepteur qui à son tour va émettre une fluorescence qui sera mesurable par le système de détection de l'appareil (figure 3C). A cet instant, l'intensité de fluorescence émise par le fluorophore accepteur est proportionnelle à la quantité de séquences cibles simple brin présentes dans le milieu réactionnel.

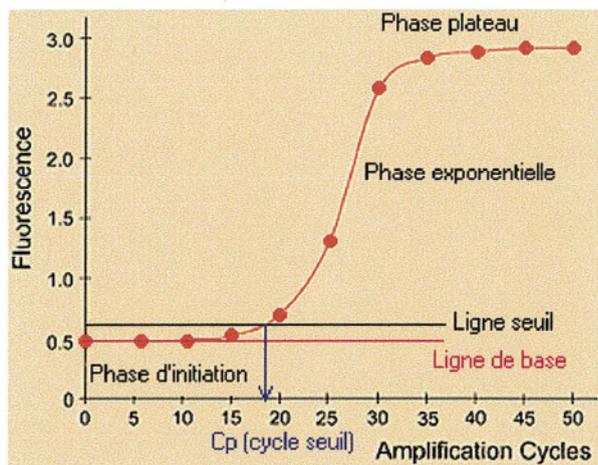
Lors de l'étape d'élongation des amorces par l'ADN polymérase, les sondes sont déplacées d'où la suppression du FRET et la perte du signal fluorescent émis par le fluorophore donneur. La mesure de fluorescence est donc réalisée à chaque cycle au début de la phase d'hybridation.

L'augmentation de la quantité d'ADN formé à chaque cycle de PCR entraîne une augmentation du nombre de couples fluorophore donneur/fluorophore accepteur fixés sur l'ADN simple brin en début d'hybridation. Cela se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée par le système de détection à chaque cycle de PCR.

Par un suivi en temps réel de l'intensité de fluorescence, il est alors possible de tracer une courbe (figure 4), de caractériser les différentes phases de la cinétique de la PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle (figure 4). C'est uniquement au cours de cette phase qu'il sera possible d'extrapoler la quantité de matrice cible initialement présente avant amplification. Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation de produits de PCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé cycle seuil optique (figure 4). Plus précisément, le cycle seuil optique est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil (ou seuil de détection optique) significativement différente du bruit de fond. Il est symbolisé Cp (Crossing point). Le cycle seuil est un point remarquable de la cinétique d'amplification car il se trouve inversement

proportionnel au logarithme du nombre N_0 de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes dans l'échantillon testé.

Figure 4 : courbe de suivi en temps réel d'une réaction PCR



La cinétique de la réaction PCR met en jeu trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. Elle est construite à partir de plusieurs points d'amplification. Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycle PCR *versus* l'intensité de fluorescence émise. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne de seuil correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil C_p qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.

c) Appareillage : le LightCycler[®] est composé de deux parties (figure 5).

- ◆ Un thermocycler à air pulsé permettant d'obtenir des vitesses de montée et de descente en température très rapides, pouvant atteindre jusqu'à 20° C par seconde.

La réaction d'amplification s'effectue dans des capillaires en borosilicate (figure 6) offrant une grande surface d'échange. Les transferts thermiques sont donc extrêmement rapides, presque instantanés. Ainsi les cycles sont très courts et la durée d'amplification peut être réduite à 20-30 minutes pour 30-40 cycles.

- ◆ Un micro-spectrofluorimètre :

La partie fluorimètre est composée d'une source lumineuse d'excitation qui est une lampe électronique LED (Light Emitting Diode) et d'un système de détection allant capter les signaux de fluorescence émise. La lampe électronique produit un faisceau lumineux très intense correspondant à un domaine étroit de longueurs d'onde (maximum d'émission à 470 nm). L'utilisation d'un jeu de miroirs semi-transparents passe-bandes permet de dévier

le signal lumineux d'émission selon trois longueurs d'onde différentes (530 nm, 640 nm, et 710 nm) qui peuvent être détectées séparément par l'intermédiaire de trois photodiodes.

Figure 5 : schéma de principe du LightCycler
(source : www.lightcycler-online.com)

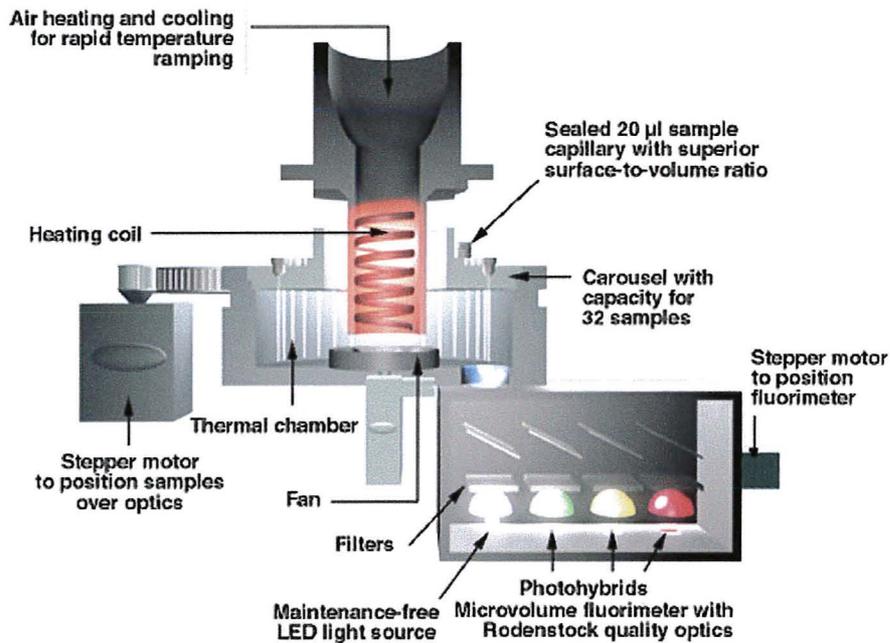
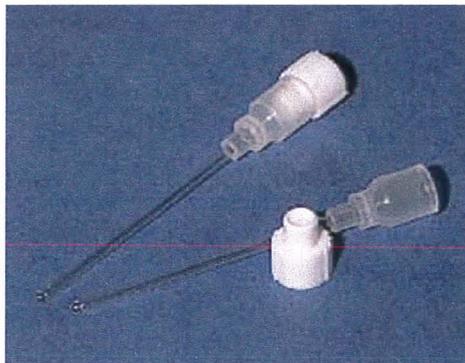


Figure 6 : capillaire en borosilicate



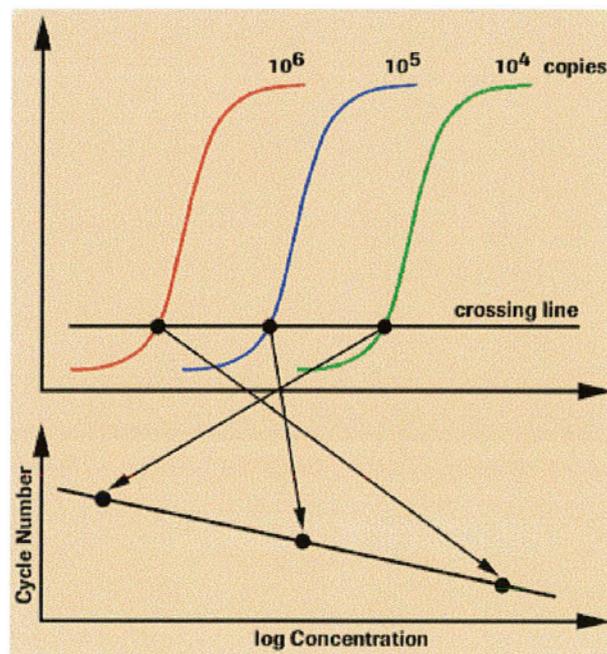
La station de travail informatique permet d'acquérir en temps réel et d'afficher « en ligne » les données mesurées, et par conséquent de suivre en direct la cinétique d'amplification. Le logiciel d'analyse fonctionnant sous un environnement Window Xp® assure le pilotage du thermocyclage, l'acquisition et l'analyse des données brutes de fluorescence ainsi que l'exploitation de ces données pour obtenir le résultat final en fonction de l'application choisie.

d) La stratégie de quantification :

La concentration en acide nucléique (nombre de copies par μl) cible a été mesurée de façon « absolue » après établissement d'une courbe d'étalonnage à partir d'un standard homologue externe.

Nous avons établi une gamme d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions sérielles d'ADN de *L. pneumophila* séroroupe 1 (ATCC 33152) titré en nombre de copies de génome bactérien. Pour chacune des dilutions, la cinétique de la réaction PCR a été suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant (C_p). La droite d'étalonnage exprimant les variations du C_p en fonction de la quantité d'acide nucléique cible contenu dans chaque point de la gamme a ensuite été tracée (figure 7). Après validation de la droite obtenue par le calcul de l'efficacité d'amplification (E doit être voisine de 2) et du coefficient de régression linéaire r qui permet de vérifier la reproductibilité du pipetage ($r^2 \geq 1$), il a alors été possible de calculer la concentration en acide nucléique d'un échantillon inconnu à parti de son C_p .

Figure 7 : réalisation d'une droite d'étalonnage



2.4.2. Amplification des *Legionella spp* et de *L. pneumophila* :

Nous avons utilisé 2 protocoles de PCR quantitative en temps réel précédemment décrits dans la littérature par Wellinghausen et coll (120), permettant respectivement d'amplifier toute espèce de *Legionella* ou spécifiquement l'espèce *L. pneumophila*.

a) Amorces :◆ PCR *Legionella spp* :

Les amorces utilisées ont été définies dans une région hautement conservée du gène de l'ARN ribosomal 16S de *L. pneumophila* sérotype 1 (ATCC 33152). Elles permettent d'amplifier une portion de 386 paires de bases.

Séquence des amorces	
Amorce sens JFP :	5'-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC
Amorce anti-sens JRP :	5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG

◆ PCR *L. pneumophila* :

Les amorces utilisées ont été définies dans une région hautement conservée du « macrophage infectivity potentiator » (mip) de *L. pneumophila* sérotype 1 (ATCC 33152). Elles permettent d'amplifier une portion de 186 paires de bases. Le « macrophage infectivity potentiator » est une protéine de surface de 24 kDa, et un facteur de virulence de *L. pneumophila* (39).

Séquence des amorces	
Amorce sens Lp-mip-PT69 :	5'-GCA TTG GTG CCG ATT TGG
Amorce anti-sens Lp-mip-PT70 :	5'-G[CT]T TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA

b) Sondes :◆ PCR *Legionella spp*:

Sonde Leg LC marquée à son extrémité 5' par le fluorophore LC Red 640[®] et par un phosphate côté 3' :

5'-LC Red 640-TAC TGA CAC TGA GGC ACG AAA GCG T-phosphate

Sonde Leg FL marquée à son extrémité 3' par de la fluorescéine :

5'-AGT GGC GAA GGC GGC TAC CT-fluorescéine

◆ PCR *L. pneumophila* :

Sonde Lpneu LC marquée à son extrémité 5' par le fluorophore LC Red 640[®] et par un phosphate côté 3' :

5'-LC Red 640-CCA TTG CTT CCG GAT TAA CAT CTA TGC C-phosphate

Sonde Lpneu FL marquée à son extrémité 3' par de la fluorescéine :

5'-CCA CTC ATA GCG TCT TGC ATG CCT TTA-fluorescéine

c) Conditions de la PCR :

Nous avons utilisé le Kit Fast Start Master Hybridization Probes Reaction Mix[®] (ROCHE Diagnostics[®]). Le mélange réactionnel contient des anticorps anti-Taq polymérase qui vont bloquer l'enzyme pendant l'étape pré-PCR, ce qui diminue la formation de produits non spécifiques. Ces anticorps sont dénaturés lors du chauffage initial à 95° C pendant 8 minutes.

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final réactionnel de 20 µl. L'analyse des résultats a été effectuée avec la version 5.32 du Logiciel LightCycler[®].

Les proportions du mélange réactionnel et les étapes de la réaction de PCR sont identiques pour la PCR *Legionella spp* et pour la PCR *L. pneumophila* et sont définies dans les tableaux IX et X.

Tableau IX : composition du mélange réactionnel

	Volume	Quantité	Concentration finale
Amorce sens	1 µl	10 picomoles	0.5 micromoles/l
Amorce anti-sens	1 µl	10 picomoles	0.5 micromoles/l
Sonde 5'-LC Red 640	2 µl	4 picomoles	0.2 micromoles/l
Sonde 3'-fluorescéine	2 µl	4 picomoles	0.2 micromoles/l
MgCl ₂	2.4 µl	80 nanomoles	4 millimoles/l
Fast Start Master Hybridization Probes Reaction Mix [®]	2 µl		
Eau stérile qualité PCR	4.6 µl		
Echantillon d'ADN	5 µL		

Tableau X : étapes de la réaction PCR

Dénaturation initiale	8 minutes	95° C
Amplification : 45 cycles		
- dénaturation	10 secondes	95° C
- annealing	10 secondes	57° C
- élongation	15 secondes	72° C
<i>NB : vitesse de transition thermique = 20° C/seconde</i>		

Pour chaque PCR, un contrôle négatif d'amplification à été testé parallèlement aux échantillons. Il s'agissait de 5 µl d'eau stérile exempte d'ADN.

L'ADN de *L. pneumophila* sérotype 1 (ATCC 33152) a constitué notre contrôle positif d'amplification.

2.5. Etude de la sensibilité et de la spécificité :

2.5.1. Données préliminaires :

Wellinghausen et coll (120) ont testé la méthode sur 14 sérotypes de *L. pneumophila*, 31 espèces de *Legionella non-pneumophila* dont une espèce de LLAP et 24 autres espèces bactériennes (tableau XII et XIII).

Les résultats suivants ont été obtenus:

Tableau XI : résultats de l'étude de sensibilité et de spécificité de Wellinghausen et coll (120)

PCR *Legionella spp* (ARNr 16S)

Positive pour : 14/14 sérotypes de *Legionella pneumophila*
31/31 souches de *Legionella non-pneumophila*

Négative pour : 24/24 souches bactériennes n'appartenant pas au genre *Legionella*

PCR *Legionella pneumophila* (mip)

Positive pour : 14/14 sérotypes de *Legionella pneumophila*

Négative pour : 31/31 souches de *Legionella non-pneumophila*
24/24 souches bactériennes n'appartenant pas au genre *Legionella*

Tableau XII : souches de *Legionella spp* testées par Wellinghausen et coll (120)

Espèce et sérotype	Souche de référence
<i>Legionella pneumophila</i>	
1 (Philadelphia)	ATCC 33152
2 (Togus 1)	ATCC 33154
3 (Bloomington 2)	ATCC 33155
4 (Los Angeles 1)	ATCC 33156
5	ATCC 33216
6 (Chicago 2)	ATCC 33215
7 (Chicago 8)	ATCC 33823
8	ATCC35096
9	ATCC 35289
10	ATCC 43283
11	ATCC 43130
12	ATCC 43290
13	ATCC 43736
14	ATCC 43703
<i>Legionella adelaidensis</i>	ATCC 49625
<i>Legionella anisa</i>	ATCC 35292
<i>Legionella birminghamensis</i>	ATCC 43702
<i>Legionella bozemanii</i>	ATCC 33217
<i>Legionella brunensis</i>	ATCC 43878
<i>Legionella cherii</i>	ATCC 35252
<i>Legionella cincinnatiensis</i>	ATCC 43753
<i>Legionella dumoffii</i>	ATCC 33279
<i>Legionella erythra</i>	ATCC 35303
<i>Legionella feelei</i>	ATCC 35849
<i>Legionella gormanii</i>	ATCC 33297
<i>Legionella gratiana</i>	ATCC 49413
<i>Legionella hackeliae</i>	ATCC 35250
<i>Legionella israelensis</i>	ATCC 43119
<i>Legionella jamestownensis</i>	ATCC 35298
<i>Legionella jordanis</i>	ATCC 33623
<i>Legionella lansingensis</i>	ATCC 49751
<i>Legionella longbeachae</i>	ATCC 33462
<i>Legionella maceachernii</i>	ATCC 35300
<i>Legionella micdadei</i>	ATCC 33218
<i>Legionella moravica</i>	ATCC 43877
<i>Legionella oakridgensis</i>	ATCC 33761
<i>Legionella parisiensis</i>	ATCC 35299
<i>Legionella quinlivanii</i>	ATCC 43830
<i>Legionella rubrilucens</i>	ATCC 35304
<i>Legionella sainthelensis</i>	ATCC 35248
<i>Legionella spiritensis</i>	ATCC 35249
<i>Legionella steigerwaltii</i>	ATCC 35302
<i>Legionella tucsonensis</i>	ATCC 49180
<i>Legionella wadsworthii</i>	ATCC 33877
LLAP 10	

Tableau XIII: souches bactériennes testées par Wellinghausen et coll (120)

Espèce	origine
<i>Acinetobacter junii</i>	ATCC 17908
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC 15309
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Citrobacter koseri</i>	ATCC 27028
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 43863
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 29905
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13637
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Isolat clinique
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Isolat clinique
<i>Chryseomonas luteola</i>	Isolat clinique
<i>Enterobacter cloacae</i>	Isolat clinique
<i>Escherichia coli</i>	Isolat clinique
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Isolat clinique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Isolat clinique
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Isolat clinique
<i>Pseudomonas putida</i>	Isolat clinique
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Isolat clinique
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Isolat clinique
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolat clinique
<i>Enterococcus faecium</i>	Isolat clinique

2.5.2. Etude de sensibilité et de spécificité :

Nous avons testé la sensibilité de nos deux protocoles de PCR en temps réel sur 31 souches de *Legionella spp* (dont 27 souches de *L. pneumophila*) et leur spécificité sur 35 espèces bactériennes non-*Legionella* (Tableau VIII).

La quantité d'ADN utilisée pour ces essais variait de 10 pg à 100 pg.

3. Résultats :

3.1. Limite de détection et « seuil de positivité» :

Afin de déterminer la limite de détection des techniques de PCR, nous avons réalisé une suspension de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) à partir de colonies prélevées après 72 h de culture. Cette suspension a été titrée selon la méthode des UFC précédemment décrite. L'ADN de *L. pneumophila* a ensuite été extrait à partir de cette suspension bactérienne. Les résultats des UFC nous ont permis d'extrapoler une quantité théorique de copies de génome bactérien dans la solution d'ADN extrait soit :

2.7×10^7 équivalents de copies/ μ l.

Il est important de noter que ce nombre de copies est une estimation. En effet, sur l'ensemble des *L. pneumophila* présentes dans l'échantillon, une faible proportion n'est pas viable et n'est pas détectée par les UFC. Nous utiliserons la notion d'équivalents de copies de génome bactérien pour l'ensemble des résultats de quantification.

Nous avons ensuite réalisé des dilutions successives au 1/10 dans de l'eau stérile de cet ADN extrait jusqu'à la dilution 10^{-10} .

Les dilutions 10^{-6} à 10^{-10} ont alors été testées en PCR *Legionella spp* et en PCR *L. pneumophila*. Chaque dilution a été testée dix fois dans la même manipulation.

Les résultats observés ont été les suivants:

Tableau XIV: limites de détection des PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila*

Dilution	Nombre d'équivalents de copies de génome de <i>L. pneumophila</i> dans la prise d'essai de 5 μ l	Résultats de l'amplification (nombre d'amplifications positives sur les 10 essais)	
		PCR <i>Legionella spp</i> (ARNr 16S)	PCR <i>L. pneumophila</i> (mip)
10^{-6}	132	+ (10/10)	+ (10/10)
10^{-7}	13.2	+ (10/10)	+ (10/10)
10^{-8}	1.32	+ (10/10)	+ (5/10)
10^{-9}	0.132	+ (4/10)	-
10^{-10}	0.0132	-	-

Ces résultats ont été reproduits dans 5 expériences différentes.

Sur le plan statistique (distribution de Poisson), lorsque le nombre de copies du gène à amplifier est proche de 1, la probabilité d'obtenir une amplification est inférieure à 100 %. C'est ce phénomène qui a été observé avec la PCR *Legionella spp* pour l'échantillon à la dilution 10^{-9} et avec la PCR *L. pneumophila* pour l'échantillon à la dilution 10^{-8} .

3.1.1. Limite de détection :

a) PCR *L. pneumophila* :

⇒ **1 équivalent de copie de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai.**

b) PCR *Legionella spp* :

⇒ **0.1 équivalent de copie de génome de *Legionella spp* / 5 µl de prise d'essai.**

Ce résultat, inférieur à 1, est expliqué par le fait que le gène de l'ARN ribosomal 16S est exprimé de multiples fois (le nombre exact n'est pas connu) dans le génome des *Legionella spp*. Par conséquent 0.1 équivalent de copie de génome de *Legionella spp* correspond en fait à plus d'une copie d'ADN cible à amplifier.

3.1.2. Seuil de positivité :

Si un échantillon est testé par PCR et que l'on n'observe pas d'amplification, deux cas sont possibles :

- soit il n'y a pas d'ADN cible dans l'échantillon,
- soit l'échantillon contient une quantité d'ADN cible inférieure à la quantité pour laquelle la PCR est positive dans 100 % des essais.

Cette incertitude statistique, introduit la notion de «seuil de positivité». Ce seuil de positivité correspond au plus petit nombre de copies de génome bactérien pour lequel la PCR est positive dans 100 % des essais. Lorsque qu'un échantillon est retrouvé négatif par PCR, on ne peut pas affirmer qu'il ne contient pas d'ADN cible, on peut seulement affirmer qu'il contient une quantité d'ADN cible inférieure au seuil de positivité.

a) Seuil de positivité de la PCR *L. pneumophila* :

⇒ **10 équivalents de copies de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai.**

b) Seuil de positivité de la PCR *Legionella spp* :

⇒ 1 équivalent de copie de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai.

3.2. Reproductibilité :

Nous avons choisi le cycle seuil d'émission de fluorescence (Crossing point = Cp) comme paramètre pour étudier la reproductibilité des PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila*.

3.2.1. Reproductibilité intra-essai :

La reproductibilité intra-essai a été évaluée sur plusieurs dilutions de la solution d'ADN de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) titrée à 2.76×10^7 équivalents de copies de génome bactérien/µl : la dilution 10^{-1} qui représentait les fortes concentrations en ADN cible, une dilution intermédiaire basse à 10^{-6} et les dilutions 10^{-7} , $10^{-7.3}$, $10^{-7.5}$, $10^{-7.7}$ qui représentaient les très faibles concentrations en ADN cible. La dilution 10^{-8} n'a été testée que pour la PCR *Legionella spp* car à ce niveau de concentration en ADN cible, la PCR *L. pneumophila* n'était pas reproductible puisque l'amplification n'était plus détectée dans 100 % des essais.

Chaque dilution d'ADN cible a été testée 10 fois dans une même PCR.

a) Résultats de reproductibilité intra-essai pour la PCR *Legionella spp* :

Tableau XV : reproductibilité intra-essai de la PCR *Legionella spp*

	Crossing point (Cp) en fonction de la Dilution / équivalents de copies de génome de <i>L. pneumophila</i> pour 5 µl de prise d'essai						
	10^{-1} 1.32×10^7	10^{-6} 132	10^{-7} 13.2	$10^{-7.3}$ 6.6	$10^{-7.5}$ 4.4	$10^{-7.7}$ 2.64	10^{-8} 1.32
Test 1	13.03	30.18	34.31	35.76	37.02	36.56	38.00
Test 2	13.12	30.27	34.26	35.63	35.94	36.48	38.07
Test 3	13.16	30.48	34.27	35.61	36.08	35.78	35.77
Test 4	13.28	30.29	34.33	35.69	35.74	37.06	36.53
Test 5	13.07	30.28	34.20	35.45	35.95	36.76	36.77
Test 6	13.21	30.19	34.06	36.14	36.02	35.60	36.83
Test 7	13.26	30.10	34.01	36.08	36.38	36.96	37.06
Test 8	13.03	30.33	33.79	35.37	35.91	37	36.41
Test 9	13.20	30.30	34.35	34.99	36.33	37.16	36.67
Test 10	13.09	30.29	33.95	35.56	35.96	36.59	39.16
Moyenne	13.145	30.271	34.153	35.628	36.13	36.595	37.127
Ecart-type	0.091	0.102	0.190	0.333	0.368	0.530	0.996
Variance	0.0083	0.0103	0.0360	0.111	0.135	0.281	0.992

b) Résultats de reproductibilité intra-essai pour la PCR *L. pneumophila* :

Tableau XVI : reproductibilité intra-essai de la PCR *L. pneumophila*

	Crossing point (Cp) en fonction de la Dilution / équivalents de copies de génome de <i>L. pneumophila</i> / 5 µl de prise d'essai					
	10^{-1} 1.32×10 ⁷	10^{-6} 132	10^{-7} 13.2	$10^{-7.3}$ 6.6	$10^{-7.5}$ 4.4	$10^{-7.7}$ 2.64
Test 1	14.27	31.70	35.56	36.52	37.17	37.72
Test 2	14.18	31.53	35.65	36.97	37.66	40.20
Test 3	14.15	31.43	35.83	36.41	36.99	40.44
Test 4	14.46	31.61	35.73	36.71	36.99	38.95
Test 5	14.48	31.72	35.62	36.52	37.33	37.95
Test 6	14.18	31.43	35.55	37.10	36.86	38.16
Test 7	14.30	31.52	35.16	36.78	37.58	37.92
Test 8	14.52	31.51	35.23	36.68	37.81	38.76
Test 9	14.17	31.50	35.94	36.38	37.59	39.05
Test 10	14.25	31.44	35.58	37.01	36.98	38.47
Moyenne	14.296	31.539	35.585	36.708	37.296	38.762
Ecart-type	0.141	0.105	0.240	0.255	0.343	0.937
Variance	0.020	0.011	0.058	0.065	0.118	0.878

Ces résultats de reproductibilité, nous ont permis de corriger le seuil de positivité pour La PCR *L. pneumophila* à 2.64 équivalents de copies de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai.

3.2.2. Reproductibilité inter-essai :

La reproductibilité inter-essai a été évaluée sur 5 dilutions de la solution d'ADN de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) titrée à 2.76×10^7 équivalents de copies de génome bactérien/µl : 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} .

Chacune de ces dilutions a été testée dans 10 PCR différentes.

a) Résultats de reproductibilité inter-essai pour la PCR *Legionella spp* :Tableau XVII : reproductibilité inter-essai de la PCR *Legionella spp*

	Crossing point (Cp) en fonction de la Dilution / équivalents de copies de génome de <i>L. pneumophila</i> / 5 µl de prise d'essai				
	10 ⁻¹ 1.32×10 ⁷	10 ⁻³ 1.32×10 ⁵	10 ⁻⁵ 1.32×10 ³	10 ⁻⁶ 132	10 ⁻⁷ 13.2
Test 1	13.24	20.35	27.51	30.91	34.14
Test 2	13.14	20.25	27.31	30.92	34.35
Test 3	13.20	20.17	27.33	30.76	34.70
Test 4	13.28	20.15	27.21	30.77	34.59
Test 5	13.16	20.26	27.49	30.99	34.24
Test 6	13.25	20.39	27.52	31.00	34.64
Test 7	13.22	20.29	27.40	31.01	34.74
Test 8	13.20	20.35	27.59	31.06	34.04
Test 9	13.56	20.68	27.82	31.31	34.98
Test 10	13.25	20.39	27.66	30.98	35.20
Moyenne	13.25	20.328	27.484	30.971	34.562
Ecart-type	0.117	0.150	0.181	0.155	0.371
Variance	0.014	0.022	0.033	0.024	0.138

b) Résultats de reproductibilité inter-essai pour la PCR *L. pneumophila* :Tableau XVIII : reproductibilité inter-essai de la PCR *L. pneumophila*

	Crossing point (Cp) en fonction de la Dilution / équivalents de copies d'ADN de <i>L. pneumophila</i> par prise d'essai de 5 µl				
	10 ⁻¹ 1.32×10 ⁷	10 ⁻³ 1.32×10 ⁵	10 ⁻⁵ 1.32×10 ³	10 ⁻⁶ 132	10 ⁻⁷ 13.2
Test 1	14.62	21.74	28.90	32.34	36.40
Test 2	14.24	21.35	28.60	31.99	35.65
Test 3	13.90	21.13	28.14	31.57	35.72
Test 4	14.14	21.32	28.57	32.19	35.16
Test 5	14.49	21.60	28.65	32.08	34.47
Test 6	14.45	21.61	28.68	32.48	36.74
Test 7	14.28	21.58	28.68	32.20	35.34
Test 8	14.46	21.59	28.64	32.44	35.89
Test 9	14.47	21.56	28.84	32.31	35.97
Test 10	14.44	21.57	28.74	32.56	35.06
Moyenne	14.349	21.505	28.644	32.216	35.407
Ecart-type	0.211	0.181	0.205	0.289	0.453
Variance	0.045	0.033	0.042	0.083	0.205

3.2.3. Calculs pouvant être déduits des études de reproductibilité :

a) Variabilité possible entre des résultats de quantification obtenus par PCR *Legionella spp* et ceux obtenus par PCR *L. pneumophila*, pour un même échantillon ne contenant que de l'ADN de *L. pneumophila* :

Lorsque l'on mesure une même quantité d'ADN à la fois par PCR quantitative *Legionella spp* et par PCR quantitative *L. pneumophila*, les résultats ne sont jamais strictement identiques. Cette différence est principalement due au fait que pour chaque type de PCR, il existe une variabilité d'une mesure à une autre pour une même quantité d'ADN initiale.

La variabilité de chaque technique peut être calculée à partir des résultats des études de reproductibilité intra-essai.

La variabilité entre un résultat obtenu par PCR *Legionella spp* et celui obtenu par PCR *L. pneumophila*, pour une même quantité d'ADN, correspond à la combinaison des variabilités de chacune des PCR.

Le calcul de cette variabilité maximale permet de déterminer si une différence de mesure entre les deux techniques de PCR est significative. En effet, pour un échantillon inconnu si la différence entre la quantification par PCR *Legionella spp* et la quantification par PCR *L. pneumophila* excède cette variabilité maximale, alors cette différence est considérée comme significative et devra être expliquée.

La situation la plus souvent rencontrée est une quantification significativement plus élevée par PCR *Legionella spp* que par PCR *L. pneumophila*. Cela correspond à l'association de *L. pneumophila* avec une ou plusieurs espèces de *Legionella non-pneumophila* dans l'échantillon analysé.

◆ Variabilité analytique de la PCR *Legionella spp* :

Lorsque la quantité d'ADN cible initiale est de 2 à 10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai, alors pour une même quantité d'ADN cible initiale les résultats peuvent varier au maximum sur deux mesures différentes d'un facteur 0.3 à 3.7.

Lorsque la quantité d'ADN cible initiale est supérieure à 10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai, alors pour une même quantité d'ADN cible initiale les résultats peuvent varier au maximum sur deux mesures différentes d'un facteur 0.6 à 1.6.

◆ Variabilité analytique de la PCR *L. pneumophila* :

Lorsque la quantité d'ADN cible initiale est de 2 à 10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai, alors pour une même quantité d'ADN cible initiale les résultats peuvent varier au maximum sur deux mesures différentes d'un facteur 0.4 à 2.3.

Lorsque la quantité d'ADN cible initiale est supérieure à 10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai, alors pour une même quantité d'ADN cible initiale les résultats peuvent varier au maximum sur deux mesures différentes d'un facteur 0.55 à 1.8.

◆ Variabilité analytique entre la PCR *Legionella spp* et la PCR *L. pneumophila*, pour un même échantillon ne contenant que de l'ADN de *L. pneumophila* :

Tableau XIX : facteurs maximums pouvant relier les résultats de la PCR *Legionella spp* et ceux de la PCR *L. pneumophila*, pour la mesure d'une même quantité d'ADN de *L. pneumophila*

Quantité d'ADN cible initiale mesurée par PCR <i>L. spp</i> Quantité d'ADN cible initiale mesurée par PCR <i>L. pneumophila</i>	2-10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai soit 400-2000 copies de génome bactérien/l d'eau filtrée	>10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai soit >2000 copies de génome bactérien/l d'eau filtrée
2-10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai soit 400-2000 copies de génome bactérien/l d'eau filtrée	Facteurs maximums pouvant relier les deux mesures : $0.3 \times 0.4 = 0.12$ à $2.3 \times 3.7 = 8.51$	Facteurs maximums pouvant relier les deux mesures : $0.4 \times 0.6 = 0.24$ à $1.6 \times 2.3 = 3.68$
>10 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai soit >2000 copies de génome bactérien/l d'eau filtrée	Facteurs maximums pouvant relier les deux mesures : $0.3 \times 0.55 = 0.165$ à $1.8 \times 3.7 = 6.7$	Facteurs maximums pouvant relier les deux mesures : $0.4 \times 0.55 = 0.33$ à $1.6 \times 1.8 = 2.88$

3.3. Droite d'étalonnage avec un standard externe :

Nous avons choisi d'établir une droite d'étalonnage à partir de 5 dilutions de la suspension d'ADN de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) titrée à 2.76×10^7 équivalents de copies de génome/µl : 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} .

La droite d'étalonnage a alors été obtenue par régression linéaire du Cp en fonction du logarithme de la concentration de chaque standard, en utilisant la méthode de la dérivée seconde du logiciel LightCycler®.

3.3.1. Résultats :

Les cinétiques d'amplification de chaque point de gamme ainsi que les droites d'étalonnage correspondantes sont représentées figure 8 (PCR *Legionella spp*) et figure 9 (PCR *L. pneumophila*).

3.3.2. Validation des droites d'étalonnage :

a) Coefficient de régression linéaire(r) :

Le coefficient de régression linéaire nous a permis de vérifier la reproductibilité du pipetage et des dilutions. Pour valider une droite d'étalonnage, r^2 devait être supérieur ou égal à 0.99.

$$\Rightarrow \text{PCR } Legionella \text{ spp} : r^2 = 1$$

$$\Rightarrow \text{PCR } L. \text{ pneumophila} : r^2 = 1$$

b) Efficacité de l'amplification (E) et rendement de la PCR (R) :

Lorsque le rendement de la PCR est de 100 %, l'efficacité d'amplification est de $\text{Log } 100 = 2$. Pour valider les droites d'étalonnage nous devons avoir une efficacité d'amplification la plus proche possible de 2.

Calcul de l'efficacité d'amplification (E): $E = 10^{(-1/\text{pente})}$

$$\Rightarrow \text{PCR } Legionella \text{ spp} : E = 10^{(-1/-3.541)} = 1.92$$

$$\Rightarrow \text{PCR } L. \text{ pneumophila} : E = 10^{(-1/-3.565)} = 1.91$$

Calcul du rendement de la PCR (R) : $R = E/2$

$$\Rightarrow \text{PCR } Legionella \text{ spp} : R = 0.955 = 96 \%$$

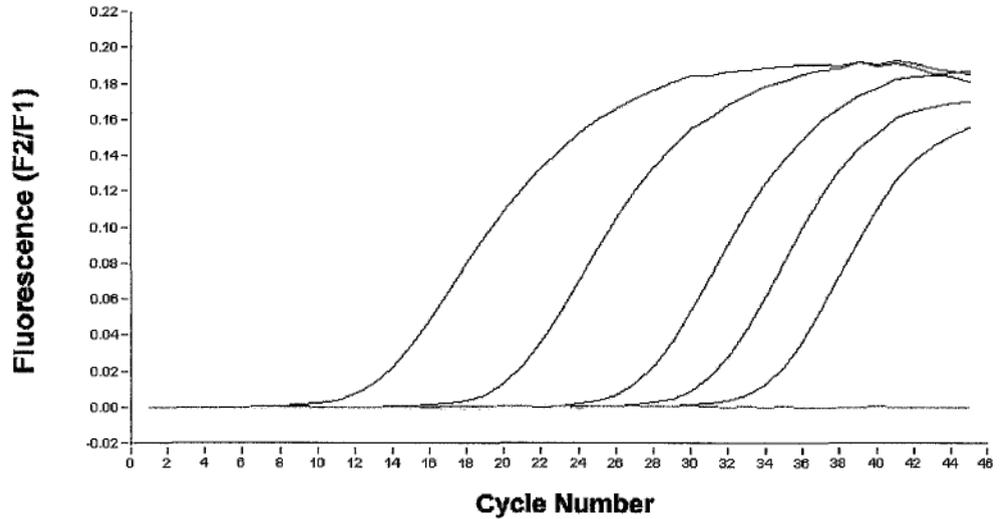
$$\Rightarrow \text{PCR } L. \text{ pneumophila} : R = 0.95 = 95.5 \%$$

Figure 8 : droite d'étalonnage de la PCR quantitative *Legionella spp*

File: C:\LightCycler3\Users\Administrateur\Data\Bactério\Pierre-Alain\Eaux 16-06-03 16S.ABT Program: pcr Run By: Administrateur
Run Date: Jun 16, 2003 05:28 Print Date: October 06, 2003

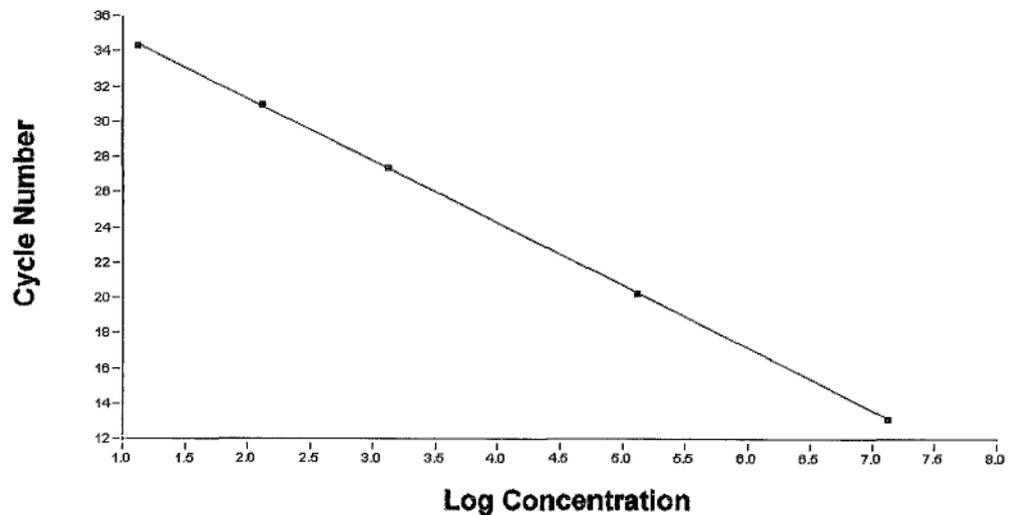
1 Blanc 16S
2 ADN Lp1 10-1 16S
3 ADN Lp1 10-3 16S
4 ADN Lp1 10-5 16S
5 ADN Lp1 10-6 16S
6 ADN Lp1 10-7 16S

Baseline Adjustment:
Proportional
Color Compensation: Off
Noise Band Cursor: N/A
Analysis Method: Second
Derivative Maximum



File: C:\LightCycler3\Users\Administrateur\Data\Bactério\Pierre-Alain\Eaux 16-06-03 16S.ABT Program: pcr Run By: Administrateur
Run Date: Jun 16, 2003 05:28 Print Date: October 06, 2003

Crossing Points
Linear Regression



Baseline Adjustment:
Proportional

Noise Band Cursor: N/A

Analysis Method: Second
Derivative Maximum

Slope: -3.541

Intercept: 39.37

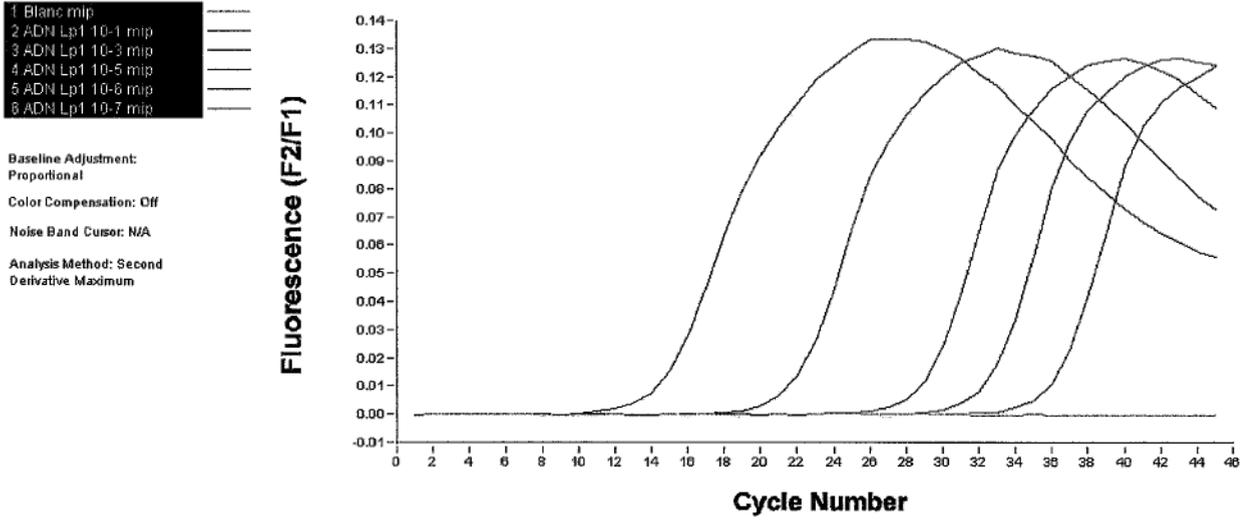
Error: 0.0163

Color Compensation: Off

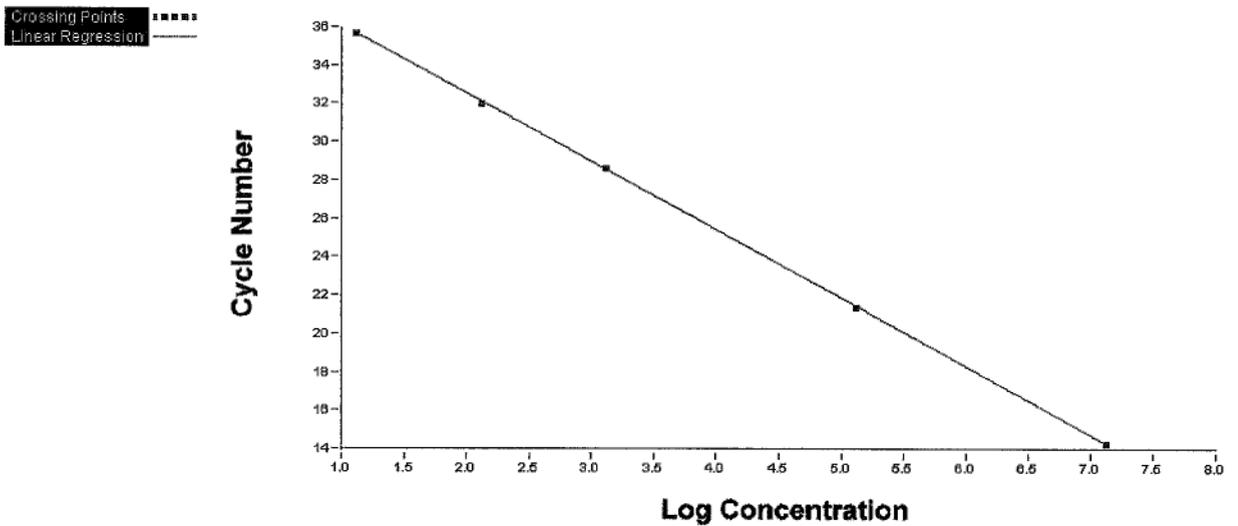
r: -1.00

Figure 9 : droite d'étalonnage de la PCR quantitative *L. pneumophila*

File: C:\LightCycler3\Users\Administrateur\Data\Bactérie\Pierre-Alain\Eaux 16-06-03 mip.ABT Program: por Run By: Administrateur
 Run Date: Jun 16, 2003 08:37 Print Date: October 06, 2003



File: C:\LightCycler3\Users\Administrateur\Data\Bactérie\Pierre-Alain\Eaux 16-06-03 mip.ABT Program: por Run By: Administrateur
 Run Date: Jun 16, 2003 08:37 Print Date: October 06, 2003



Baseline Adjustment: Proportional	Noise Band Cursor: N/A	Analysis Method: Second Derivative Maximum
	Slope: -3.685	Intercept: 39.63
		Error: 0.0260
Color Compensation: Off	r: -1.00	

3.3.3 Reproductibilité des droites d'étalonnage :

Ces résultats nous ont donc permis de valider les deux droites d'étalonnage. Nous avons alors vérifié leur reproductibilité sur 10 PCR différentes.

a) PCR *Legionella spp* :

Tableau XX : reproductibilité des paramètres de la droite d'étalonnage pour la PCR *Legionella spp*

PCR	Intercept*	Pente	Efficacité d'amplification (E)	Rendement PCR (R)	r	r ²
1	38.25	-3.500	1.931	96.6 %	-1	1
2	38.37	-3.541	1.916	95.8 %	-1	1
3	38.50	-3.566	1.907	95.4 %	-1	1
4	38.37	-3.539	1.917	95.9 %	-1	1
5	38.38	-3.535	1.918	95.9 %	-1	1
6	38.60	-3.559	1.910	95.5 %	-1	1
7	38.65	-3.579	1.903	95.2 %	-1	1
8	38.30	-3.509	1.927	96.4 %	-1	1
9	38.93	-3.564	1.908	95.4 %	-1	1
10	38.98	-3.625	1.887	94.4 %	-1	1
<i>Moyenne</i>	<i>38.533</i>	<i>-3.5517</i>	<i>1.9124</i>	<i>95.6 %</i>		
<i>Ecart type</i>	<i>0.256</i>	<i>0.036</i>	<i>0.013</i>	<i>0.626</i>		
<i>Variance</i>	<i>0.065</i>	<i>0.0013</i>	<i>0.000157</i>	<i>0.392</i>		

*Intercept = point d'intersection de la droite d'étalonnage avec l'axe des ordonnées

b) PCR *L. pneumophila* :

Tableau XXI : reproductibilité des paramètres de la droite d'étalonnage pour la PCR *L. pneumophila*

PCR	Intercept*	Pente	Efficacité d'amplification (E)	Rendement PCR (R)	r	r ²
1	40.21	-3.603	1.895	94.7 %	-1	1
2	39.63	-3.565	1.908	95.4 %	-1	1
3	39.47	-3.596	1.897	94.9 %	-1	1
4	39.45	-3.541	1.916	95.8 %	-1	1
5	38.87	-3.390	1.972	98.6 %	-1	1
6	39.53	-3.506	1.928	96.4 %	-1	1
7	39.54	-3.528	1.921	96.0 %	-1	1
8	39.92	-3.578	1.903	95.2 %	-1	1
9	39.97	-3.584	1.901	95.1 %	-1	1
10	39.50	-3.500	1.931	96.5 %	-1	1
<i>Moyenne</i>	<i>39.609</i>	<i>-3.5391</i>	<i>1.9172</i>	<i>95.9 %</i>		
<i>Ecart type</i>	<i>0.365</i>	<i>0.064</i>	<i>0.023</i>	<i>1.158</i>		
<i>Variance</i>	<i>0.134</i>	<i>0.0041</i>	<i>0.00053</i>	<i>1.327</i>		

Nous avons donc observé une bonne reproductibilité inter-essai pour les droites d'étalonnage :

⇒ PCR <i>Legionella spp</i> :	Variance de la pente =	0.0013
	Variance de l'intercept =	0.065
⇒ PCR <i>L. pneumophila</i> :	Variance de la pente =	0.0041
	Variance de l'intercept =	0.134

Nous avons donc établi que pour chaque PCR quantitative, une droite d'étalonnage serait réalisée de la manière suivante : à partir d'une suspension titrée d'ADN de *L. pneumophila* séro-groupe 1 (ATCC 33152), 5 dilutions seraient réalisées (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) et seraient utilisées comme points de gamme. Ces dilutions seraient conservées au maximum 12h00, pour la réalisation éventuelle d'autres PCR dans la journée. La droite d'étalonnage serait validée si :

- $r^2 \geq 0.99$
- $E = 1.9124 \pm 2.576 \times 0.013 = 1.9124 \pm 0.0335$ pour la PCR *Legionella spp* (indice de confiance à 99 %)
 $E = 1.9172 \pm 2.576 \times 0.023 = 1.9172 \pm 0.06$ pour la PCR *L. pneumophila* (indice de confiance à 99 %)
- Intercept = $38.533 \pm 2.576 \times 0.256 = 38.533 \pm 0.66$ pour la PCR *Legionella spp* (indice de confiance à 99 %)
 Intercept = $39.609 \pm 2.576 \times 0.365 = 39.609 \pm 0.94$ pour la PCR *L. pneumophila* (indice de confiance à 99 %)

Ensuite pour chaque échantillon inconnu, en fonction de son C_p le logiciel du LightCycler® calculerait à partir de la droite de d'étalonnage sa concentration initiale en ADN cible.

3.4. Spécificité et sensibilité:

3.4.1. PCR *Legionella spp* :

Tableau XXII : résultats de l'étude de spécificité et de sensibilité pour la PCR *Legionella spp*

PCR *Legionella spp* (ARNr 16S)

Positive pour : 27/27 souches de *Legionella pneumophila*
 4/4 souches de *Legionella non-pneumophila*

Négative pour : 35/35 souches bactériennes n'appartenant pas au genre *Legionella*

La PCR était positive pour l'ensemble des 31 souches de *Legionella spp* avec un Cp compris entre 23.3 et 27.

En théorie, si le rendement de la PCR est de 100 %, 1 logarithme de différence de concentration en ADN est représenté par un écart de Cp de 3.3 cycles. Dans notre essai, les concentrations des *Legionella spp* testées variaient en fonction des souches, avec un écart maximal d'un logarithme. Le plus grand écart observé entre les Cp était de 3.7. Nous avons donc pu estimer que les 31 souches de *Legionella spp* étaient positives en PCR avec un rendement très proche.

3.4.2. PCR *L. pneumophila* :

Tableau XXIII : résultats de l'étude de spécificité et de sensibilité pour la PCR *L. pneumophila*

PCR *Legionella pneumophila* (mip)

Positive pour	:	27/27 souches de <i>Legionella pneumophila</i>
Négative pour	:	4/4 souches de <i>Legionella non-pneumophila</i> 35/35 souches bactériennes n'appartenant pas au genre <i>Legionella</i>

NB : parmi les souches de Legionella non-pneumophila que nous avons testées, on notera Legionella taurinensis qui est une espèce de découverte récente (24), non testée par Wellinghausen et coll.

Les Cp observés pour les 27 souches de *L. pneumophila* variaient de 24.9 à 28.5. Nous avons donc pu conclure que ces souches étaient positives en PCR avec un rendement très proche.

D'après les données de Wellinghausen et coll (120) et nos propres données nous avons pu constater que la sensibilité et la spécificité des PCR basées sur l'amplification de l'ARN ribosomal 16S et du gène mip étaient de 100 % pour la détection de *Legionella spp* et de *L. pneumophila* respectivement.

B.

Test de détection et de titrage différentiel *Legionella pneumophila*/*Legionella anisa*, par PCR en temps réel

1. Objectif :

Evaluer la capacité des deux protocoles de PCR de quantifier séparément *L. pneumophila* des autres espèces de *Legionella* dans un mélange.

2. Méthode :

Deux suspensions bactériennes ont été réalisées et titrées selon la technique des UFC :

⇒ Suspension de *L. pneumophila* sérotype 1 (ATCC 33152) : 4.4×10^7 UFC/ml

⇒ Suspension de *L. anisa* (ATCC 35292) : 4×10^7 UFC/ml

Ces deux suspensions ont été mélangées en proportions variables comme indiqué dans le tableau XXIV :

Tableau XXIV : mélanges de *L. pneumophila* et *L. anisa*

Mélange n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume de suspension <i>L. pneumophila</i> 1 (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Volume de suspension <i>L. anisa</i> (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1

L'ADN de chaque mélange a alors été extrait et quantifié par PCR *Legionella spp* et PCR *L. pneumophila*.

Les quantités théoriques de *Legionella* dans chaque mélange ont été calculées à partir des titrages réalisés sur les suspensions initiales par la méthode des UFC. Nous en avons déduit le pourcentage de *L. pneumophila* 1 (*Lp1*) dans chaque mélange.

Les quantités de *L. pneumophila* 1 et de *Legionella* totales (*L. pneumophila* + *L. anisa*) ont ensuite été mesurées par PCR quantitative réalisées directement sur chaque mélange. A partir de ces résultats, nous avons aussi calculé le pourcentage de *L. pneumophila* 1 (*Lp1*) dans chaque mélange.

3. Résultats :

Tableau XXV : résultats de l'expérience n°1 : calcul de proportions

M E L A N G E	Quantité de <i>Legionella</i> (UFC)		Quantité de <i>Legionella</i> (PCR quantitative LightCycler®)		% <i>Lp1</i> (UFC)	% <i>Lp1</i> (PCR quantitative LightCycler®)
	<i>Lp1</i>	<i>L. anisa</i>	<i>Lp1</i> (mip)	<i>Lp1</i> + <i>L. anisa</i> (16S)		
1	4.4×10 ⁷	0	7.44×10 ⁷	7.48×10 ⁷	100 %	99.5 %
2	3.96×10 ⁷	4×10 ⁶	6.64×10 ⁷	7.23×10 ⁷	90.8 %	91.8 %
3	3.52×10 ⁷	8×10 ⁶	5.28×10 ⁷	6.33×10 ⁷	81.5 %	83.4 %
4	3.08×10 ⁷	1.2×10 ⁷	4.41×10 ⁷	5.71×10 ⁷	72 %	77 %
5	2.64×10 ⁷	1.6×10 ⁷	3.88×10 ⁷	5.58×10 ⁷	62.3 %	69.5 %
6	2.2×10 ⁷	2×10 ⁷	2.83×10 ⁷	4.81×10 ⁷	52.4 %	58.8 %
7	1.76×10 ⁷	2.4×10 ⁷	2.4710 ⁷	5.02×10 ⁷	42.3 %	49.2 %
8	1.32×10 ⁷	2.8×10 ⁷	1.92×10 ⁷	5×10 ⁷	32 %	38.4 %
9	8.8×10 ⁶	3.2×10 ⁷	1.35×10 ⁷	4.88×10 ⁷	21.6 %	27.66 %
10	4.4×10 ⁶	3.6×10 ⁷	6.43×10 ⁶	4.41×10 ⁷	10.9 %	14.6 %
11	0	4×10 ⁷	0	3.92×10 ⁷	0	0 %

Résultats exprimés en bactéries/ml

Nous avons observé une bonne corrélation entre la quantification par PCR et la quantification par les UFC.

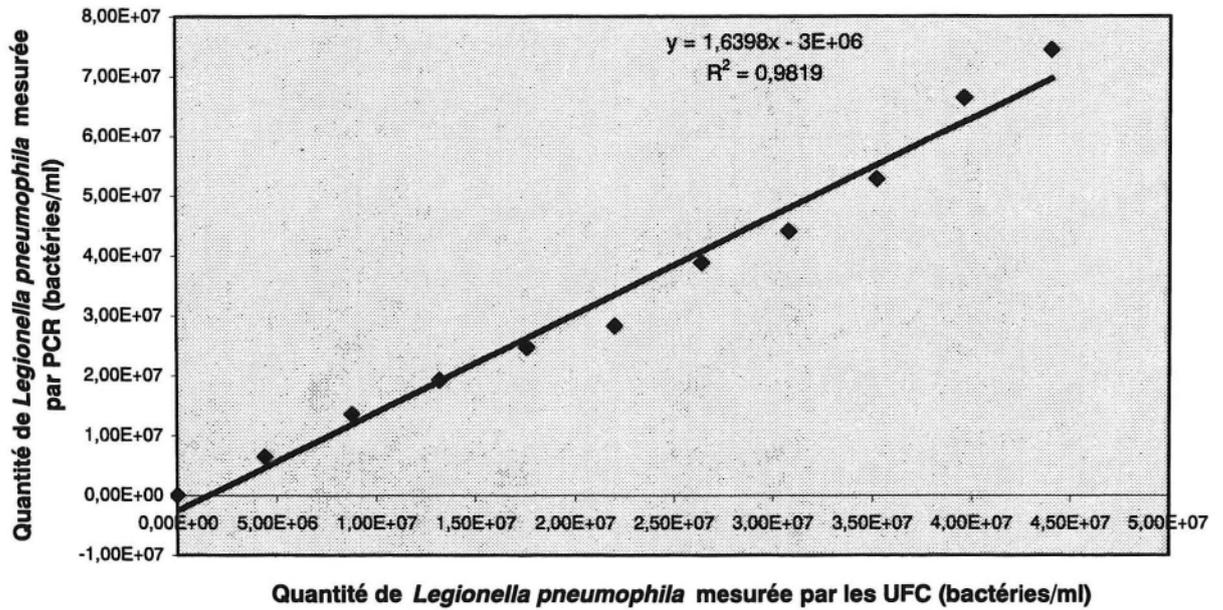
En effet, lorsque nous avons comparé la série des mesures de la quantité croissante de *L. pneumophila* du mélange 11 au mélange 1 à la fois par les UFC et par PCR (mip), nous avons obtenu par régression linéaire un très bon coefficient de corrélation ($r=0.99$) qui nous a permis de relier la quantification par PCR (mip) à la quantification par les UFC selon l'équation :

$$y = 1.6398x - 3 \times 10^6$$

où y est le résultat de la quantification par PCR (mip)

et x est le résultat de la quantification par les UFC

Figure 10 : droite de corrélation entre les mesures obtenues par PCR *L. pneumophila* (mip) et les mesures obtenues par les UFC



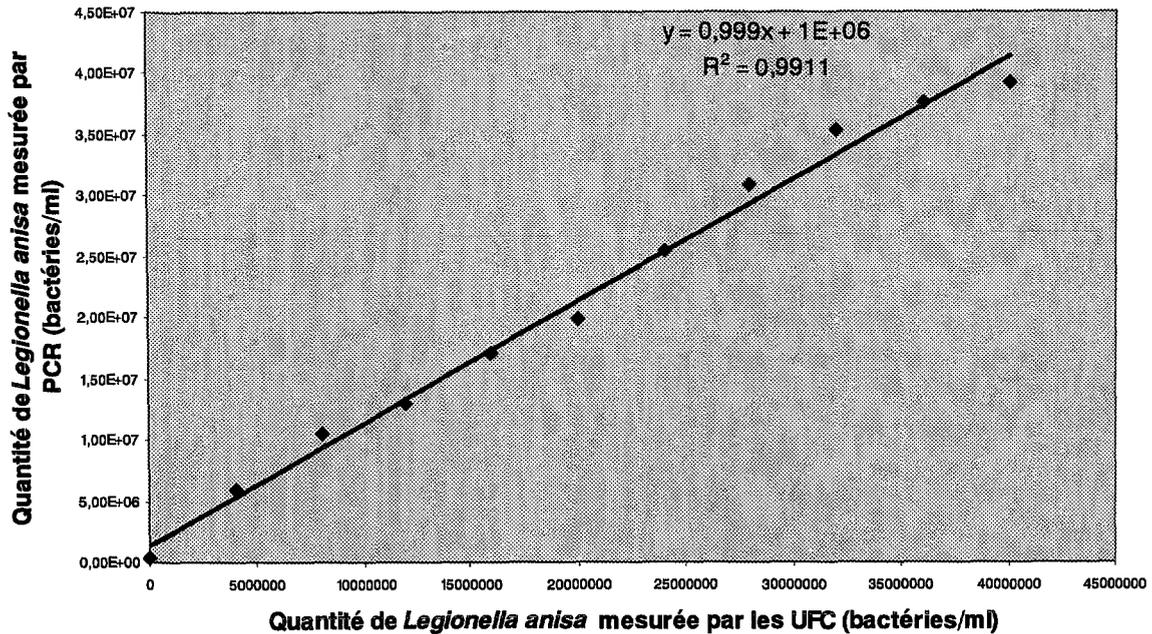
La même observation a pu être effectuée lorsque nous avons comparé la série des mesures de la quantité croissante de *L. anisa* du mélange 1 au mélange 11 à la fois par les UFC et par PCR. Nous avons obtenu par régression linéaire un très bon coefficient de corrélation ($r=0.99$) qui nous a permis de relier la quantification par PCR à la quantification par les UFC selon l'équation :

$$y = 0.999x + 1 \times 10^6$$

où y est le résultat de la quantification par PCR (résultat de la PCR ARNr 16S moins le résultat de la PCR mip)

et x est le résultat de la quantification par les UFC

Figure 11 : droite de corrélation entre les mesures obtenues par PCR (résultats de la PCR *Legionella* spp moins les résultats de la PCR *L. pneumophila*) et les mesures obtenues par les UFC



Cette expérience a été effectuée une seconde fois mais pour des concentrations en *L. pneumophila* et en *L. anisa* environs 1000 fois moins élevées ; des résultats similaires ont alors été obtenus :

⇒ Suspension de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) : 4×10^4 bactéries/ml

⇒ Suspension de *L. anisa* (ATCC 35292) : 4×10^4 bactéries/ml

Tableau XXVI : résultats de l'expérience n°2 : calcul de proportions

M E L A N G E	Quantité de <i>Legionella</i> (UFC)		Quantité de <i>Legionella</i> (PCR quantitative LightCycler®)		% de <i>Lp1</i> (UFC)	% de <i>Lp1</i> (PCR quantitative LightCycler®)
	<i>Lp1</i>	<i>L. anisa</i>	<i>Lp1</i> (mip)	<i>Lp1</i> + <i>L. anisa</i> (16S)		
1	4×10^4	0	1.07×10^5	1.13×10^5	100 %	94.7 %
2	3.6×10^4	4×10^3	9.91×10^4	1.12×10^5	90 %	88.5 %
3	3.2×10^4	8×10^3	9.05×10^4	1.13×10^5	80 %	80.1 %
4	2.8×10^4	1.2×10^4	7.66×10^4	1.08×10^5	70 %	70.9 %
5	2.4×10^4	1.6×10^4	7.11×10^4	1.1×10^5	60 %	64.6 %
6	2×10^4	2×10^4	5.03×10^4	1.04×10^5	50 %	48.4 %
7	1.6×10^4	2.4×10^4	4.16×10^4	1.02×10^5	40 %	40.8 %
8	1.2×10^4	2.8×10^4	3.23×10^4	1.1×10^5	30 %	29.4 %
9	8×10^3	3.2×10^4	1.91×10^4	9.04×10^4	20 %	21.1 %
10	4×10^3	3.6×10^4	1.13×10^4	1.1×10^5	10 %	10.27 %
11	0	4×10^4	0	1.02×10^5	0	0 %

Résultats exprimés en bactéries/ml.

Une bonne corrélation entre la quantification par PCR et la quantification par les UFC a également été observée (figures 12 et 13) :

Figure 12 : droite de corrélation entre les mesures obtenues par PCR *L. pneumophila* (mip) et les mesures obtenues par les UFC

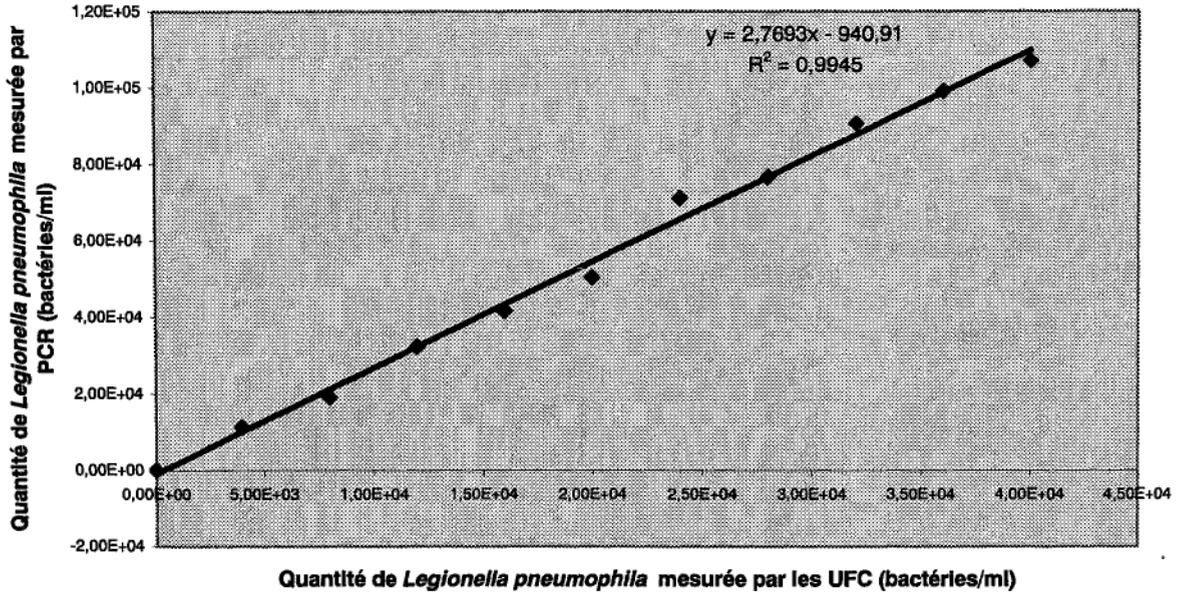
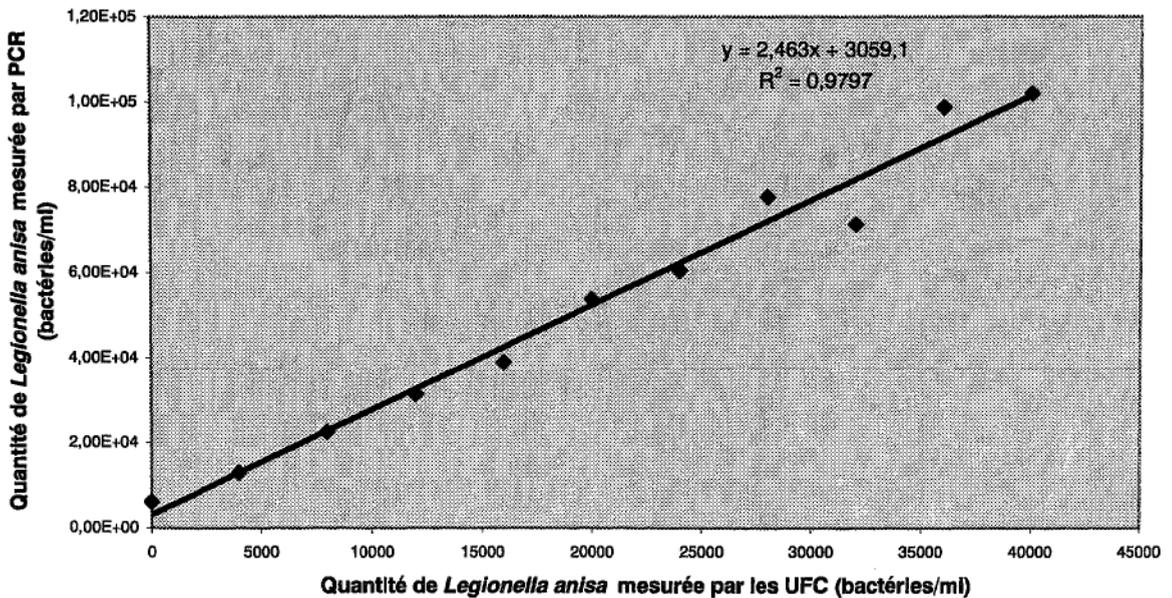


Figure 13: droite de corrélation entre les mesures obtenues par PCR (résultats de la PCR *Legionella* spp moins les résultats de la PCR *L. pneumophila*) et les mesures obtenues par les UFC



Nous avons donc constaté que la combinaison PCR *Legionella spp*/PCR *L. pneumophila* permettait de distinguer *L. pneumophila* des autres espèces de *Legionella* dans un mélange. Il n'a pas été observé d'interférences entre les espèces de *Legionella* sur la quantification. La PCR a permis de distinguer de faibles variations de concentration.

L'ensemble de ces résultats nous a permis également de constater que la quantification par PCR donnait des résultats sensiblement supérieurs à ceux obtenus par les UFC. En considérant l'ensemble des résultats des deux expériences nous obtenons un facteur 1.98 entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et les résultats des UFC et un facteur 2.09 entre les résultats de la PCR *L. pneumophila* et les résultats des UFC.

C.

**Test de quantification par PCR de *Legionella pneumophila* dans
un mélange avec *Pseudomonas aeruginosa***

1. Objectif :

Déterminer l'absence d'interférence de fortes concentrations d'ADN de bactéries contaminantes, sur la quantification par PCR de *L. pneumophila*.

Nous avons choisi d'utiliser l'ADN d'une bactérie fréquemment retrouvée dans des prélèvements d'eau : *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Méthode :

Deux suspensions bactériennes ont été réalisées et titrées selon la technique des UFC :

⇒ Suspension de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) : 1.2×10^8 bactéries/ml

⇒ Suspension de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853): 1×10^8 bactéries/ml

Nous avons réalisé 5 dilutions de la suspension de *L. pneumophila* (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) et ensuite préparé 5 mélanges de *L. pneumophila* et *Pseudomonas aeruginosa* :

Tableau XXVII : mélanges de *L. pneumophila* avec *Pseudomonas aeruginosa*

Mélange	Quantité de <i>Legionella pneumophila</i> 1	Quantité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
M1	1.1 ml de suspension <i>Lp1</i> à la dilution 10^{-3}	1.1 ml de suspension à 1×10^8 bactéries/ml
M2	1.1 ml de suspension <i>Lp1</i> à la dilution 10^{-4}	1.1 ml de suspension à 1×10^8 bactéries/ml
M3	1.1 ml de suspension <i>Lp1</i> à la dilution 10^{-5}	1.1 ml de suspension à 1×10^8 bactéries/ml
M4	1.1 ml de suspension <i>Lp1</i> à la dilution 10^{-6}	1.1 ml de suspension à 1×10^8 bactéries/ml
M5	1.1 ml de suspension <i>Lp1</i> à la dilution 10^{-7}	1.1 ml de suspension à 1×10^8 bactéries/ml

La concentration en *L. pneumophila* était décroissante du mélange M1 à M5 tandis que la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* restait identique.

L'ADN de chaque dilution pure de *L. pneumophila* et de chaque mélange avec *Pseudomonas aeruginosa* a été extrait et quantifié par PCR *Legionella spp.*

3. Résultats :

Tableau XXVIII : résultats de l'expérience de quantification sur les mélanges *L. pneumophila* + *Pseudomonas aeruginosa*

M E L A N G E	Quantité de <i>Legionella pneumophila</i> 1 calculée d'après les UFC	Quantité de <i>Legionella pneumophila</i> 1 calculée d'après la PCR quantitative réalisée sur les dilutions pures	Quantité de <i>Legionella pneumophila</i> 1 calculée d'après la PCR quantitative réalisée sur les mélanges avec <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
M1	1.32×10^5	3.03×10^5	2.41×10^5
M2	1.32×10^4	2.94×10^4	2.08×10^4
M3	1.32×10^3	2.93×10^3	1.84×10^3
M4	1.32×10^2	2.51×10^2	1.76×10^2
M5	1.32×10^1	4.14×10^1	8.08×10^1

Résultats exprimés en bactéries/ml

La comparaison entre la quantification de *L. pneumophila* par PCR réalisée sur les dilutions pures et la quantification par PCR réalisée sur les mélanges avec *Pseudomonas aeruginosa*, a pu être effectuée par l'intermédiaire d'un test non paramétrique de Wilcoxon. Nous comparons en effet des variables quantitatives discontinues dont la distribution ne suivait pas une loi Normale.

Nous avons émis l'hypothèse nulle suivante : absence de différence entre la quantification par PCR réalisée sur les dilutions pures et la quantification par PCR réalisée sur les mélanges avec *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons calculé la valeur $Z = 0.0145$

Puisque Z n'était pas supérieur à 1.96 ($p < 0.05$) nous ne pouvions rejeter l'hypothèse nulle, par conséquent il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre la quantification par PCR réalisée sur les dilutions pures et la quantification par PCR réalisée sur les mélanges avec *Pseudomonas aeruginosa*.

La présence de quantités importantes d'ADN bactérien n'interférait donc pas avec la PCR quantitative *Legionella spp.*

Comme pour les expériences précédentes, nous avons également observé que la quantification par PCR donnait des résultats sensiblement supérieurs à ceux obtenus par les UFC. Un facteur 2.3 a été noté entre les résultats obtenus par PCR *Legionella spp.* et les résultats obtenus par les UFC.

D.

**Etude comparative entre la PCR et la méthode normalisée
AFNOR T90-431 pour la quantification de *Legionella*
pneumophila sur des eaux artificiellement chargées**

1. Objectif :

Comparer les résultats obtenus par PCR quantitative à ceux obtenus par l'intermédiaire de la méthode normalisée, sur des eaux artificiellement chargées en *L. pneumophila*.

2. Méthode :

2.1. Préparation d'eaux artificiellement chargées en *L. pneumophila* :

Nous avons réalisé 4 échantillons d'eau similaires à ceux reçus au laboratoire en routine pour la recherche et la quantification de *Legionella spp*, c'est à dire des échantillons d'un litre d'eau contenue dans un récipient stérile avec 0.5 % (m/V) de thiosulfate de sodium.

L'échantillon n°1 a été obtenu par la mise en suspension de *L. pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152) dans un litre d'eau froide du robinet. Les échantillons n°2 et n°3 ont été obtenus de façon similaire : l'échantillon n°2 correspondait à une dilution au 1/100 de l'échantillon n°1 et l'échantillon n°3 correspondait à une dilution au 1/100 de l'échantillon n°2. L'échantillon n°4 n'était constitué que d'eau froide du robinet.

2.2. Recherche et dénombrement des *Legionella spp* dans les échantillons d'eau par la méthode générale d'ensemencement direct et de filtration sur membrane: norme AFNOR T90-431 :

Cette technique est la technique de référence en France, utilisée pour déceler la contamination par les *Legionella spp* dans différents types d'environnements aquatiques artificiels (réseaux d'eau chaude sanitaire, tours aéroréfrigérantes...). Elle nécessite des prélèvements d'1 litre d'eau.

2.2.1. Principe de la norme :

Ensemencement direct de l'échantillon sur milieu sélectif, et en parallèle, filtration sur membrane en polycarbonate, de diamètre nominal de pore 0.45 µm ou 0.22 µm, avec remise en suspension, soit par grattage, soit par ultrasons.

Décontamination du concentré obtenu, d'une part par traitement thermique, d'autre part par traitement acide.

Ensemencement du concentré avant et après décontamination, sur milieu sélectif.

Incubation pendant 3 à 10 jours à 37° C +/- 1° C.

Repiquage des colonies typiques pour la recherche de bactéries exigeantes en L-cystéine et la mise en évidence des *Legionella spp.*

Identification des colonies de *L. pneumophila* par technique d'agglutination.

2.2.2. Mode opératoire utilisé au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble:

a) Ensemencements :

- 200 µl d'eau à analyser et 200 µl d'une dilution au 1/10 en tampon phosphaté salé (PBS) sont ensemencés par étalement au râteau, chacun sur une boîte de pétri contenant le milieu BCYE α additionné de Glycine, Vancomycine, Polymyxine, Cycloheximide (GVPC OXOID®).
- Un litre d'eau est filtré sur une membrane en polycarbonate de diamètre nominal de pore 0.22 µm ou 0.45 µm.
- Ce filtre est ensuite rincé avec 5 ml d'eau de l'échantillon dans un pot stérile : contact de 2 à 5 minutes en agitant et grattant la membrane :
 - 100 µl de cette eau de rinçage sont ensemencés sur milieu GVPC
 - Traitement thermique :
 - 1 ml de l'eau de rinçage est transféré dans un tube stérile et chauffé au bain-marie thermostaté à 50°C pendant 30 minutes.
 - 100 µl de cette eau sont alors immédiatement ensemencés sur milieu GVPC.
 - Traitement acide :
 - 2 ml de l'eau de rinçage sont transférés dans un tube stérile et 2 ml de tampon acide (pH 2.00) sont ajoutés.
 - Après un temps de contact de 5 minutes, 200 µl de ce mélange sont alors ensemencés sur milieu GVPC.

b) Incubation :

- Les différents milieux GVPC ensemencés sont placés dans une étuve thermostatée à 37° C en atmosphère enrichie à 2.5 % de CO₂.
- Les boîtes sont observées à 3, 7 et 10 jours.

c) Dénombrement des *Legionella* :

Les colonies caractéristiques ont une coloration gris-bleu pouvant devenir blanchâtre en vieillissant avec un bord bien net et rosé, et un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire.

Les boîtes présentant 1 à 50 colonies caractéristiques sont exploitées.

Ces colonies caractéristiques sont repiquées en vue de l'identification : soit N le nombre de colonies caractéristiques, alors si $1 < N \leq 5$ on repique toutes ces colonies et si $5 < N \leq 50$ alors on repique 5 à 7 colonies.

Ces colonies suspectes sont repiquées dans l'ordre suivant, sur :

- gélose BCYE α sans L-cystéine
- gélose au sang
- gélose BCYE α (avec L-cystéine)

Ces repiquages sont observés après 3 jours d'incubation à 37° C.

Considérer comme *Legionella* toutes les colonies de bacilles à Gram négatif, ne se développant que sur milieu BCYE α avec L-cystéine.

L'utilisation d'un test d'agglutination au latex (*Legionella* Latex Test, OXOID®) permet l'identification séparée de *L. pneumophila* séro-groupe 1 et séro-groupes 2-14, ainsi que la détection de sept autres espèces de *Legionella* (*L. longbeachae* 1 et 2, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* et *L. anisa*).

Les *Legionella* présumées ne régissant pas avec le test d'agglutination, peuvent être envoyées pour une identification au Centre National de Référence des Légionelles (Laboratoire de Microbiologie, HÔPITAL EDOUARD HERRIOT, Bâtiment 10, 5 Place d'Arsonval 69437 Lyon Cedex 03).

d) Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés de la façon suivante :

Nombre de *Legionella*/litre
dont *L. pneumophila*/litre

- Les boîtesensemencées directement avant filtration sont considérées en premier :
 - Si l'une de ces boîtes fournit un nombre exploitable ($N > 4$) de colonies confirmées, le résultat est calculé en divisant le nombre de colonies confirmées par le volumeensemencé sur la boîte exploitable (en litre), soit
 - N colonies pour 200 μ lensemencés directement alors :

$$\text{Nombre de } Legionella/\text{litre} = N/2 \times 10^{-4}$$

ou

- N colonies pour 200 µlensemencés après dilution au 1/10 alors :

$$\text{Nombre de } Legionella/\text{litre} = N/2 \times 10^{-5}$$

→ Si les deux boites fournissent un nombre exploitable ($4 < N < 100$) de colonies confirmées, il faut faire la somme des colonies observées sur les deux boites et diviser par le volume totalensemencé sur ces deux boites, soit :

- N_1 colonies pour 200 µlensemencés directement et N_2 coloniesensemencés après dilution au 1/10, alors :

$$\text{Nombre de } Legionella/\text{litre} = (N_1 + N_2) / 2.2 \times 10^{-4}$$

- Lorsque les boitesensemencées en direct ne sont pas exploitables, on examine alors les boitesensemencées après concentration. Parmi les trois séries (sans traitement, après traitement thermique, après traitement acide), on choisit celle qui conduit au résultat le plus élevé (N colonies observées). Le résultat est alors calculé de la manière suivante :

$$\text{Nombre de } Legionella/\text{litre} = N \times 50$$

2.3. Adaptation de la norme à notre manipulation :

Nous avons appliqué les étapes de concentration (filtration) et de décontamination (traitement acide et thermique) de la norme AFNOR T90-431 à la recherche de *L. pneumophila* sur les quatre échantillons.

Cependant, comme ces échantillons contenaient des concentrations élevées en *L. pneumophila*, nous n'avons pas appliqué les recommandation de la norme AFNOR T90-431 pour les ensemencements. En effet nous risquions d'avoir un nombre trop important de colonies (> 100) sur les milieuxensemencés et donc impossible à compter. Nous avons donc appliqué la technique des UFC avec dilution des échantillons pour chaque étape d'ensemencement.

2.4. Recherche et quantification de *L. pneumophila* par PCR :

Nous avons effectué la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila* par PCR quantitative :

- directement à partir d'un ml d'eau de chaque échantillon avant filtration
- à partir d'un ml d'eau de reprise du filtre avant et après chaque traitement de décontamination.

Nous avons considéré que l'eau froide du robinet était exempte de *Legionella spp* ou tout du moins que les *Legionella spp* éventuellement présentes étaient en quantité trop faible pour être détectée que ce soit par culture ou par PCR. L'échantillon n°4 nous permettait de vérifier ce postulat.

Nous avons donc choisi de réaliser la recherche et la quantification de *L. pneumophila* par PCR *Legionella spp* (ARNr 16S). Après s'être assuré que la recherche était bien négative pour l'échantillon n°4, toutes les *Legionella spp* ainsi dénombrées ont été considérées comme des *L. pneumophila*.

La même expérience a été réalisée deux fois.

3. Résultats :

Tableau XXIX : comparaison PCR quantitative/méthode normalisée AFNOR T90-431 pour la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila* dans une eau (expérience n°1)

F L A C O N	Avant filtration		Après filtration					
	UFC	LightCycler (ARNr 16S)	UFC			LigthCycler (ARNr 16S)		
			Sans traitement	Traitement acide	Traitement chaleur	Sans traitement	Traitement acide	Traitement chaleur
1	4.4×10^8	9.87×10^8	2.12×10^8	< 50	8.9×10^6	5.9×10^8	1.86×10^8	5.86×10^8
2	4.4×10^6	9.04×10^6	1.11×10^6	< 50	3.9×10^4	3.9×10^6	1.86×10^6	4.12×10^6
3	4.3×10^4	7.2×10^4	1.9×10^4	< 50	< 50	3×10^4	1.05×10^4	3.2×10^4
4	$< 5 \times 10^3$	$< 4 \times 10^4$	< 50	< 50	< 50	< 200	< 200	< 200

NB : les résultats sont exprimés en *L. pneumophila*/l

Tableau XXX : comparaison PCR quantitative/méthode normalisée AFNOR T90-431 pour la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila* dans une eau (expérience n°2)

F L A C O N	Avant filtration		Après filtration					
	UFC	LightCycler (ARNr 16S)	UFC			LigthCycler (ARNr 16S)		
			Sans traitement	Traitement acide	Traitement chaleur	Sans traitement	Traitement acide	Traitement chaleur
1	7.4×10^8	1.7×10^9	4.12×10^8	< 50	9.46×10^7	9.65×10^8	4.5×10^8	1.01×10^9
2	6.2×10^6	1.27×10^7	8.35×10^5	< 50	6.7×10^4	4.9×10^6	5.16×10^6	5.5×10^6
3	6.5×10^4	1.02×10^5	1.17×10^4	< 50	< 50	2.13×10^4	3.02×10^4	2.6×10^4
4	$< 5 \times 10^3$	$< 4 \times 10^4$	< 50	< 50	< 50	< 200	< 400	< 200

NB : les résultats sont exprimés en *L. pneumophila*/l

3.1 Seuils de positivité :

Les seuils de positivité des UFC avant et après filtration correspondaient aux seuils de détection de la norme AFNOR T90-431 .

Le seuil de positivité de la PCR *Legionella spp* était de 1 équivalent de copie de génome de *Legionella spp*/5µl de prise d'essai.

Ainsi, le seuil de positivité de la PCR *Legionella spp* réalisée :

⇒ directement sur les eaux avant filtration était de :

- 1 équivalent de copie de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai
- soit 40 équivalents de copies pour 200 µl de solution d'extraction
- soit 40 équivalents de copies pour 1 ml d'eau extrait
- soit $40 \times 1000 = 4 \times 10^4$ équivalents de copies d'ADN de *L. pneumophila* par litre d'eau

⇒ sur l'eau de reprise du filtre après filtration était de :

- 1 équivalent de copie de génome de *L. pneumophila* / 5 µl de prise d'essai
- soit 40 équivalents de copies pour 200 µl de solution d'extraction
- soit 40 équivalents de copies pour 1 ml extrait, d'eau de reprise du filtre
- soit 200 équivalents de copies pour 5 ml d'eau de reprise du filtre
- soit 200 équivalents de copies pour 1 litre d'eau filtrée

Sur l'eau de reprise du filtre après traitement par la chaleur, ce seuil était également de 200 équivalents de copies/litre ; il était multiplié par deux pour la PCR *Legionella spp* réalisée sur l'eau de reprise du filtre après traitement acide car nous réalisons une dilution au demi quand on ajoutait l'acide.

3.2. Perte de bactéries liée à la filtration :

Nous avons constaté que l'étape de filtration entraînait une perte de bactéries puisque les résultats des UFC et des PCR réalisées avant filtration étaient en moyenne, respectivement 3.83 fois et 2.59 fois plus élevés que ceux réalisés après filtration.

3.3. Différence entre les résultats de quantification par PCR et les résultats de quantification par les UFC :

Comme pour les expériences précédentes, nous avons observé une bonne corrélation entre la PCR et les UFC (figures 14 et 15) avec des résultats de quantification par PCR sensiblement supérieurs à ceux obtenus par les UFC : un facteur moyen de 2.49 a été noté entre les résultats obtenus par PCR *Legionella spp* et ceux obtenus par les UFC.

En distinguant les mesures effectuées avant l'étape de filtration de celles effectuées après, nous avons observé que cette différence était plus importante après filtration. En effet, avant filtration, un facteur 2 a été noté entre les résultats obtenus par PCR *Legionella spp* et ceux obtenus par les UFC tandis qu'un facteur 3 a été relevé après filtration.

Figure 14 : corrélation entre les résultats obtenus par les UFC et ceux obtenus par PCR sur les eaux avant filtration

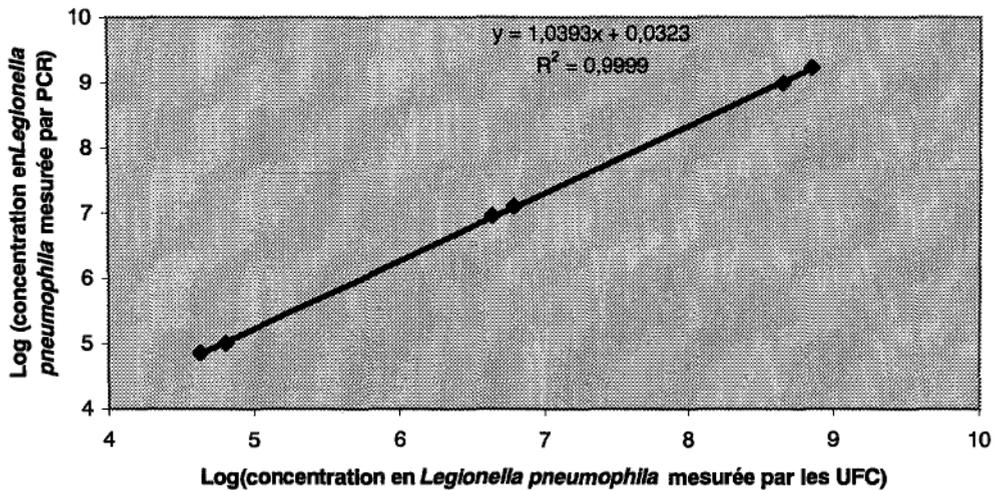
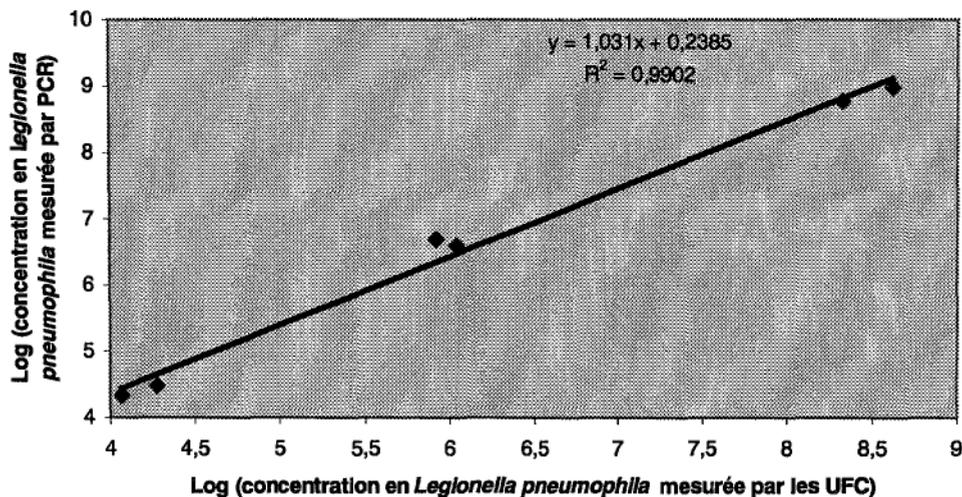


Figure 15 : corrélation entre les résultats obtenus par les UFC et ceux obtenus par PCR sur les eaux de reprise des filtres



3.4. Effet des traitements de décontamination :

Nous avons observé que le traitement de l'eau de reprise du filtre par l'acidité selon le protocole de la norme AFNOR T90-431 entraînait une chute de la numération par les UFC de plus de 8 logarithmes.

Le traitement par la chaleur a également entraîné une chute de la numération par les UFC, mais dans une moindre mesure de l'ordre de 0.7 à 1.5 logarithmes.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre la numération par PCR directement après filtration ou après traitement de décontamination.

E.

Application des méthodes de PCR quantitative au dénombrement des *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* sur les eaux reçues en routine au laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble : étude comparative avec la méthode normalisée AFNOR T90-431

1. Méthode :

1.1. Nature des échantillons :

Il s'agissait d'échantillons d'eau (1 litre) prélevés dans des récipients stériles contenant 0.5 % (m/V) de thiosulfate de sodium, reçus au laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble de février 2003 à juillet 2003 pour la recherche et le dénombrement des *Legionella spp.*

1.2. Gestion des échantillons :

Les prélèvements d'eau ont été gérés par une technicienne du laboratoire selon les recommandations de la norme Française AFNOR T90-431. Lors de cette opération, 1 ml d'eau de reprise du filtre a alors été mis de côté et congelé à -20° C, en vue d'une extraction et d'une analyse par PCR quantitative.

Les prélèvements ne pouvant être gérés par le laboratoire dans les heures suivant le recueil ont été réfrigérés 48h maximum à $+4^{\circ}$ C sans être congelés, selon les recommandations de la norme AFNOR T90-431.

1.3. Analyse par PCR quantitative des échantillons :

Un ml d'eau de reprise du filtre a été extrait et analysé à la fois par PCR quantitative *Legionella spp* et PCR quantitative *L. pneumophila*. Chaque échantillon a été testé en duplicate.

1.4. Interprétation des résultats des PCR quantitatives :

Etant donné les limites de détection des techniques et les études de reproductibilité, nous avons décidé d'interpréter les résultats des PCR de la façon suivante :

1.4.1. PCR *Legionella spp* :

a) Seuil de positivité :

Pour la PCR *Legionella spp* le seuil de positivité était de 1 équivalent de copie de génome de *Legionella spp*/5 μ l de prise d'essai soit 200 équivalents de copies de génome de *Legionella spp*/ litre d'eau filtrée

b) Limite de quantification :

Les résultats de la PCR *Legionella spp* ayant une reproductibilité acceptable jusqu'à 36.595 +/- 2.576x0.530 cycles (indice de confiance à 99%), nous avons décidé d'accepter les résultats de quantification uniquement lorsque le Cp serait inférieur à $36.6 + 2.6 \times 0.5 = 37.9$ cycles. Au-delà, les résultats étaient considérés comme des **positifs faibles non quantifiables**, car la PCR n'était pas suffisamment reproductible pour que la valeur mesurée soit fiable.

Valeurs théoriques minimales et maximales d'un résultat positif faible non quantifiable:

Valeur basse : en considérant une limite de détection jusqu'à 0.1 équivalent de copie de génome bactérien/5 μ l de prise d'essai, alors la valeur théorique minimale d'un résultat rendu positif faible était de 20 équivalents de copies de génome bactérien/l d'eau filtrée.

Valeur haute :

⇒ soit 37.96, le cycle seuil au-delà duquel un résultat était rendu positif faible en PCR *Legionella spp*,

⇒ soit $b = 38.533 + 0.256 \times 2.576 = 39.19$, l'intercept maximal de la droite d'étalonnage pour la PCR *Legionella spp*,

⇒ soit $a = -3.5517 + 0.036 \times 2.576 = -3.46$ la pente minimale de la droite d'étalonnage pour la PCR *Legionella spp*,

alors : $37.96 = -3.46 \times \log C + 39.19$ (formule de la droite d'étalonnage)

⇔ $C = 2.27$ équivalents de copies de génome bactérien/5 μ l de prise essai.

La valeur théorique maximale d'un résultat rendu positif faible était donc de $2.27 \times 200 = 454$ équivalents de copies de génome bactérien/l d'eau filtrée.

1.4.2. PCR *L. pneumophila* :

En suivant le même raisonnement, nous avons obtenu les résultats suivants :

a) Seuil de positivité : 528 équivalents de copies de génome de *L. pneumophila*/litre d'eau filtrée.

b) Limite de quantification :

Au-delà de 38.2 cycles les résultats étaient rendus positifs faibles non quantifiables.

Valeurs théoriques minimales et maximales possibles d'un résultat positif faible non quantifiable :

Valeur basse : en considérant une limite de détection jusqu'à 1 équivalent de copie de génome bactérien/5 μ l de prise d'essai, alors la valeur théorique minimale d'un résultat rendu positif faible était de 200 équivalents de copies de génome bactérien/l d'eau filtrée.

Valeur haute :

⇒ soit 38.18, le cycle seuil au-delà duquel un résultat était rendu positif faible en PCR *L. pneumophila*,

⇒ soit $b = 39.609 + 0.365 \times 2.576 = 40.55$ l'intercept maximal de la droite d'étalonnage de la PCR *L. pneumophila*,

⇒ soit $a = -3.5391 + 0.064 \times 2.576 = -3.37$ la pente minimale de la droite d'étalonnage pour la PCR *L. pneumophila*,

alors : $38.18 = -3.37 \times \log C + 40.55$

⇔ $C = 5$ équivalents de copies de génome bactérien/5 μ l de prise essai.

La valeur théorique maximale d'un résultat rendu positif faible était donc de $5 \times 200 = 1000$ équivalents de copies de génome bactérien/l d'eau filtrée.

1.5. Etude comparative :

Les résultats des PCR quantitatives *Legionella spp* et *L. pneumophila* ont alors été comparés aux résultats obtenus par la technique de filtration et mise en culture (norme AFNOR T 90-431).

2. Résultats :

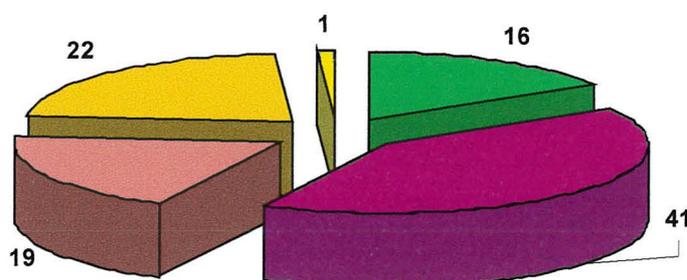
Au total, 99 prélèvements ont été obtenus de février 2003 à juillet 2003 : 66 collectés au Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble (Isère, France), 17 au foyer départemental de l'enfance à La Côte-Saint-André (Isère, France), 7 à l'hôpital rhumatologique d'Uriage les Bains (Isère, France), 7 provenant de tours aérorefrigérantes d'entreprises privées et 2 prélèvements issus de l'essai interlaboratoires *Legionella* et *L. pneumophila* sur eau propre de l'Association Générale des Laboratoires d'Analyses de l'Environnement (AGLAE).

Pour les prélèvements effectués au niveau des réseaux d'eau chaude, 12 ont été réalisés au niveau de points techniques et 78 au niveau de points d'usage.

Parmi les 78 prélèvements obtenus à partir de points d'usage, 10 ont été prélevés sur une robinetterie équipée de microfiltres terminaux constitués d'une membrane de 0.2 micromètre.

Sur les 99 eaux qui ont été testées, les résultats se répartissaient de la façon suivante :

Figure 16 : répartition des résultats de l'étude comparative entre la méthode normalisée et les PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila*



- Recherche de *Legionella spp* négative, à la fois par ensemencement et par les deux techniques de PCR.
- Recherche positive en *Legionella pneumophila* par ensemencement et par les deux techniques de PCR.
- Recherche de *Legionella spp* négative par ensemencement mais positive en PCR *Legionella spp* et PCR *Legionella pneumophila*.
- Recherche négative à la fois par ensemencement et par PCR *Legionella pneumophila*, mais positive en PCR *Legionella spp*.
- Recherche positive en *Legionella taurinensis* par ensemencement, positive en PCR *Legionella spp* et PCR *Legionella spp*.

2.1. Recherche de *Legionella spp* négative à la fois par ensemencement et par les deux techniques de PCR : 16/99 prélèvements

Nous avons noté que sur ces 16 prélèvements, 9 (56%) avaient été obtenus à partir de points d'usage équipés de filtres terminaux.

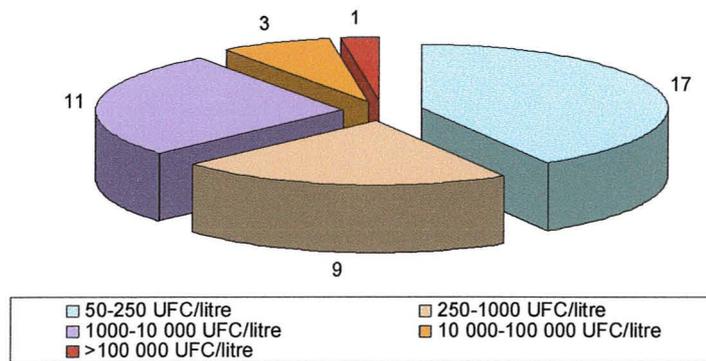
2.2. Recherche positive en *L. pneumophila* par ensemencement et par les deux techniques de PCR : 41/99 prélèvements

Des résultats numériques ont été obtenus par les deux techniques de PCR pour 34 de ces prélèvements. Pour 7 autres prélèvements, un résultat positif faible non quantifiable a été obtenu avec au moins une des deux techniques de PCR.

Les résultats obtenus par la méthode normalisée varient de 50 à 200 000 UFC/l, avec une moyenne à 7365 UFC/l et une médiane à 400 UFC/l.

Ces résultats se répartissaient de la façon suivante :

Figure 17 : répartition des résultats obtenus par la méthode normalisée pour les recherches également positives en PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila* (n=41)



2.2.1. Corrélation entre les résultats obtenus par PCR *Legionella spp* et les résultats obtenus par PCR *L. pneumophila* :

Pour chaque prélèvement nous avons calculé le rapport entre le résultat de quantification obtenu par PCR *Legionella spp* et celui obtenu par PCR *L. pneumophila*.

Nous avons ensuite comparé ce rapport au facteur maximum pouvant relier les résultats de la PCR *Legionella spp* et ceux de la PCR *L. pneumophila*, pour la mesure d'une même quantité d'ADN de *L. pneumophila* (tableau XXIX).

Si ce rapport excédait le facteur maximum, alors nous pouvions conclure que la différence de quantification entre les deux techniques de PCR était significative, et que par conséquent il existait dans les prélèvements concernés une quantité significative d'une ou plusieurs autres espèces de *Legionella*, non détectées par les ensemencements.

*NB : à l'inverse, l'absence de différence significative entre la quantification par PCR *Legionella spp* et par PCR *L. pneumophila*, ne permettait pas d'exclure la présence éventuelle d'autres espèces de *Legionella non-pneumophila* en plus de *L. pneumophila*.*

a) Résultats numériques :

L'exploitation des résultats a révélé un rapport de 0.56 à 2.66 entre les quantifications par PCR *Legionella spp* et celles par PCR *L. pneumophila* ; le rapport moyen était de 1.17 et la médiane de 1.08.

Nous n'avons donc pas observé de différence significative entre les deux techniques de quantification par PCR.

b) Prélèvements pour lesquels la PCR n'a pas permis d'obtenir des résultats quantifiables (7 prélèvements) :

Le rapport exact entre les résultats obtenus par PCR *Legionella spp* et ceux obtenus par PCR *L. pneumophila* n'a pu être strictement établi. Cependant, ce rapport a pu être estimé car nous connaissions les valeurs minimales et maximales correspondant à un résultat positif faible non quantifiable. Ce qui nous a permis de calculer un rapport minimum et maximum (tableau XXXI).

Tableau XXXI : estimation du rapport minimum et maximum entre les résultats de la PCR

Legionella spp et ceux de la PCR *L. pneumophila*

Prélèvement	Résultat de la PCR <i>Legionella spp</i>	Résultat de la PCR <i>L. pneumophila</i>	Rapport minimum entre les deux PCR	Rapport maximum entre les deux PCR
BA 0324 3178	627	Positif faible	$627/1000=0.63$	$627/200=3.1$
BA 0327 5072	643	Positif faible	$643/1000=0.64$	$643/200=3.2$
BA 0331 4202	437	Positif faible	$437/1000=0.44$	$437/200=2.2$
BA 0331 4201	Positif faible	Positif faible	$454/1000=0.45$	$454/200=2.27$
BA 0312 2186	1585	Positif faible	$1585/1000= 1.6$	$1585/200=7.9$
BA 0321 4161	3904	Positif faible	$3904/1000=3.9$	$3904/200=19.5$
BA 0326 3178	Positif faible	6148	/	/

Nous avons ainsi constaté qu'il existait une différence significative entre les deux techniques de quantification pour le prélèvement BA 0321 4161.

Nous n'avons pu exploiter les données du prélèvement BA 0326 3178, car nous étions dans le cas d'un problème évident d'inhibiteurs de PCR, que nous reverrons plus loin.

Pour un prélèvement, la combinaison des deux techniques de PCR nous a permis de suspecter la présence en quantité significative d'autres espèces de *Legionella* non-*pneumophila* alors que la culture n'avait détecté que *L. pneumophila*.

2.2.2. Relation entre les résultats obtenus par la méthode normalisée et les résultats obtenus par PCR :

a) Prélèvements pour lesquels il n'existait pas de différence significative entre la quantification par PCR *Legionella* spp et celle par PCR *L. pneumophila* (n=39).

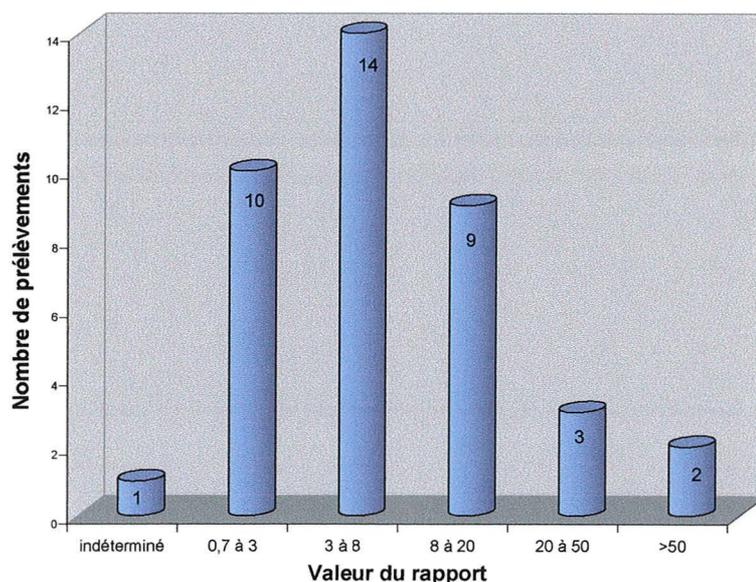
Nous avons donc choisi de comparer les résultats obtenus par la méthode normalisée aux résultats obtenus par la PCR *Legionella* spp. Cette PCR ayant une limite de reproductibilité plus basse que la PCR *L. pneumophila*, elle nous permettait d'avoir plus de résultats numériques à exploiter.

Pour ces 39 prélèvements nous avons calculé le rapport :

$$\frac{\text{résultat de quantification par PCR (L. pneumophila/l)}}{\text{résultat de quantification par la méthode normalisée (L. pneumophila/l)}}$$

Nous avons obtenu un rapport moyen de 13.2 avec une médiane à 6.4 et la répartition suivante :

Figure 18: répartition des rapports PCR/méthode normalisée

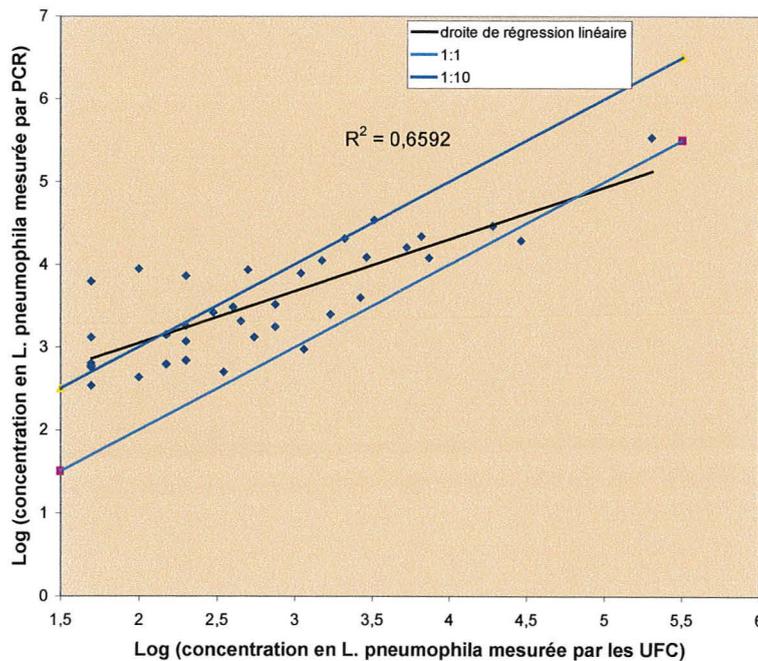


Nous avons observé que pour 7 des 10 prélèvements (70 %) pour lesquels le rapport était supérieur à 10, les résultats par ensemencement avaient été obtenus après traitement par la chaleur ou après traitement par l'acidité.

Nous avons recalculé le rapport moyen entre les deux techniques en ignorant tous les prélèvements qui avaient nécessité une étape de décontamination pour le dénombrement par les UFC. Le rapport moyen ainsi obtenu fut de 7 et la médiane de 4.5. Ce rapport était probablement plus représentatif de l'écart réel entre les deux techniques, car les étapes de décontamination pouvaient sous estimer le dénombrement par la méthode normalisée.

Comme nous le laissait présager cette variabilité du rapport entre les deux techniques de quantification, aucune relation générale par régression linéaire n'a pu être établie entre la PCR et la méthode normalisée (figure 19). Le coefficient de corrélation inférieur à 0.99 ne permettait pas de valider la droite de régression par la méthode des moindres carrés.

Figure 19 : corrélation entre les résultats obtenus par la méthode normalisée et les résultats obtenus par PCR *L. pneumophila* (n=38)



Cependant pour la majorité des prélèvements, nous avons constaté qu'il existait une relation logique entre la quantification par PCR et la quantification par la technique normalisée : les résultats de valeurs basses par ensemencement correspondaient en majorité aux résultats de valeurs basses par PCR, il en était de même pour les mesures intermédiaires et hautes (tableau XXXII).

Tableau XXXII : corrélation entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et ceux la méthode normalisée

Valeur des résultats obtenus par la méthode normalisée \ Valeur des résultats obtenus par PCR	$40 \leq N < 400$ (UFC/l)	$400 \leq N < 4000$ (UFC/l)	$4000 \leq N < 4 \times 10^4$ (UFC/l)	$4 \times 10^4 \leq N < 4 \times 10^5$ (UFC/l)	TOTAL des Prélèvements
$160 \leq N < 1600$ (équivalents de copies de génome/l)	13	2	0	0	15
$1600 \leq N < 1.6 \times 10^4$ (équivalents de copies de génome/l)	5	11	1	0	17
$1.6 \times 10^4 \leq N < 1.6 \times 10^5$ (équivalents de copies de génome/l)	0	2	4	0	6
$1.6 \times 10^5 \leq R < 1.6 \times 10^6$ (équivalents de copies de génome/l)	0	0	0	1	1
TOTAL des prélèvements	18	15	5	1	39

Ce tableau nous montre que :

- sur les 18 prélèvements mesurés entre 40 et 400 bactéries/litre par la méthode normalisée, 13 étaient mesurés entre 160 et 1600 bactéries/l par PCR, **soit 72 %** de ces prélèvements,
- sur les 15 prélèvements mesurés entre 400 et 4000 bactéries/litre par la méthode normalisée, 11 étaient mesurés entre 1600 et 1.6×10^4 bactéries/l par PCR, **soit 73 %** de ces prélèvements,
- sur les 5 prélèvements mesurés entre 4000 et 4×10^4 bactéries/litre par la méthode normalisée, 4 étaient mesurés entre 1.6×10^4 et 1.6×10^5 bactéries/l par PCR, **soit 80 %** de ces prélèvements.

b) Cas particulier des prélèvements qui n'ont pu être comparés à la méthode normalisée par l'intermédiaire de la PCR *Legionella spp*:

- BA 0321 4161 : pour ce prélèvement il existait une différence significative entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et les résultats de la PCR *L. pneumophila*. Nous avons donc émis l'hypothèse de la présence d'une ou plusieurs espèces de *Legionella non-pneumophila* non détectées par les ensemencements et donc comparé les résultats de quantification par l'intermédiaire de la PCR *L. pneumophila*. Nous avons obtenu un résultat de 150 *L. pneumophila*/l par la méthode normalisée, et un résultat positif faible en

PCR *L. pneumophila*. Le rapport entre les deux techniques n'a pu être strictement établi, mais estimé entre 1.3 et 6.7.

- BA 0326 3178 : pour ce prélèvement nous avons obtenu les résultats suivants : 12000 *L. pneumophila*/l par la méthode normalisée, 6148 *L. pneumophila*/l par PCR *L. pneumophila* et un résultat positif faible en PCR *Legionella spp* :
 - Soit un rapport de 0.5 entre les résultats de la PCR *L. pneumophila* et ceux des ensemencements et un rapport entre 0.0017 et 0.04 entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et ceux des ensemencements.
 - Nous avons suspecté la présence d'inhibiteurs de PCR car des rapports aussi faibles n'avaient jamais été observés jusque là et il n'était pas logique d'obtenir des résultats beaucoup plus élevés par PCR *L. pneumophila* que par PCR *Legionella spp*.
 - Nous avons alors réalisé de nouvelles PCR en diluant au dixième l'échantillon d'ADN. Ce qui nous a permis d'obtenir des résultats à 4.6×10^5 *Legionella spp*/l en PCR *Legionella spp* et à 2.64×10^5 *L. pneumophila*/l en PCR *L. pneumophila*. Il y avait donc bien un phénomène d'inhibition dont l'interférence a été réduite par la dilution.

Malgré l'absence d'une relation linéaire entre les résultats de la PCR et les résultats des UFC, nous avons observé pour la plupart des prélèvements une bonne concordance entre les deux techniques. Les différences les plus importantes ont été constatées lorsque la quantification par la méthode normalisée n'a pu être effectuée qu'après une étape de décontamination de l'échantillon.

Un phénomène important d'inhibition de la Taq polymérase a été à l'origine d'une numération faussement basse par les méthodes de PCR.

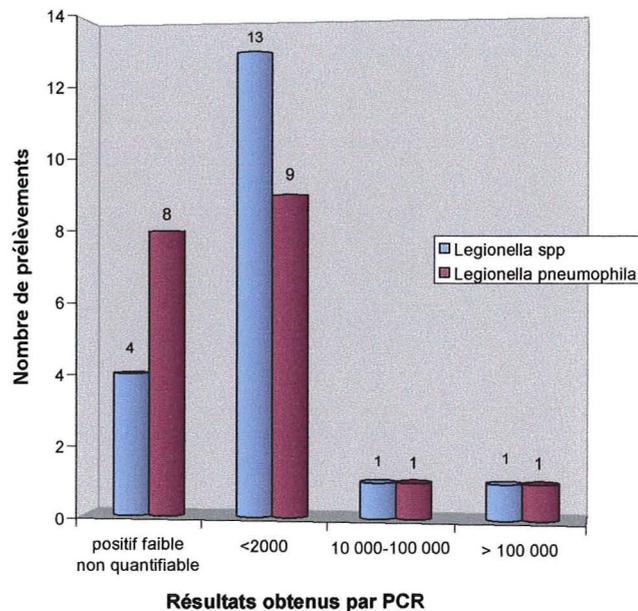
2.3. Recherche de *Legionella spp* négative par ensemencement mais positive en PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila* : 19/98 prélèvements.

2.3.1. Corrélation entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et les résultats de la PCR *L. pneumophila* :

Pour l'ensemble de ces 19 prélèvements, nous n'avons pas constaté de différence significative entre les résultats des deux PCR.

2.3.2. Répartition des résultats des PCR :

Figure 20 : répartition des résultats des PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila* pour les prélèvements dont la recherche était **négative par la méthode normalisée**



On notera que les deux prélèvements fortement positifs en PCR provenaient de tours aérorefrigérantes et que les milieuxensemencés sans traitement préalable par la chaleur ou l'acidité étaient contaminés par d'autres bactéries.

Lorsque *L. pneumophila* n'a pas été détectée par la méthode normalisée et que la PCR était positive, alors dans 89 % des cas, les résultats obtenus par PCR correspondaient à des valeurs basses de la technique (<2000 équivalents de copies de génome/l).

Les cas de PCR fortement positives avec des recherches par mise en culture négatives (11%) ont été constatés lorsque la quantification par la méthode normalisée n'a pu être effectuée qu'après une étape de décontamination de l'échantillon.

2.4. Recherche négative à la fois par ensemencement et PCR *L. pneumophila*, mais positive en PCR *Legionella spp* : 22/98 prélèvements.

Afin de déterminer, si la dissociation entre la PCR *Legionella spp* et la PCR *L. pneumophila* pouvait correspondre à la présence d'une *Legionella non-pneumophila* dans les prélèvements, nous avons dû déterminer si la différence entre les deux PCR était significative.

Nous avons dû considérer :

- qu'un résultat négatif en PCR *L. pneumophila* pouvait en fait correspondre à une quantité de *L. pneumophila*/l dans le prélèvement comprise entre 0 et 527 inclus (seuil de la PCR à 528),
- que pour de telles quantités d'ADN cible initiales, la différence entre les mesures par PCR *Legionella spp* et par PCR *L. pneumophila* pouvait correspondre à un facteur allant jusqu'à 8.51,
- et que par conséquent, on pouvait supposer une différence significative entre une PCR *L. pneumophila* négative et une PCR *Legionella spp* positive uniquement si le résultat de cette dernière était supérieur à $8.51 \times 527 = \underline{4485}$ bactéries/l .

Ainsi, nous avons constaté que pour 2 prélèvements sur 22, la valeur mesurée par PCR *Legionella spp* était supérieure à 4485 *Legionella spp*/l PCR :

- prélèvement BA 0330 5123 : 52 000 *Legionella spp*/l
- prélèvement BA 0323 4156 : 13 147 *Legionella spp*/l

Ces deux prélèvements contenaient donc, une ou plusieurs espèces de *Legionella non-pneumophila* qui n'avaient pas été détectées par la culture.

Pour les 20 autres prélèvements, les mesures obtenues par PCR *Legionella spp* étaient inférieures à 4485 bactéries/l. Deux hypothèses restaient possibles pour expliquer la dissociation entre la PCR *Legionella spp* positive et la PCR *L. pneumophila* négative :

- soit la présence d'une ou plusieurs *Legionella non-pneumophila* dans les prélèvements,
- soit la présence de *L. pneumophila* en quantité faible, uniquement détectée par PCR *Legionella spp* qui a un seuil de sensibilité plus bas que la PCR *L. pneumophila*.

La PCR *Legionella spp* a permis de révéler la présence d'espèces de *Legionella* qui ne se développaient pas sur les milieux de culture.

Etant donné que la PCR *Legionella spp* était plus sensible que la PCR *L. pneumophila*, elle pouvait permettre de détecter des quantités plus faibles de *L. pneumophila*.

2.5. Recherche positive en *Legionella taurinensis* par ensemencement et positive en PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila* : 1/98 prélèvement.

Tableau XXXIII : résultat détaillé du prélèvement d'eau positif en *L. taurinensis* par ensemencement et positif en PCR *Legionella spp* et *L. pneumophila*

N° du prélèvement	Résultat de la méthode normalisée	Résultat de la PCR <i>Legionella spp</i> (<i>Legionella spp</i> /l)	Résultat de la PCR <i>Legionella pneumophila</i> (<i>L. pneumophila</i> /l)
BA 0316 4151	350 <i>Legionella taurinensis</i> /l	2748	1745

Etant donné la positivité de la PCR *L. pneumophila* alors qu'une espèce de *Legionella non-pneumophila* uniquement avait été détectée par les ensemencements, nous avons dans un premier temps suspecté une réaction croisée de la PCR *L. pneumophila*.

Nous avons alors récupéré la souche de *L. taurinensis* à partir des ensemencements, et extrait son ADN que nous avons analysé par les deux techniques de PCR : une amplification a été obtenue avec la PCR *Legionella spp* mais pas avec la PCR *L. pneumophila*. Nous n'étions donc pas dans le cas d'un problème de réaction croisée, mais il y avait effectivement dans le prélèvement deux espèces différentes de *Legionella* dont *L. pneumophila* qui n'avait pas été détectée par la culture.

2.6. Corrélation globale entre les résultats des PCR et ceux de la méthode normalisée pour l'ensemble des prélèvements :

Tableau XXXIV : corrélation entre les résultats de la PCR *Legionella spp* et ceux de la méthode normalisée pour la recherche et le dénombrement de *Legionella spp*

Méthode normalisée (UFC/l)		PCR (Copies/l)					Total prélèvements
		Négatif N<50	50≤N<400	400≤N<4000	4000≤N<4×10 ⁴	4×10 ⁴ ≤N<4×10 ⁵	
N<500	Négatif	16	0	0	0	0	16
	Positif faible	13	1	0	1 ^(a)	0	15
	N<500 numérique	5	2	0	0	0	7
500≤N<1600		16	10	2	0	0	28
1600≤N<1.6×10 ⁴		5	7	11	1	0	24
1.6×10 ⁴ ≤N<1.6×10 ⁵		1 ^(b)	0	2	4	0	7
1.6×10 ⁵ ≤N<1.6×10 ⁶		1 ^(c)	0	0	0	1	2
<i>Total prélèvements</i>		<i>57</i>	<i>20</i>	<i>15</i>	<i>6</i>	<i>1</i>	<i>99</i>

Ce tableau nous montre notamment que sur les 57 prélèvements négatifs en culture :

- 16 étaient également négatifs en PCR *Legionella spp*
- 13 étaient mesurés positifs faibles en PCR *Legionella spp*
- 5 étaient quantifiés à moins de 500 *Legionella spp/l*
- 16 étaient quantifiés entre 500 et 1600 *Legionella spp/l*

Soit : 34 prélèvements (60 %) mesurés inférieurs à 500 *Legionella spp/l* par PCR

50 prélèvements (88 %) mesurés inférieurs à 1600 *Legionella spp/l* par PCR

Nous avons également observé une bonne correspondance entre les deux techniques de quantification pour les autres mesures, les résultats les plus discordants ont tous été expliqués :

(a) = présence d'inhibiteurs de PCR

(b) et (c) = prélèvements issus de tours aérorefrigérantes, pour lesquels les géloses ensemencées avant traitement de décontamination étaient contaminées par d'autres bactéries

Tableau XXXV : corrélation entre les résultats de la PCR *L. pneumophila* et ceux de la méthode normalisée pour la recherche et le dénombrement de *L. pneumophila*

Méthode normalisée (UFC/l)		N < 10 ³		10 ³ ≤ N < 10 ⁴	10 ⁴ ≤ N < 10 ⁵	N > 10 ⁵	Total prélèvements
		Négatif N < 50	50 ≤ N < 10 ³				
PCR (Copies/l)	N < 7 × 10 ³						
	Négatif	38	0	0	0	0	38
	Positif faible	8	6	0	0	0	14
	R < 7 × 10 ³ numérique	10	18	4	1 ^(a)	0	33
	7 × 10 ³ ≤ N < 7 × 10 ⁴	1 ^(b)	2	7	2	0	12
	7 × 10 ⁴ ≤ N < 7 × 10 ⁵	0	0	0	0	1	1
N > 7 × 10 ⁵	1 ^(c)	0	0	0	0	1	
Total prélèvements		58	26	11	3	1	99

Nous avons observé que pour 58 prélèvements négatifs en culture pour la recherche de *L. pneumophila* :

- 36 prélèvements (65.5 %) étaient également négatifs en PCR *L. pneumophila*
- 8 étaient mesurés positifs faibles en PCR *L. pneumophila*

Soit : 44 prélèvements (76 %) mesurés négatifs ou positifs faibles non quantifiables par PCR *L. pneumophila*

Les résultats les plus discordants ont été expliqués :

(a) = présence d'inhibiteurs de PCR

(b) et (c) = prélèvements de tours aéroréfrigérantes, pour lesquels les géloses ensemencées avant traitement de décontamination étaient contaminées par d'autres bactéries

Discussion

Intérêt du suivi de la contamination des environnements aquatiques artificiels par les *Legionella spp*

Les environnements aquatiques artificiels colonisés par les *Legionella spp*, constituent la principale source de contamination à l'origine des cas de légionellose. La recherche et le dénombrement des *Legionella spp* au sein des installations à risque, est un des outils de prévention de cette maladie. Cette stratégie demeure cependant débattue (12,20,35,137,138). Aussi, avant d'aborder la comparaison des techniques de recherche et de dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau, il est important de déterminer l'intérêt d'une telle analyse.

Eléments en défaveur du dénombrement des légionelles dans les eaux et de l'établissement de seuils :

La recherche et la quantification des légionelles dans les eaux ne permet pas d'évaluer précisément l'exposition:

- Ce sont les légionelles présentes dans les aérosols qui peuvent être potentiellement nocives, et non directement celles qui sont présentes dans l'eau des installations. Il serait plus juste de caractériser les aérosols et de déterminer la concentration en *Legionella spp* à ce niveau. Cependant de telles investigations sont techniquement difficiles à réaliser.
- La relation entre la dose inhalée et la concentration dans les milieux est mal connue. Elle dépend de la physiologie de la personne exposée, de la durée de l'exposition, de la distance par rapport à la source de contamination et des caractéristiques physiques de l'aérosol généré.
- La technique actuelle de recherche et de dénombrement des légionelles dans les eaux est sujette à de nombreuses variations :
 - fluctuation des concentrations en *Legionella spp* dans le temps, même en l'absence d'intervention sur l'installation,
 - pour une même installation, les concentrations en *Legionella spp* peuvent être différentes en fonction du site de prélèvement des échantillons d'eau (66),
 - pour un même point de prélèvement, la quantité de *Legionella spp* retrouvée, peut varier en fonction de la période d'échantillonnage (matin, milieu de journée) et du type de

prélèvement réalisé (écouvillonnage de biofilm, 1^{er} jet d'eau, ou eau prélevée après écoulement),

- pour un même prélèvement d'eau, des écarts importants de résultats peuvent être observés entre les laboratoires (35).
- La technique actuelle de recherche et de dénombrement des *Legionella spp* dans les eaux ne permet pas de mettre en évidence toutes les *Legionella spp* viables. D'autre part, cette méthode ne semble pas pouvoir être valablement utilisée pour l'analyse des eaux fortement contaminées par d'autres bactéries.

Difficulté d'établir des seuils sanitaires en l'absence d'une relation dose/réponse clairement établie :

- La dose nécessaire pour provoquer une infection n'est pas connue chez l'homme. Chez l'animal, la dose létale 50 a été évaluée à 1.4×10^5 bactéries viables par aérosolisation (35).
- Le déclenchement d'une infection dépend de la pathogénicité de la souche et de l'état physiopathologique de la personne exposée.
- La pathogénicité des souches est difficile à évaluer. On ne connaît pas actuellement les gènes de virulence spécifiquement associés aux souches de *Legionella* infectant l'homme, ni la régulation de leur expression ou des marqueurs phénotypiques de leur pathogénicité. On a ainsi pu être confronté à des situations d'exposition persistante en milieu hospitalier, sans qu'il n'y ait jamais eu d'apparition de cas, alors que le même séro groupe s'avérait pathogène ailleurs.
- Dans la majorité des cas survenus au sein d'hôpitaux, des taux de *Legionella spp* de plus de 10^3 UFC/l d'eau ont été mis en évidence. Cependant dans certaines situations, des légionelloses ont été contractées en deçà de 10^3 UFC/l. Ainsi, la responsabilité des législateurs pourrait éventuellement être engagée si des épidémies se déclarent en dessous des seuils de qualité de 10^3 UFC/l (35).

La relation entre le degré de colonisation des installations et le risque de légionellose demeure indéfini :

Les *Legionella spp* ont fréquemment été isolées des systèmes de distribution d'eau dans les hôpitaux sans qu'elles ne soient associées à la survenue de cas (137-139). Les données sont

actuellement insuffisantes pour relier directement le nombre d'UFC dans les environnements aquatiques artificiels au risque d'acquisition de légionellose (138).

Éléments en faveur du dénombrement des légionelles dans les eaux et de l'établissement de seuils :

Éléments en faveur de la recherche des *Legionella spp* dans l'eau :

- Aucun cas de légionellose nosocomiale ne s'est produit en l'absence de *Legionella spp* dans les installations potentiellement contaminantes (26). La présence de *Legionella spp* dans les environnements aquatiques artificiels a fréquemment été associée à la survenue de cas de légionellose (25).
- Les analyses sont indispensables comme outil pour la gestion des risques et justifier une action correctrice.

Éléments en faveur de l'établissement de seuils dans les eaux :

- La concentration de 10^3 UFC/l d'eau, correspond à une valeur au delà de laquelle la plupart des épidémies ont été décrites (35).
- Les données scientifiques actuelles ne permettent pas de fixer un seuil de référence. Cependant, une valeur de référence, point de départ d'une action, est néanmoins nécessaire pour la gestion du risque.
- Dans la plupart des situations, avec un entretien efficace, il est possible de maintenir des concentrations en *Legionella spp*, inférieures à 10^3 UFC/l.

Éléments en faveur de la recherche et de la quantification par mise en culture des prélèvements :

- Pour l'instant, aucun autre indicateur de l'état de contamination des réseaux n'existe. Malgré toutes les incertitudes relatives à l'analyse et à l'échantillonnage, cela reste un indicateur intéressant.

Les différentes attitudes adoptées :

Dans l'ensemble des pays, il est considéré que la présence des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques artificiels est un important facteur de risque d'émergence de cas de légionellose. Il est donc justifié d'établir des normes pour limiter la colonisation des installations potentiellement contaminantes et d'imposer une maintenance et un entretien régulier de ces structures.

En prévention primaire, la France, la Suisse et le Japon considèrent que le suivi de la contamination par les *Legionella spp*, constitue un bon outil pour contrôler, justifier et le cas échéant renforcer les procédures d'entretien et de maintenance des installations à risque(35). Aux Etats-Unis, étant donné l'insuffisance de consensus sur la manière d'interpréter les résultats, le CDC ne recommande pas de réaliser des recherches systématiques de *Legionella spp* dans les environnements aquatiques. Parce que les *Legionella spp* sont ubiquitaires, le CDC considère qu'il n'est pas pertinent de prendre des mesures correctrices dès que ces bactéries sont détectées dans les réseaux de distribution d'eau. Par ailleurs, les résultats des analyses peuvent être faussement considérés comme sécuritaires. Il est plus important de mettre en œuvre un entretien constant de bon niveau (140). En ce qui concerne les mesures de contrôle dans les hôpitaux en l'absence de cas identifiés, le CDC propose deux stratégies (138) :

- La première approche est basée sur la surveillance de la contamination des installations. Lorsque plus de 30 % des prélèvements sont contaminés, alors des mesures de décontamination sont entreprises et les cliniciens sont invités à mettre en place une surveillance active des cas de légionellose.
- La seconde approche est basée sur la recherche systématique de cas de légionellose pour toute pneumopathie nosocomiale. Les investigations environnementales ne sont alors effectuées qu'en prévention secondaire.

En Angleterre, les recommandations concernent les règles de conception, d'entretien, de maintien de la température et de suivi de ces opérations. Aucune valeur repère en terme de concentration en légionelles n'est citée. Les analyses de légionelles ne sont pas explicitement conseillées (35).

Quel que soit le pays, la recherche des *Legionella spp* dans les installations à risque, est essentielle pour déterminer la source d'une contamination lorsque des cas de légionellose sont observés.

La position des pays qui ne préconisent pas systématiquement la recherche des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques artificiels en prévention primaire, est en partie liée au

manque de sensibilité et à la variabilité de la recherche par mise en culture (114). Ceci peut aboutir à des résultats difficiles à interpréter et parfois faussement sécuritaires. L'apport d'une technique permettant de mettre en évidence l'ensemble des *Legionella spp* viables pourrait entraîner un réexamen de ces positions (140).

Méthode de recherche et de dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau par PCR quantitative en temps réel

Face aux insuffisances de la culture, d'autres méthodes ont été développées. Des techniques d'immunofluorescence directe ont été utilisées pour rechercher *L. pneumophila* dans les environnements aquatiques (28,130). Cependant un manque de spécificité a été observé et la quantification est délicate. La chromatographie en phase gazeuse a aussi été employée pour détecter *L. pneumophila* dans les biofilms, mais son application s'est révélée coûteuse et complexe (50). Des méthodes de cytométrie de flux après marquage immunologique ou moléculaire sont à l'étude et auraient une sensibilité supérieure à la culture, cependant leur spécificité n'est pas encore bien évaluée (35). Actuellement, les méthodes de biologie moléculaire semblent les plus intéressantes.

Application de la PCR à la recherche et au dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau :

De nombreuses techniques par amplification génique ont été développées pour détecter les légionelles, que ce soit à partir de prélèvements cliniques (104-108) ou de prélèvements environnementaux (120,125-129,131-136).

L'amplification de séquences du gène de l'ARN ribosomal 5S (104,127,128,131-133) ou du gène de l'ARN ribosomal 16S (105,107,108,120,134,135) est décrite comme très spécifique du genre *Legionella*. Des méthodes spécifiques de l'espèce *L. pneumophila* ont été développées et ont pour cible le gène du "macrophage infectivity potentiator" (104,106,120,125-129,131,133,136).

Les premières techniques utilisées ne permettaient qu'une détection qualitative (131,132,134,135) ou semi-quantitative (126-129,133). Depuis l'avènement des techniques de PCR quantitative, seulement trois études ont évalué leur application au dénombrement des légionelles dans l'eau (120,125,136).

La PCR quantitative en temps réel LightCycler® présente deux avantages principaux. L'amplification ainsi que la détection des produits formés peuvent être réalisées en moins d'une heure. Les amplicons ne sont pas manipulés en fin de PCR puisque leur identification s'effectue en temps réel, à chaque cycle, en « tube fermé ». Le risque de contamination croisée entre les PCR est donc considérablement réduit.

La plupart des stratégies de quantification par PCR, sont basées sur la réalisation d'une droite d'étalonnage à partir d'un standard homologue externe. En virologie, les standards externes les plus employés sont constitués par une solution titrée de plasmides contenant la séquence d'intérêt, ou par une solution titrée réalisée à partir des produits de la PCR (141). En bactériologie, le standard externe est le plus souvent constitué d'ADN extrait directement à partir de colonies de la bactérie concernée (142-147).

L'exactitude des stratégies de quantification dépend de la précision du titre des standards employés. La difficulté majeure d'une quantification « absolue » réside dans la préparation d'un standard dont la concentration en cibles d'intérêt est exactement connue. Cette concentration est en général mesurée par dosage spectrophotométrique ultra-violet à 260 nm (120,136,144,145,148,149). Cette méthode ne donne en fait qu'une valeur approximative et très souvent surestimée de la quantité de gène cible amplifiable (141). Pour les bactéries se développant sur milieu gélosé, il est possible de quantifier ces bactéries à partir d'une suspension bactérienne par la technique des UFC. Cette suspension pourra alors être utilisée pour la préparation du standard externe, dont le titre en ADN cible sera déduit du résultat des UFC (125,142-144,147). Cette méthode a généralement tendance à sous-estimer le nombre réel de copies de génome bactérien. En effet, les UFC ne permettent pas de détecter l'ensemble des bactéries présentes dans la suspension initiale, en particulier les bactéries non viables ou viables mais non cultivables. Pour réaliser notre standard externe, nous avons choisi d'extraire l'ADN à partir d'une suspension de *L. pneumophila* (ATCC 33152), et de réaliser le titrage à partir des résultats des UFC. Afin de vérifier si notre démarche ne sous-estimait pas trop le nombre de copies de génome de *L. pneumophila*, nous avons mesuré la concentration en ADN dans la solution d'extrait, par spectrophotométrie. Le titre obtenu à partir des UFC était de 2.7×10^7 copies de génome/ μ l et celui obtenu par spectrophotométrie de 6.8×10^7 copies de génome/ μ l. Etant donné le faible écart entre les deux techniques, nous avons donc adopté la méthode de titrage à partir des UFC.

Limite de détection des techniques de PCR :

Pour les deux types de PCR, les limites de détection observées sont proches de 1 copie de gène cible à amplifier pour 5 µl de prise d'essai. Elles correspondent aux performances décrites dans la littérature pour ce type de PCR (125,142,143,145-147) et aux limites connues de la technologie LightCycler® (125). Ces résultats se traduisent pour la PCR *Legionella spp* par une limite de détection de moins de 1 copie de génome de *Legionella spp*/5µl de prise d'essai. En effet le gène de l'ARN ribosomal 16S est exprimé plusieurs fois dans le génome des *Legionella spp*. Il n'en est pas de même pour le gène du « macrophage infectivity potentiator », de ce fait la PCR *Legionella spp* est plus sensible que la PCR *L. pneumophila*.

Seuils de positivité :

Il est classiquement observé que pour de telles valeurs de limite de détection, la PCR n'est plus reproductible et n'est plus positive dans 100 % des essais (125). Nous avons alors établi la notion de seuil de positivité, qui correspond à la plus petite quantité d'ADN cible pour laquelle la PCR est positive à chaque essai. Ce seuil de positivité nous a permis de caractériser les amplifications négatives. En effet, face à une PCR négative, nous pouvons affirmer que la quantité d'ADN cible est inférieure à la limite de détection, uniquement si plusieurs essais successifs sont réalisés et constatés négatifs. Par contre en cas de PCR négative, nous pouvons affirmer que la quantité d'ADN cible est inférieure au seuil de positivité. Nous perdons en précision, mais cela évite de multiplier les essais. Les seuils de positivité observés étaient de 1 et 2.64 copies de génome bactérien/5 µl de prise d'essai respectivement pour la PCR *Legionella spp* et la PCR *L. pneumophila*. Ce qui correspond à des seuils de respectivement 200 *Legionella spp* et 528 *L. pneumophila* par litre d'eau filtrée.

La PCR peut-elle permettre d'éviter de concentrer les échantillon ?

Les limitations techniques de l'étape d'extraction (volume extrait) et de la PCR (volume de la prise d'essai), nous permettent de comprendre que l'étape de concentration des échantillons par filtration est nécessaire. En effet, si la PCR était réalisée directement à partir des prélèvements, les seuils de positivité seraient respectivement pour les deux techniques de PCR de 4×10^4 *Legionella spp*/l et 1.1×10^5 *L. pneumophila*/l, ce qui est bien trop élevé pour être acceptable.

Reproductibilité de la quantification:

Nous avons constaté une bonne reproductibilité intra et inter-essai de la quantification par PCR pour une gamme de concentration de 10 à 1×10^7 copies de génome bactérien/ $5 \mu\text{l}$ de prise d'essai. Soit 2000 à 2×10^9 légionelles par litre d'eau filtrée. A des concentrations inférieures, nous avons encore jugé la quantification acceptable jusqu'à respectivement 2.27 et 5 copies de génome bactérien/ $5 \mu\text{l}$ de prise d'essai pour la PCR *Legionella spp* et la PCR *L. pneumophila*, soit 454 et 1000 légionelles par litre d'eau filtrée. Pour de telles valeurs, la variabilité sur deux mesures successives d'une même quantité d'ADN cible pouvait atteindre un facteur allant de 0.3 à 3.7 pour la PCR *Legionella spp* et de 0.4 à 2.5 pour la PCR *Legionella pneumophila*. Pour de plus faibles concentrations en légionelles dans l'échantillon initial, la variabilité pouvait atteindre plus d'un logarithme, la quantification n'était alors plus fiable. C'est pourquoi nous avons choisi de ne plus prendre en compte les résultats de quantification lorsque le « crossing point » excédait 37.9 cycles pour la PCR *Legionella spp* et 38.2 cycles pour la PCR *L. pneumophila*. Les résultats ont alors été considérés comme positifs faibles non quantifiables.

Lorsque la quantité d'ADN cible initiale diminue, la quantification par PCR *Legionella spp* est la technique qui reste la plus longtemps reproductible. De ce fait, lorsqu'il n'est pas observé de différence significative entre les deux techniques de quantification par PCR, il est plus aisé de traiter les résultats obtenus par PCR *Legionella spp*. Ils sont en effet plus précis pour les faibles concentrations en ADN cible.

Droite d'étalonnage :

Nous avons réalisé une droite d'étalonnage à partir de 5 dilutions d'une solution titrée en ADN de *L. pneumophila*. Les points de gamme ont été choisis afin de couvrir une large gamme de concentration en ADN cible, de 1×10^7 à 10 copies de génome bactérien/ $5 \mu\text{l}$ de prise d'essai, tout en restant dans une zone où les résultats des PCR ont une bonne reproductibilité intra et inter-essai. Les droites d'étalonnage ainsi obtenues ont présenté une parfaite linéarité puisque le coefficient de régression linéaire était de 1 pour chacune des PCR. Des résultats similaires avaient précédemment été obtenus par Wellinghausen et coll (120) pour la PCR *Legionella spp*. Les données concernant la PCR *L. pneumophila* n'avaient pas été publiées. La très bonne reproductibilité inter-essai des paramètres de ces droites d'étalonnage nous a permis de valider la stratégie de quantification avec ce standard externe.

Efficacité d'amplification :

L'efficacité d'amplification (E) est définie comme la proportion moyenne de molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque amplification. Elle peut être comprise entre 1 (aucune amplification ne se produit) et 2 (après chaque cycle de PCR, chaque molécule d'ADN cible a généré deux amplicons). Dans les conditions expérimentales habituelles, E est inférieure à 2 et varie de 1.78 à 1.97 selon le gène amplifié (141). Nous avons obtenu une efficacité d'amplification proche de 1.91 pour chacune des PCR. Nos techniques présentent donc un bon rendement, ce qui explique leur limite de détection basse. Ces résultats sont en accord avec ceux qui avaient été obtenus par Wellinghausen et coll pour la PCR *Legionella spp* (120).

Sensibilité et spécificité :

La PCR est une technique classiquement décrite comme très sensible et spécifique. L'utilisation de sondes d'hybridation reconnaissant une séquence du fragment amplifié, permet encore d'augmenter la spécificité des techniques. En ce qui concerne la PCR *L. pneumophila* et la PCR *Legionella spp*, des spécificités et des sensibilités de 100 %, ont été observées à de nombreuses reprises (120,125,129,134,135,150). Ceci correspond à nos résultats, puisque nous n'avons pas observé de faux positifs ni de faux négatifs pour l'ensemble des souches que nous avons évaluées.

Délai d'obtention des résultats :

La recherche et le dénombrement par PCR des *Legionella spp* dans l'eau permet de réduire de façon très significative le délai d'obtention des résultats. Avec la méthode normalisée, un délai moyen de 6 jours (isolement et identification) est nécessaire pour une recherche positive, et un résultat négatif ne peut être rendu qu'après 10 jours. La PCR permet d'obtenir un résultat dans la journée. En effet, l'ensemble des étapes d'extraction de l'ADN, de préparation de la PCR et d'amplification nécessitent environ 4h.

Temps de manipulation :

L'analyse par PCR des échantillons après concentration, permet de supprimer les étapes de décontamination, d'ensemencement et de lecture des cultures à 3, 7 et 10 jours. En contrepartie, des étapes d'extraction de l'ADN et de préparation de la PCR sont nécessaires. De ce fait, l'utilisation de la PCR ne permet pas de diminuer le temps de manipulation si ces étapes sont réalisées manuellement. Cependant ces deux étapes sont entièrement automatisables (151). Ceci peut permettre de réduire le temps de manipulation à partir des échantillons concentrés à une demi-heure, et de travailler sur des séries d'échantillons. La capacité maximale du LightCycler® est de 32 capillaires, 12 capillaires sont en permanence utilisés pour le témoin négatif et les 5 points de gamme de chacun des deux types d'amplification (*L. pneumophila* et *Legionella spp*), des séries de 10 échantillons peuvent donc être analysées à chaque PCR.

Résultats de quantification

Perte de viabilité des légionelles au décours des étapes de la méthode normalisée :

L'analyse d'eaux artificiellement chargées en *L. pneumophila*, nous a permis d'apprécier le phénomène de perte de viabilité lié aux étapes de filtration et de décontamination de la méthode normalisée.

Etape de filtration :

Lors d'une étape de filtration, deux phénomènes sont décrits (114-116). D'une part, des bactéries restent piégées dans les pores des filtres. D'autre part, des bactéries sont endommagées par le processus de filtration et perdent leur viabilité. La technique de dénombrement par les UFC est sensible à ces deux phénomènes. La quantification par PCR n'est affectée que par la perte physique des bactéries et va détecter les bactéries endommagées. Sur des eaux artificiellement chargées, nous avons observé que la quantification après filtration était effectivement plus faible que celle réalisée avant cette étape. Cependant, la différence était moindre lorsque le dénombrement était effectué par PCR. Les méthodes de PCR quantitative sont donc moins sensibles à la perte de bactéries lors de la filtration.

Etapas de décontamination :

Les traitements de décontamination des échantillons peuvent entraîner une perte de viabilité des *Legionella spp.* Sur des eaux artificiellement chargées, nous avons observé une diminution de la quantification par la méthode normalisée, de 0.7 à 1.5 logarithmes après traitement par la chaleur et de plus de 8 logarithmes après traitement par l'acidité. La perte de viabilité ainsi observée, correspond aux données de la littérature en ce qui concerne le traitement thermique (122). Pour le traitement par l'acidité, une telle inhibition n'a jamais été rapportée. Cependant la manipulation a été effectuée plusieurs fois, en respectant scrupuleusement le protocole de la méthode normalisée, et le même type de résultat a de nouveau été obtenu. Nous savons que la sensibilité aux traitements de décontamination est variable en fonction des espèces et des souches de *Legionella spp* (118). Le phénomène que nous avons observé peut être lié à une sensibilité particulière de notre souche aux pH acides. Lorsque le dénombrement des *Legionella spp* ne peut s'effectuer qu'après un pré-traitement de décontamination, il y a un risque de sous-estimation de la quantité réelle de *Legionella spp*, voire même de résultats faussement négatifs.

Nous avons observé que les techniques de quantification par PCR n'étaient pas influencées par la présence d'une quantité importante d'ADN d'autres espèces bactériennes. Elles permettent donc de s'affranchir des étapes de décontamination et d'obtenir un dénombrement plus proche de la quantité réelle de *Legionella spp* que les méthodes par mise en culture.

Les résultats de quantification obtenus par PCR sont en moyenne plus élevés que ceux obtenus par la méthode normalisée :

Les résultats de quantification obtenus par PCR sont globalement plus élevés que ceux obtenus par les techniques de mise en culture. Plusieurs phénomènes combinés permettent d'expliquer cet écart :

- la PCR détecte les *Legionella spp* non viables, les *Legionella spp* viables mais non cultivables et les bactéries endommagées lors de l'étape de concentration des échantillons,
- les résultats de la culture peuvent être sous-estimés secondairement à une éventuelle étape de décontamination,

- la présence de *Legionella spp* intra-amibiennes peut conduire à une sous-estimation de la quantification par les UFC. En effet plusieurs dizaines de *Legionella spp* concentrées dans une seule amibe, ne se traduisent que par une seule colonie après ensemencement.

Corrélation entre les analyses par PCR et la méthode normalisée :

Globalement on peut considérer que par rapport à la culture les résultats obtenus par PCR sont plus proches de la quantité réelle de *Legionella spp* présentes dans un échantillon.

Eaux artificiellement chargées :

Sur ces échantillons, la différence entre les deux techniques est uniquement expliquée par le fait que les UFC ne permettent pas de détecter l'ensemble des bactéries présentes dans la suspension initiale, en particulier les bactéries non viables. C'est pourquoi l'écart entre les deux techniques est faible et que la quantification par PCR n'est en moyenne que deux fois plus élevée. Pour ces échantillons, nous avons également observé une très bonne corrélation entre les deux méthodes de quantification. Ceci est expliqué par le fait que pour une même expérience, la proportion de bactéries non détectées par les UFC était constante. En effet, nous travaillions à partir d'une même suspension initiale qui était diluée par la suite.

Prélèvements provenant de réseaux d'eau chaude ou de tours aérorefrigérantes :

La différence entre les deux techniques de quantification était plus importante. En effet, tous les facteurs pouvant être à l'origine d'une sous-estimation de la quantification par les UFC, pouvaient être présents. De plus l'influence de chacun de ces facteurs pouvait être très variable en fonction de l'origine de l'eau. Ceci explique que sur l'ensemble de ces prélèvements, une corrélation par régression linéaire n'a pas été possible entre les deux techniques.

Malgré tout, nous avons observé dans la majorité des cas, une relation entre les valeurs basses, intermédiaires et hautes de la PCR et les valeurs basses, intermédiaires et hautes obtenues par la méthode normalisée. Les plus grandes discordances entre les deux techniques ont été observées lorsque la quantification par la méthode normalisée n'a pu être réalisée qu'après une étape de décontamination des échantillons. Ceci correspond probablement à une

sous-estimation de la technique par ensemencement, liée à une perte de viabilité des *Legionella spp.*

Nous avons pu constater que la quantification par PCR sur des eaux filtrées était plus sensible que la méthode normalisée, et ce malgré un seuil de positivité plus élevé. Ce phénomène est expliqué par le fait que la PCR détecte plus de bactéries que la culture. De ce fait, nous n'avons pas observé de recherches par PCR négatives alors que la culture était positive. Au contraire, la PCR a permis de détecter des eaux contaminées par des légionelles alors que les cultures étaient négatives. Dans 89 % de ces cas, les résultats de quantification par PCR correspondaient à des valeurs basses de la technique, sinon il s'agissait d'eaux qui avaient nécessité un traitement de décontamination pour le dénombrement par la méthode normalisée. La quantification par PCR *Legionella spp* a un seuil de positivité plus bas que la PCR *L. pneumophila*. De ce fait la PCR *Legionella spp* permet de détecter des concentrations plus faibles que la PCR *L. pneumophila*.

La contamination des installations à risque par des *Legionella spp* a été associée à la survenue de cas de légionellose. Cependant, la relation entre la quantité de *Legionella spp* retrouvée et le risque de contamination, demeure imprécise (120). La PCR permet de dénombrer de façon plus précise et plus sensible l'ensemble des *Legionella spp* viables dans les prélèvements d'eau. De ce fait, elle pourrait constituer un outil plus performant que la culture pour établir une relation entre le risque de légionellose et le degré de contamination des installations à risque.

Seuils d'intervention et d'alerte:

Différents seuils d'intervention et d'alerte ont été établis en fonction des résultats de la méthode normalisée de recherche et de quantification des *Legionella spp* dans l'eau. L'utilisation de la PCR dans le cadre de la surveillance des installations à risque, nécessiterait une réévaluation de ces seuils.

Nous avons considéré les deux principaux seuils de la méthode normalisée :

- Recherche négative (< 50 UFC/l), qui correspond au niveau cible à atteindre dans les secteurs de structures hospitalières accueillant des patients à « haut risque », et pour les eaux minérales utilisées pour les soins,
- quantification < 10³ UFC/l, qui correspond au niveau cible pour les autres installations.

En fonction des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons proposer les seuils correspondants pour la PCR *L. pneumophila*.

Tableau XXXVI: correspondance entre les seuils de la méthode normalisée et ceux de la quantification par PCR

Méthode normalisée	PCR
Négatif (<50 UFC/l)	PCR <i>L. pneumophila</i> négative ou Résultat positif faible non quantifiable en PCR <i>L. pneumophila</i>
$\geq 10^3$ UFC/l	$\geq 7 \times 10^3$ équivalents de copies de génome/l par PCR <i>L. pneumophila</i>

Nous avons fait correspondre au seuil de 10^3 UFC/l de la méthode normalisée, un seuil de 7×10^3 équivalents de copies de génome/l en PCR *L. pneumophila*/l. Nous avons considéré que la quantification par PCR était en moyenne 7 fois plus élevée que celle effectuée par culture, en ne tenant compte que des prélèvements ne nécessitant pas de décontamination.

En appliquant ces seuils à l'ensemble des 99 prélèvements analysés, nous avons alors comparé les niveaux de risque établis selon les normes fixées pour la méthode normalisée aux niveaux de risque qui auraient été établis en utilisant la quantification par PCR (tableau XXXVII).

Tableau XXXVII : correspondance entre les résultats de la méthode normalisée et ceux de la PCR *L. pneumophila*

Résultats méthode normalisée \ Résultats PCR <i>L. pneumophila</i>	Négatif (<50 UFC/l)	$50 \leq N < 10^3$	$N \geq 10^3$	Total des prélèvements
Négatif	38	0	0	38
Positif faible	8	6	0	14
Positif quantifiable $N < 7 \times 10^3$	10	18	5	33
$N \geq 7 \times 10^3$	2	2	10	14
Total des prélèvements	58	26	15	99

- Nous avons obtenu une concordance entre les niveaux de risque pour 74 prélèvements (75 %).

- Pour 11 prélèvements (11 %), le niveau de risque établi par la quantification par PCR était inférieur au niveau de risque établi par la méthode normalisée. Nous avons observé pour ces 11 analyses par PCR :
 - ↳ un problème évident d'inhibiteurs de la Taq polymérase pour 1 prélèvement,
 - ↳ un rapport entre la quantification par PCR et la quantification par la méthode normalisée compris entre 0.56 et 2.25 pour 4 autres prélèvements. Ce qui pouvait éventuellement faire suspecter un problème d'inhibiteurs de la Taq polymérase,
 - ↳ trois prélèvements quantifiés positifs faibles par PCR *L. pneumophila* et quantifiés par la méthode normalisée à 50 UFC/l. Soit une colonie de *L. pneumophila* dénombrée sur une gélose, ce qui signifie que statistiquement le résultat obtenu par les UFC aurait très bien pu être négatif.
 - ↳ trois prélèvements quantifiés positifs faibles par PCR *L. pneumophila* et quantifiés par la méthode normalisée à 100 et 150 UFC/l. Les rapports entre les deux méthodes n'ont pu être strictement établis, puisque le résultat de la PCR n'était pas quantifiable. La présence d'un phénomène d'inhibition peut être supposée pour expliquer la différence entre les deux techniques.

- Pour 14 prélèvements (14%) le niveau de risque établi par la quantification par PCR était supérieur au niveau de risque établi par la méthode normalisée :
 - ↳ six de ces échantillons avaient nécessité une étape de décontamination pour le dénombrement par la méthode normalisée.

Les seuils que nous avons proposés pour la technique de dénombrement par PCR sont acceptables, à condition de pouvoir mettre en évidence la présence éventuelle d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les échantillons. En effet, lorsque la quantification par PCR a sous-estimé le niveau de risque, il s'agissait de prélèvements pour lesquels la présence d'un phénomène d'inhibition était suspectée. L'utilisation de la PCR et l'interprétation des résultats en fonction des seuils que nous avons proposés a permis d'établir dans 14 % des cas, des niveaux de risque supérieurs à ceux qui avaient été obtenus avec la méthode normalisée. Il s'agissait notamment de prélèvements contaminés par d'autres bactéries, pour lesquels la numération par les UFC était probablement sous-estimée. En effet, une étape de pré-traitement des échantillons s'était avérée nécessaire.

Détection des *Legionella non-pneumophila* :

Lorsque la différence de quantification entre la PCR *Legionella spp* et la PCR *L. pneumophila* est significative, alors la combinaison de ces deux techniques permet de mettre en évidence la présence d'espèces différentes de *L. pneumophila*. Ainsi pour trois prélèvements nous avons observé des quantités significatives de *Legionella non-pneumophila*, alors que la culture ne les avait pas détectées.

De nombreuses souches ou espèces de *Legionella spp* ne se développent pas ou difficilement sur milieu de culture gélosé. Ce phénomène est plus fréquent avec les espèces de *Legionella non-pneumophila* et constant avec les LLAPs. Bien que l'importance de ces espèces en pathologie humaine soit moindre, elles peuvent être responsables de cas de légionellose, y compris les LLAPs (152). L'incidence des infections dues à des espèces de *Legionella non-pneumophila* est probablement sous-estimée, car les moyens de diagnostic actuels ne sont pas adaptés à leur identification. La détection de quantités significatives d'espèces différentes de *L. pneumophila* dans les installations, représente un risque potentiel pour les personnes exposées. Les données scientifiques sont cependant insuffisantes pour déterminer l'impact exact de la contamination des installations par des espèces de *Legionella non-pneumophila*.

Limites de la méthode de quantification par PCR

Inhibiteurs de PCR :

Le risque de sous-évaluation ou de résultats faussement négatifs, dus à la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase, constitue un inconvénient de la PCR (120,125,129,132-136). Les composés métalliques et les composés humiques constituent les principaux inhibiteurs de PCR que l'on peut retrouver dans les environnements aquatiques (125,129,135,136,153). Ainsi, il a été décrit que la présence de quantités importantes de rouille dans les échantillons pouvait être à l'origine de faux négatifs (125,132).

Sur les 99 échantillons d'eau que nous avons testés, nous avons pu mettre en évidence un cas d'inhibition importante. Cependant, pour 10 prélèvements, nous avons obtenu un rapport entre la quantification par PCR et la quantification par les UFC, compris entre 0.7 et 3. Cette différence entre les deux techniques est relativement faible par rapport à la différence moyenne observée pour l'ensemble des échantillons que nous avons analysés. Nous pouvons nous interroger sur la présence éventuelle d'inhibiteurs dans ces prélèvements.

Les étapes de concentration des échantillons d'eau augmentent l'influence de ces inhibiteurs, et plus le volume d'eau initial est important, plus la quantité d'inhibiteurs est grande (133,134).

En fonction des techniques d'extraction et de purification de l'ADN, l'élimination de ces inhibiteurs est plus ou moins importante (129,134). L'influence des inhibiteurs de la Taq polymérase est également variable en fonction de chaque type de PCR (125,134). Quel que soit le protocole utilisé, l'interaction d'inhibiteurs de la Taq polymérase ne peut être totalement exclue et l'utilisation d'un contrôle interne d'inhibition est recommandée (120). Nous envisageons donc de développer un contrôle interne d'inhibition dont l'amplification sera mesurée simultanément avec celle de notre gène cible. Ceci pourra être réalisé par l'intermédiaire d'une PCR LightCycler® multiplexe utilisant deux canaux de détection. Cette méthode présente l'avantage d'une détection rapide du gène cible et de la présence éventuelle d'inhibiteurs, tout en conservant la sensibilité de la technique (120). Il est important de pouvoir s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de la Taq polymérase afin de valider un résultat négatif ou positif faible par PCR.

Lorsque des inhibiteurs sont identifiés, des procédés simples peuvent être utilisés pour réduire leur influence. Une dilution au 1/10 de l'ADN extrait est parfois suffisante, mais cela entraîne une diminution du seuil de positivité. L'ajout d'albumine sérique bovine à l'ADN extrait permet de minimiser le phénomène d'inhibition (125,136). Enfin, des techniques de filtration sur des micro-colonnes pouvant être centrifugées ont été utilisées avec succès. Il s'agit de procédés sur gel (Sephadex®, Sepharose®) pour séparer l'ADN des acides humiques (129,135,153), ou sur résine échangeuse d'ions pour éliminer les ions métalliques (129,135).

Détection d'ADN de bactéries non viables:

L'ADN de bactéries mortes, éventuellement présent dans l'échantillon initial, est détecté par PCR. Il existe donc une possibilité de résultat par excès, ne correspondant pas à un risque pour la santé. Cependant l'ADN se dégraderait rapidement dans une eau naturelle, son influence serait donc réduite sur la quantification (126).

Nous avons observé que sur 10 échantillons prélevés au niveau de points d'usage équipés de microfiltres terminaux, 1 seul a été retrouvé positif par PCR. Il s'agissait d'un résultat positif faible non quantifiable en PCR *Legionella spp* et en PCR *L. pneumophila*. La positivité de la PCR pour ce type de prélèvement, à priori exempt de *Legionella spp*, peut correspondre au

passage d'ADN libre au travers du filtre. Quoi qu'il en soit, il s'agit d'une quantité négligeable.

Lors de la décontamination d'une installation par choc thermique ou chloré, cette proportion d'ADN libre est susceptible d'augmenter de façon importante. Ce phénomène limite l'utilisation de la PCR pour contrôler l'efficacité d'un processus de décontamination d'une installation à risque. Etant donné que cet ADN est rapidement dégradé (126), des études pourraient être effectuées afin de déterminer les délais nécessaires entre une procédure de décontamination et un contrôle par PCR.

Nécessité d'isoler les souches bactériennes:

L'utilisation des techniques de PCR pour la recherche et le dénombrement des *Legionella spp* dans l'eau, présente trois principaux inconvénients:

- le sérogroupage de *L. pneumophila* n'est pas réalisable actuellement,
- l'identification complète des *Legionella sp* ne peut être effectuée,
- les légionelles ainsi détectées ne peuvent pas être comparées aux isolats cliniques et environnementaux dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques.

Si la PCR permet effectivement d'améliorer la précision du dénombrement des *Legionella spp* dans les environnements aquatiques, l'isolement des souches bactériennes demeure indispensable à des fins épidémiologiques. On peut discuter la nécessité de faire une mise en culture systématique ou bien de conserver une partie de l'échantillon concentré et de ne réaliser la culture qu'ultérieurement si nécessaire.

Contamination du kit d'extraction Qiagen® par de l'ADN de *Legionella spp*:

Plusieurs auteurs ont décrit que les colonnes de silice utilisées pour l'extraction de l'ADN avec les kit QIAamp® DNA mini kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France), pouvaient être contaminées par de l'ADN de *Legionella spp* (154,155). Les analyses effectuées ont permis de montrer qu'il s'agissait d'ADN d'espèces différentes de *L. pneumophila*. La préparation de ces colonnes exige de nombreux lavages avec de l'eau, ce qui est probablement à l'origine de la contamination. L'utilisation d'un pré-traitement des colonnes par de la DNAase s'est avéré inefficace pour éliminer cet ADN contaminant (154). Pour chacune de nos PCR nous avons réalisé un témoin négatif qui était extrait en même temps que nos échantillons. Nous n'avons

pas observé de tel phénomène. Cependant, étant donné le risque de résultats faussement positifs en PCR *Legionella spp*, il est recommandé d'utiliser un lot unique de colonnes pour une même extraction et de réaliser systématiquement un témoin négatif.

Perspectives

Amélioration de la sensibilité de la méthode de quantification par PCR:

Nous ne pouvons pas augmenter la sensibilité des techniques de PCR. Cependant nous pouvons encore améliorer la sensibilité de la quantification à partir des échantillons d'eau. Premièrement, le volume de suspension de reprise du filtre utilisé pour l'extraction peut être augmenté. Deuxièmement, l'ADN extrait, peut être concentré. Et troisièmement, on peut augmenter la prise d'essai de la PCR. L'extraction pourrait en effet s'effectuer à partir de 4 ml au lieu d'1 ml de la suspension de reprise du filtre. L'ADN pourrait être récupéré en fin d'extraction par 100 µl de solution d'élution au lieu de 200µl. 10 µl de cet ADN extrait pourrait être utilisé pour la PCR au lieu de 5 µl.

Ainsi les seuils de positivité pourraient être abaissés à 13 *Legionella spp* et 33 *L. pneumophila* par litre d'eau filtrée respectivement pour les deux PCR. Une bonne reproductibilité de la quantification pourrait être obtenue jusqu'à 125 légionelles par litre d'eau filtrée. Ce qui permettrait d'augmenter la précision des mesures pour les faibles concentrations en *Legionella spp* dans l'eau à analyser. Ceci serait particulièrement intéressant pour la PCR quantitative *L. pneumophila*. En effet une partie des résultats actuellement rendus positifs faibles, pourraient être quantifiés de façon précise. Ainsi la comparaison entre la PCR et la méthode normalisée serait plus aisée et cela permettrait d'établir de façon plus précise le seuil à partir duquel la quantification par PCR doit être considérée comme équivalente à un résultat négatif par les UFC.

Contrôle interne d'inhibition :

Le développement d'une technique incluant un contrôle interne d'inhibition est indispensable. En effet, la détection d'un phénomène d'inhibition est nécessaire pour interpréter un résultat négatif ou positif faible par PCR, mais également toute autre valeur, car il y a un risque de sous-quantification. De plus, la détection de tous les phénomènes d'inhibition permettrait de mieux

corréler les résultats de la PCR avec ceux de la méthode normalisée, en vue notamment de déterminer de façon plus précise des seuils d'alerte et d'intervention en fonction des résultats de la PCR

Procédé d'extraction :

Nous envisageons de tester d'autres protocoles d'extraction de l'ADN. En particulier des techniques qui nous permettraient d'automatiser cette étape, et donc de réduire de façon significative le temps de manipulation. De plus, il nous semble indispensable d'utiliser un kit d'extraction ne présentant pas le risque d'être contaminé par de l'ADN de *Legionella spp.*

Conclusion

MEMOIRE SOUTENU PAR : Pierre-Alain Falconnet

TITRE : Détection et quantification des *Legionella spp* dans l'eau par méthode de PCR en temps réel : validation par rapport à la culture.

CONCLUSIONS

La prévention de la légionellose repose notamment sur la numération des *Legionella spp* dans l'eau par une méthode normalisée (AFNOR T90-431), basée sur la culture de ces bactéries. Cette technique demeure fastidieuse, ce qui limite la fréquence des contrôles. De plus, elle peut sous évaluer le titre réel de *Legionella spp* en cas de flore bactérienne associée nécessitant une décontamination préalable des échantillons d'eau. Elle peut même être faussement négative dans le cas de souches ou espèces de *Legionella* non cultivables.

Nous avons évalué deux protocoles de PCR en temps réel permettant de quantifier l'ensemble des espèces du genre *Legionella* et plus spécifiquement l'espèce *L. pneumophila*. Nous avons observé une spécificité et une sensibilité de 100% pour ces deux types d'amplification. Sur des eaux artificiellement chargées en *L. pneumophila*, nous avons déterminé pour ces deux protocoles, des seuils de positivité de 200 et 528 équivalents de copies de génome bactérien par litre d'eau pour la PCR *Legionella spp* et pour la PCR *L. pneumophila*. La quantification s'est révélée reproductible jusqu'à 454 et 1000 équivalents de copies de génome bactérien par litre d'eau respectivement. Nous avons pu observer que les résultats obtenus par PCR étaient en moyenne deux fois plus élevés que ceux obtenus par mise en culture, et qu'il existait une relation linéaire entre les deux techniques.

En ce qui concerne la série de prélèvements d'eau provenant des analyses de routine du laboratoire, nous avons constaté une sensibilité supérieure de la PCR avec une quantification en moyenne 13.2 fois plus élevée. Le rapport entre les deux techniques était relativement hétérogène et variait de 0.7 à plus de 50. Nous avons pu constater une corrélation entre les résultats pour la plupart des prélèvements, malgré l'absence d'une relation strictement linéaire. Nous avons remarqué que les discordances majeures entre les deux techniques correspondaient à des prélèvements qui avaient nécessité une étape de décontamination pour le dénombrement par la méthode normalisée, entraînant une sous évaluation du nombre réel de *Legionella spp* par cette dernière technique.

Par rapport aux techniques par ensemencement, le dénombrement par PCR apparaît donc plus précis et plus proche de la quantité réelle de bactéries présentes dans l'échantillon. Il est en effet indépendant de l'interférence éventuelle d'une flore bactérienne contaminante et

il permet éventuellement la quantification de souches ou espèces de *Legionella spp* non cultivables. La PCR permet d'obtenir des résultats plus rapidement que les méthodes basées sur la culture. Elle est aussi plus facilement automatisable. Elle autorise donc un travail par séries, ce qui permet de multiplier les contrôles et d'améliorer la surveillance des installations à risque. L'utilisation en routine d'une méthode par PCR nécessiterait une réévaluation des seuils d'alerte et d'intervention qui avaient été définis en fonction des techniques par ensemencement. L'impact de la contamination des installations par des espèces de *Legionella non-pneumophila*, plus facilement détectées par la PCR, reste à déterminer.

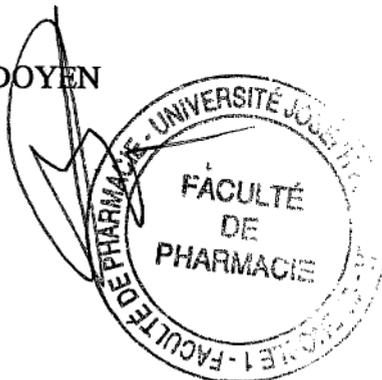
Parmi les limites de notre méthode, le développement d'un contrôle interne permettant de détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs de la Taq polymérase, est indispensable pour l'application des méthodes de PCR en routine. De même, la détection d'ADN de bactéries non viables est une limite possible de la technique, notamment lors de contrôles après traitement de décontamination des réseaux d'eau. La méthode présente également l'inconvénient, par rapport à la culture, de ne pas permettre un sérogroupage, ni d'effectuer d'études comparatives avec les souches isolées en clinique dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Le dénombrement par PCR devra donc être associé à un isolement de la souche éventuellement détectée pour permettre ce type d'études. Enfin, la sensibilité de la technique peut encore être augmentée, en particulier en optimisant l'étape d'extraction. Ce gain permettrait notamment d'améliorer la précision de la quantification pour les faibles concentrations en *Legionella spp* dans l'échantillon initial, et d'abaisser la limite de détection.

La PCR quantitative représente donc une alternative intéressante à la culture pour la numération des *Legionella spp* dans l'eau, couplée à l'isolement des souches éventuellement détectées, en vue de leur caractérisation phénotypique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 15 septembre 2003

LE DOYEN



Professeur P. DEMENGE

LE PRESIDENT DU MEMOIRE

Professeur R. GRILLOT

Bibliographie

1. **Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al.** Legionnaires' disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297: 1189-97.
2. **Brenner DJ, Arnold G, Steigerwalt BS, McDade JE.** Classification of the Legionnaires' disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family of *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Int Med* 1979; 90 : 656-8.
3. **McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR.** Legionnaires' disease: Isolation of a Bacterium and Demonstration of Its Role in Other Respiratory Disease. *N Engl J Med* 1977; 297: 1197-203.
4. **Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Kassanoff I.** Pontiac fever : An epidemic of unknown aetiology in a health department. *Am J Epidemiol* 1978; 107: 149-60.
5. **McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM.** Legionnaires' disease Bacterium isolated in 1947. *Ann Int Med* 1979; 90: 659-61.
6. **Decludt B, Guillotin L, Van Gastel B, Dubrou S, Jarraud S, Perrocheau A, et al.** Foyer épidémique de légionellose à Paris en juin 1998. *BEH* mai 1999; 21: 83-5.
7. **Campese C, Decludt B.** Les légionelloses déclarées en France en 2000. *BEH* octobre 2001; 42 : 199-201.
8. **Garrity GM, Brown A, Vickers RM.** *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 609-14.
9. **Benson RF, Fields BS.** Classification of the genus *Legionella*. *Sem Respir Infect* 1998; 13: 90-9.
10. **Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P, Bibb WF, McKinney RM, Starnes RW, et al.** *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *Fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *Pascullei* subsp. nov. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1695-703.
11. **Adeleke A, Pruckler J, Benson RF, Rowbotham TJ, Halablab M, Fields BS.** *Legionella*-like amoebal pathogens – phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 225-30.
12. **Fields BS, Benson RF, Besser RE.** *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol rev* 2002; 15: 506-26.
13. **Park MY, Ko KS, Lee HK, Park MS, Kook YH.** *Legionella busanensis* sp. Nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:77-80.
14. **Rowbotham TJ.** *Legionella*-like amoebal pathogens. In: Barbaree JM, Breiman RF and Dufour AP, editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993: 137-40.

15. **Birtles RJ, Rowbotham TJ, Raoult D, Harrison TG.** Phylogenetic diversity of intra-amoebal *Legionellae* as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology* 1996; 142: 3525-30.
16. **Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, et al.** *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1151-60.
17. **Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM.** The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 1215-22.
18. **Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW.** Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J Clin Microbiol* 1997; 36: 1560-67.
19. **Maurin M, Raoult D.** Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 518-53.
20. **Washington C, Winn JR.** *Legionella*. In : Murray PR, Jo Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of clinical Microbiology. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1999: 572-85.
21. **Jarraud S, Reyrolle M, Etienne J.** *Legionella* et légionellose. In: Freyney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2000: 1389-405.
22. **Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J.** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2047-53.
23. **Hay J, Seal DV, Billcliffe B, Freer JH.** Non-culturable *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii*: detection of the bacterium using DNA amplification and hybridization. *J Appl Bacteriol* 1995; 78: 61-5.
24. **Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, Reyrolle M, Lasne Y, Grimont PAD, et al.** *Legionella taurinensis* sp. nov., a new species antigenically similar to *Legionella spiritensis*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 397-403.
25. **Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, et al.** *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1151-60.
26. **Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, Reyrolle M, Lasne Y, Grimont PAD, et al.** *Legionella gresiliensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1949-57.

27. **Park MY, Ko KS, Lee HK, Park MS, Kook YH.** *Legionella busanensis* sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 77-80.
28. **Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH.** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1981; 41:9-16.
29. **Abu Kwaik Y, Gao LL, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS.** Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and its Role in Bacterial Ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3127-33.
30. **Steele TW, Lanser J, Sangster N.** Isolation of *Legionella longbeachae* serogroupe 1 from potting mixes. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 49-53.
31. **Steele TW, Moore CV, Sangster N.** Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *legionellae* in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 2984-8.
32. **Center for Disease Control and Prevention.** Legionnaires' disease associated with potting soil-California, Oregon and Washington, May-June 2000. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 777-8.
33. **Groothuis DG, Veenendaal HR, Dijkstra HL.** Influence of temperature on number of *Legionella pneumophila* in hot water system. *J Appl Bacteriol* 1985; 59:529-36.
34. **Yee RB, Wadowsky RM.** Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43:1330-4.
35. **Conseil supérieur d'hygiène publique de France.** Gestion du risque lié aux légionelles. Paris. Novembre 2001.
36. **Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K.** Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in Hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2540-7.
37. **Nahapetian K, Challemel O, Beurтин D, Dubrou S, Gounon P, Squinazi F.** The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res Microbiol* 1991; 142: 677-85.
38. **Breiman RF, Fields BS, Sanden GN, Volmer L, Meier A, Spika JS.** Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* 1990; 263: 2924-6.
39. **Henke M, Seidel KM.** Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water. *Isr J Med Sci* 1986; 22: 690-5.
40. **Swanson MS, Hammer BK.** *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoeba to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 567-613.

41. **Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT.** Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 422-4.
42. **Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M.** Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1822-4.
43. **Rowbotham TJ.** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980; 33: 1179-83.
44. **Barker J, Brown MRW, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2420-5.
45. **Fields BS.** *Legionella* and Protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1993: 129-36.
46. **Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikedo M, Yabuuchi E.** Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 1394-7.
47. **Nagington J, Smith DJ.** Pontiac fever and amoeba. *Lancet* 1980; 2: 1241.
48. **Rowbotham TJ.** Pontiac fever, amoeba, and *Legionellae*. *Lancet* 1981; 1: 40-1.
49. **Barker J, Brown MRW.** Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1994; 140: 1253-9.
50. **Atlas RM.** *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* 1999; 1: 283-93.
51. **Newsome AL, Baker RL, Miller RD, Arnold RR.** Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1985; 50: 449-52.
52. **Smith-Somerville HE, Huryn VB, Walker C, Winters AL.** Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2742-9.
53. **Office fédéral de la santé publique Suisse.** Légionelles et légionellose : particularités biologiques, épidémiologie, aspects thérapeutiques, enquêtes environnementales, prévention et mesure de lutte. 1999. Document disponible sur Internet à l'URL : <http://www.bag.admin.ch/infekt/krank/legio/f/index.htm>.
54. **Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ.** Production of respirable vesicle containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 279-86.

55. **Kilvington S, Price J.** Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 1990; 68: 519-25.
56. **Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM.** The role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 2001; 147: 3121-6.
57. **Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW.** Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1842-51.
58. **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. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1585-92.
59. **Wright JB, Ruseska I, Costerton JW.** Decreased biocide susceptibility of adherent *Legionella pneumophila*. *J Appl Bacteriol* 1991; 71: 531-8.
60. **Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H.** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-45.
61. **Costerton J, Stewart P, Greenberg E.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
62. **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280: 295-8.
63. **Plouffe J, Webster L, Hackman B.** Relationship between colonization of hospital building with *Legionella pneumophila* and hot water temperature. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 769-79.
64. **Alary M, Joly J.** Risk factors for contamination of domestic hot water systems by *Legionellae*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2360-7.
65. **Ciesielski C, Blaser M, Wang W.** Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48: 984-7.
66. **Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G, Peppard R.** Each water outlet is a unique ecological niche for *Legionella pneumophila*. *Epidemiol Infect* 1992; 108: 261-70.
67. **States SJ, Conley LF, Ceraso M, Stephenson TE, Wolford RS, Wadowsky RM, et al.** Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50: 1149-54.
68. **Schofield G, Locci R.** Colonization of components of a model hot water system by *Legionella pneumophila*. *J Appl Bacteriol* 1985; 58: 151-62.

69. **Niedeveld C, Pet F, Meenhorst P.** Effect of rubbers and their constituents on proliferation of *Legionella pneumophila* in naturally contaminated hot water. *Lancet* 1986; 2: 180-4.
70. **Koide M, Saito A, Kusano N, Higa F.** Detection of *Legionella spp* in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1943-6.
71. **Ministère de l'emploi et de la solidarité, ministère de l'économie, des finances et de l'industrie, ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement.** Guide de bonnes pratiques : *Legionella* et tours aéroréfrigérantes. Paris. Septembre 2001.
72. **Stout JE, Yu VL.** Legionellosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 682-7.
73. **Joseph C, Morgan D, Birtles R, Pelaz C, Martin-Bourgon C, Black M, et al.** An international investigation of an outbreak of Legionnaires' disease among UK and French tourists. *Eur J Epidemiol* 1996 ; 12 : 215-9.
74. **Campese C, Che D, Maine C, Decludt B.** Les légionelloses déclarées en France en 2002. *BEH* juillet 2003 ; 32 : 153-5.
75. **Nagai T, Sobajima H, Iwasa M, Tsuzuki T, Kura F, Amemura-Maekawa J, et al.** Neonatal sudden death due to *Legionella* pneumonia associated with water birth in a domestic spa bath. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2227-9.
76. **Breiman RF.** Modes of transmission in epidemic and nonepidemic *Legionella* infection: directions for further study. In Barbaree JM, Breiman RF and Dufour AP editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993: 30-5.
77. **Levy PY, Teysseire N, Etienne J, Raoult D.** A nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* caused by contaminated transesophageal echocardiography probes. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2003 ; 24 : 619-22.
78. **Bollin G, Plouffe J, Para M, Hackman B.** Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50: 1128-31.
79. **Helms CM, Massanari RM, Zeitler R, Streed S, Gilchrist MJ, Hall N, et al.** Legionnaires' disease associated with a hospital water system: a cluster of 24 nosocomial cases. *Ann Intern Med* 1983 ; 99 :172-8.
80. **Shands KN, Ho JL, Meyer RD, Gorman GW, Edelstein PH, Mallison GF, et al.** Potable water as a source of Legionnaires' disease. *JAMA* 1985 ; 253 : 1412-6.
81. **Tobin JO, Beare J, Dunnill MS, Fisher-Hoch S, French M, Mitchell RG, et al.** Legionnaires' disease in a transplant unit : isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet* 1980 ; 2 :118-21

82. **Schlech WF, Gorman GW, Payne MC, Broome CV.** Legionnaires' disease in the Caribbean. an outbreak associated with resort hotel. *Arch Intern Med* 1985 ; 145 : 2076-9.
83. **Mamolen M, Breiman RF, Barbaree JM, Gunn RA, Stone KM, Spika JS, et al.** Use of multiple molecular subtyping techniques to investigate a Legionnaires' disease outbreak due to identical strains at two tourist lodges. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 2584-8.
84. **Straus WL, Plouffe JF, File TM Jr, Lipman HB, Hackman BH, Salstrom SJ, et al.** Risk factors for domestic acquisition of Legionnaires' disease. *Arch Inter Med* 1996; 156 : 1685-92.
85. **Breiman RF, Cozen W, Fields BS, Mastro TD, Carr SJ, Spika JS, et al.** Role of air-sampling in an investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. *J Infect Dis* 1990; 161: 1257-61.
86. **Dondero TJ, Rentdorff RC, Mallison GF, Weeks RM, Levy JS, Wong EW, et al.** An outbreak of Legionnaire's disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *N Engl J Med* 1980; 302: 365-70.
87. **Fiore AE, Nuorti JP, Levine OS, Marx A, Weltman AC, Yeager S, et al.** Epidemic Legionnaires' disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 426-33.
88. **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. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 883-92.
89. **Keller DW, Hajjed R, DeMaria A, Fields BS, Pruckler JM, Benson RF, et al.** Community outbreak of Legionnaires' disease: an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella species*. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 257-61.
90. **Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, Genese CA, Nuorti JP, Fields BS, et al.** Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet* 1996; 347: 494-9.
91. **Center for Disease Control and Prevention.** Legionnaires' disease associated with a whirlpool spa display, Virginia, September-October 1996. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 83-6.
92. **Mahoney FJ, Hoge CW, Farley TA, Barbaree RM, Breiman RF, Benson RF, et al.** Community wide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. *J Infect Dis* 1992; 165: 736-9.
93. **World Health Organization.** Legionnaires' disease, Europe, 1999. *Weekly epidemiological record* 2000; 43: 347-352.
94. **Edelstein PH.** Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* 1993; 16:741-9.

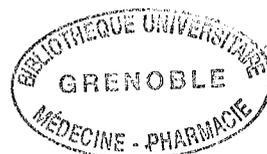
95. **Murdoch DR.** Diagnosis of *Legionella* Infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 64-9.
96. **Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ, Fields BS and the Community Based Pneumonia Incidence Study Group.** Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1286-91.
97. **Dominguez JA, Gali N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, et al.** Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine sample. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2718-22.
98. **Benson RF, Tang PW, Fields BS.** Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' Disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2763-5.
99. **Yzerman PF, Den Boer JW, Lettinga KD, Schellekens J, Dankert J, Peeters M.** Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' Disease in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3232-6.
100. **Okada C, Kura F, Wada A, Inagawa H, Lee GH, Matsushita H.** Cross-reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest Eia and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. *Microbiol Immunol* 2002 ; 46 :51-4.
101. **Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B, et al.** Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel associated and nosocomial legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 838-40.
102. **Kim MJ, Sohn JW, Park DW, Park SC, Chum BC.** Characterisation of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 2003; 2974-9.
103. **Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, Van Dam AP, Goossens H, et al.** Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Clin Microbiol* 2003; 4016-21.
104. **Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al.** Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage an open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection and culture. *J Clin Microbiol* 2001; 38: 2618-26.
105. **Rantakokko-jalava K, Jalava J.** Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2904-10.

106. **Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW.** Detection of *Legionella pneumophila* by real-time-PCR for the mip gene. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3327-30.
107. **Reischl U, Linde HJ, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N.** Direct detection and differentiation of *Legionella spp* and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3814-7.
108. **Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR.** Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1709-12.
109. **Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Chereshsky AY, et al.** Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 475-80.
110. **Roig J, Rello J.** Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1119-29.
111. **Nielsen K, Hindersson P, Høiby N, Bangsberg JM.** Sequencing of the rpoB gene in *Legionella pneumophila* and characterisation of mutations associated with rifampin resistance in the *Legionellaceae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2000; 44: 2679-83.
112. **Nielsen K, Bangsberg JM, Høiby N.** Susceptibility of *Legionella* species to five antibiotics and development of resistance by exposure to erythromycin, ciprofloxacin and rifampicin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36: 43-8.
113. **Jonas D, Engels I, Hartung D, Beyersmann J, Frank U, Daschner FD.** Development and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 : 275-80.
114. **Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM.** Comparison of culture methods for monitoring *Legionella species* in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2118-23.
115. **Boulanger CA, Edelstein PH** Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 1995 ; 61 : 1805-9.
116. **Smith L, Carroll K, Mottice S.** Comparison of membrane filters for recovery of *Legionellae* from water samples. *Appl Environ Microbiol* 1993 ; 59 : 344-6.
117. **Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM.** Growth of 28 *Legionella species* on selective culture media : a comparative study. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 :2764-8.
118. **Roberts KP, August CM, Nelson JD Jr.** Relative sensitivities of environmental *Legionellae* to selective isolation procedures. *Appl Environ Microbiol* 1987 ; 53 : 2704-7.

119. **Reinthal FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, Marth E.** Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 1213-6.
120. **Wellinghausen N, Frost C, Marre R.** Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001 ; 67 : 3985-93.
121. **Kustenov JM, Jousimies-somer HR, Nevalainen AI, Martikainen PJ.** Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods. *J Appl Bacteriol* 1994 ; 76 :155-62.
122. **Leoni E, Legnani PP.** Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella species* from water systems. *J Appl Microbiol* 2001 ; 90 : 27-33.
123. **De Luca G, Stampi S, Lezzi L, Zanetti F.** Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiol* 1999 ; 22 : 203-8.
124. **Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J.** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997 ; 63 : 2047-53.
125. **Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, et al.** Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR Hybridization Assay. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 4215-8.
126. **Bej AK, Mahbulani MH, Atlas RM.** Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol* 1991 ; 57 : 597-600.
127. **Palmer CJ, Bonilla GF, Roll B, Paszko-Kolva C, Sangermano LR, Fujioka RS.** Detection of *Legionella species* in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl Environ Microbiol* 1995 ; 61 : 407-12.
128. **Palmer CJ, Tsai YL, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR.** Detection of *Legionella species* in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl Environ Microbiol* 1993 ; 59 :3618-24.
129. **Catalan V, Moreno C, Dasi MA, Munoz C, Apraiz D.** Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water. *Res Microbiol* 1994 ; 145 : 603-10.
130. **Alary M, Joly JR.** Comparison of culture methods and immunofluorescence assay for the detection of *Legionella pneumophila* in domestic hot water devices. *Cur Microbiol* 1992; 25:19-23.

131. **Koide M, Saito A, Kusano N, Higa F.** Detection of *Legionella spp* in cooling tower by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1943-6.
132. **Maiwald M, Kissel K, Srimuang S, Von Knebel Doeberitz M, Sonntag HG.** Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionellae* in hospital water. *J Appl Bacteriol* 1994; 76: 216-25.
133. **Villari P, Motti E, Farullo C, Torre I.** Comparison of conventional culture and PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water. *Lett Appl Microbiol* 1998; 27: 106-10.
134. **Miyamoto I, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, et al.** Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella species* and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2489-94.
135. **Catalan V, Garcia F, Moreno C, Vila MJ, Apraiz D.** Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Res microbiol* 1997; 148: 71-8.
136. **Levi K, Smedley J, Towner KJ.** Evaluation of a real-time PCR hybridisation assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 754-8.
137. **Joly JR.** Monitoring for the presence of *Legionella*: where, when and how. In Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, editors. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1993: 211-6.
138. **Center for Disease Control and Prevention.** Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46 : 1-79.
139. **Alary MA, Joly JR.** Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems. *J Infec Dis* 1992 ; 165 :565-9.
140. **Center for Disease Control and Prevention.** Final recommendations to minimize transmission of Legionnaire's disease from whirlpool spas on cruise ship. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:83-6
141. **Tse C, Capeau J.** Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin* 2003 ; 61 : 279-93.
142. **Greiner O, Day PJR, Altwegg M, Nadal D.** Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1386-90.
143. **Apfalter P, Barousch W, Nehr M, Makristathis A, Willinger B, Rotter M, et al.** Comparison of a new quantitative *ompA*-based real-time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 592-600.

144. **Kuoppa Y, Boman J, Scott L, Kumlin U, Eriksson I, Allard A.** Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2273-4.
145. **Oggioni MR, Meacci F, Carattoli A, Ciervo A, Orru G, Cassone A, et al.** Protocol for real-time PCR identification of anthrax spores from nasal swabs after broth enrichment. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3956-63.
146. **Mc Avin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, et al.** Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3446-51.
147. **Spieß B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, et al.** Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1811-8.
148. **He Q, Wang JP, Osato M, Lachman LB.** Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3720-8.
149. **Yoshida T, Deguchi T, Ito M, Maeda SI, Tamaki M, Ishiko H.** Quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* from first-pass urine of men with urethritis and asymptomatic men by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1451-5.
150. **Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW.** Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the mip gene. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3327-30.
151. **Merel P.** Instrumentation et biologie moléculaire, 1^{ière} partie : l'automatisation de l'extraction des acides nucléiques, et la PCR quantitative. *Spectra Biologie* 2001 ; 20 :49-57.
152. **Marrie TJ, Raoult D, La Scola B, Birtles RJ, De Carolis E.** *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 1026-9.
153. **Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, Roden EE, Churchill PF.** A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4993-5.
154. **Van der zee A, Crielaard JW.** Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for *Legionella* PCR are not suitable for diagnostic purpose. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1126.
155. **Evans GE, Potter HC, Chambers ST.** Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3452-3.



Annexes

Données de l'étude comparative entre la méthode normalisée AFNOR T90-431 et les PCR quantitatives *Legionella spp* et *L. pneumophila*

Recherche de *Legionella spp* négative à la fois par ensemencement et par les deux techniques de PCR

N° du prélèvement	Remarque	Contamination des géloses ensemencées sans traitement préalable?	Résultats UFC (UFC/l)	Résultats PCR <i>L. spp</i> (<i>L. spp</i> /l)	Résultats PCR <i>Lp</i> (<i>Lp</i> /l)
BA 0312 2183	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0315 3088		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0320 3288		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0325 2124		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0325 2128	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0326 2130	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0327 2096	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0327 2101		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0327 2107	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0328 2126	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0328 2127		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0328 3131		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0329 3150	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0329 3151		NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0330 2083	Filtre	NON	négatif<50	négatif<200	négatif<528
BA 0331 2127	Filtre	OUI	négatif<50	négatif<200	négatif<528

Total = 16 prélèvements

Recherche positive en *L. pneumophila* par ensemencement et par les deux techniques de PCR

N° du prélèvement	Remarque	Contamination des géloses ensemencées sans traitement préalable?	Résultats UFC (UFC/l)	Résultats PCR <i>L. spp</i> (<i>L. spp</i> /l)	Résultats PCR <i>Lp</i> (<i>Lp</i> /l)
BA 0309 2210		NON	2100	20 580	14 791
BA 0309 2219		OUI	200	7 300	6 248
BA 0309 2222		NON	50	6 260	7 400
BA 0309 2225		OUI	100	8 892	9 934
BA 0309 2227		OUI	6600	21 927	18 324
BA 0312 2185		NON	2900	12 286	6539
BA 0312 2186		NON	50	1585	positif faible
BA 0314 4181		NON	1100	7858	7005
BA 0314 4183		NON	200	1821	1046
BA 0315 3091		NON	1700	2502	947
BA 0316 4150		NON	300	2620	2956
BA 0317 4117		NON	50	1317	1084
BA 0317 4119		NON	200	694	920
BA 0318 2115		OUI	3250	34670	26640
BA 0320 3235	AGLAE	NON	19000	29240	20708
BA 0320 3236	AGLAE	NON	29000	19298	12787
BA 0321 4161		NON	150	3904	positif faible
BA 0321 4162		NON	450	2070	1259
BA 0321 4164		NON	5300	16 133	17 937
BA 0321 4168		NON	7400	12 081	16 314
BA 0321 4169		NON	750	1782	1190
BA 0322 3139		NON	150	1418	950
BA 0323 4157		NON	50	600	1005
BA 0323 4159		NON	350	506	573
BA 0324 3178		NON	150	627	positif faible
BA 0325 3058		NON	50	577	628
BA 0326 3166		OUI	750	3293	5280
BA 0326 3169		NON	400	3088	4123
BA 0326 3172		NON	550	1334	2368
BA 0326 3177		NON	200	1176	1762
BA 0326 3178		NON	12000	positif faible	6148
BA 0327 3132		NON	50	345	473
BA 0327 2076	TAR	OUI	200000	340000	230000
BA 0327 5072		NON	50	643	positif faible
BA 0328 2125		NON	400	3054	1521
BA 0328 3112		NON	500	8630	4614
BA 0328 4180		NON	1150	950	1139
BA 0328 4181		NON	1500	11143	11098
BA 0330 2082		NON	2650	3995	5635
BA 0331 4201		NON	50	positif faible	positif faible
BA 0331 4202		NON	100	437	positif faible

Total = 41 prélèvements

**Recherche de *Legionella spp* négative par ensemencement mais positive en PCR
Legionella spp et *L. pneumophila***

N° du prélèvement	Remarque	Contamination des géloses ensemencées sans traitement préalable?	Résultats UFC (UFC/l)	Résultats PCR <i>L. spp</i> (<i>L. spp</i> /l)	Résultats PCR <i>Lp</i> (<i>Lp</i> /l)
BA 0312 2182		NON	négatif<50	positif faible	positif faible
BA 0312 2187		NON	négatif<50	1497	positif faible
BA 0314 4184		NON	négatif<50	580	positif faible
BA 0317 4120		NON	négatif<50	1214	761
BA 0319 3091		NON	négatif<50	1520	852
BA 0319 3097		OUI	négatif<50	631	1391
BA 0324 3173		NON	négatif<50	501	positif faible
BA 0326 3171		OUI	négatif<50	957	1765
BA 0326 3173		NON	négatif<50	440	941
BA 0326 3175		NON	négatif<50	1098	892
BA 0326 3176		NON	négatif<50	1153	523
BA 0326 3179		NON	négatif<50	1773	2030
BA 0326 3180		NON	négatif<50	positif faible	581
BA 0326 3181		NON	négatif<50	430	positif faible
BA 0327 3129	Filtre	NON	négatif<50	positif faible	positif faible
BA 0327 3131		NON	négatif<50	positif faible	positif faible
BA 0328 3134		NON	négatif<50	1370	positif faible
BA 0330 5119	TAR	OUI	négatif<50	1350000	1580000
BA 0331 4203	TAR	OUI	négatif<50	12684	22100

Total = 19 prélèvements

**Recherche positive en *L. taurinensis* par ensemencement et positive en PCR
Legionella spp et *L. pneumophila***

N° du prélèvement	Remarque	Contamination des géloses ensemencées sans traitement préalable?	Résultats UFC (UFC/l)	Résultats PCR <i>L. spp</i> (<i>L. spp</i> /l)	Résultats PCR <i>Lp</i> (<i>Lp</i> /l)
BA 0316 4551		NON	350 <i>L. taurinensis</i>	2748	1745

Total = 1 prélèvement

Recherche négative à la fois par ensemencement et par PCR *L. pneumophila* mais positive en PCR *Legionella spp*

N° du prélèvement	Remarque	Contamination des géloses ensemencées sans traitement préalable?	Résultats UFC (UFC/l)	Résultats PCR <i>L. spp</i> (<i>L. spp</i> /l)	Résultats PCR <i>Lp</i> (<i>Lp</i> /l)
BA 0312 2184		OUI	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0312 2188		NON	négatif<50	594	négatif<528
BA 0312 2189		NON	négatif<50	860	négatif<528
BA 0319 3094		NON	négatif<50	1663	négatif<528
BA 0320 3286		NON	négatif<50	793	négatif<528
BA 0320 3292		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0320 3287		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0320 3289		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0320 3290		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0320 3291		NON	négatif<50	480	négatif<528
BA 0321 4165		NON	négatif<50	329	négatif<528
BA 0322 3137		NON	négatif<50	488	négatif<528
BA 0322 3140		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0323 3117	TAR	NON	négatif<50	591	négatif<528
BA 0323 3118	TAR	NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0323 4156		NON	négatif<50	13 147	négatif<528
BA 0324 3174		NON	négatif<50	537	négatif<528
BA 0325 3057		NON	négatif<50	2955	négatif<528
BA 0325 3059		NON	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0327 2077	TAR	OUI	négatif<50	positif faible	négatif<528
BA 0330 5123	TAR	OUI	négatif<50	52000	négatif<528
BA 0331 4200		NON	négatif<50	1149	négatif<528

Total = 22 prélèvements

Légende :

AGLAE : prélèvements issus de l'essai interlaboratoires *Legionella* et *L. pneumophila* sur eau propre de l'Association Générale des Laboratoires d'Analyses de l'Environnement.

Filtre : prélèvements obtenus à partir de points d'usage équipés de microfiltres terminaux.

TAR : Prélèvements issus de tours aéroréfrigérantes.

PCR *L.spp* : PCR *Legionella spp*

PCR *Lp* : PCR *Legionella pneumophila*

Liste des abréviations et symboles

- ACES : Acide N-(2-acetamido)-2-amino-ethanesulfonique
- AGLAE : Association Générale des Laboratoires d'Analyses de l'Environnement.
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- AFNOR: Association Française de NORmalisation
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATCC : American Type Culture Collection
- BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract
- CDC : Center for Disease Control and prevention
- Cp : Crossing point
- CIP : Collection de l'Institut Pasteur
- CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
- DDASS : Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
- DGS : Direction Générale de la Santé
- DGVP : Dyes, Glycine, Vancomycin, Polymyxin B
- EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétate
- E : Efficacité d'amplification
- EIA: Enzyme Immunosorbant Assay
- EWGLI: European Working Group for *Legionella* Infection
- FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert
- GPAV : Glycine, Polymyxin B, Anisomycin, Vancomycin
- GVPC : Glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximide
- In Vs : Institut national de Veille sanitaire
- kg : kilogramme
- LED: Light Emitting Diode
- LLAPs: *Legionella*-Like Amoebal Pathogens
- µm: micromètre
- mg : milligramme
- ml : millilitre
- mM : millimolaire
- nm : nanomètre
- NCTC : National Collection of Type Culture
- PBS : Phosphate Buffer saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

pg : picogramme

PVC: Chlorure de PolyVinyle

R : Rendement de PCR

r : coefficient de régression linéaire

UFC: Unités Formant Colonies



Serment des Apothécaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Titre :

Détection et quantification des *Legionella spp* dans l'eau par méthode de PCR en temps réel : validation par rapport à la culture

Résumé :

Le dénombrement des *Legionella spp* dans les réseaux d'eau, pour prévenir l'émergence de cas de légionellose, nécessite actuellement la culture de ces bactéries (norme AFNOR T90-431). Cette technique fastidieuse, manque de sensibilité et de reproductibilité. Nous avons évalué deux protocoles de PCR quantitative en temps réel permettant la quantification soit de l'ensemble des espèces du genre *Legionella* soit spécifiquement de l'espèce *L. pneumophila*. Sur des eaux artificiellement chargées en *L. pneumophila*, nous avons déterminé pour ces deux protocoles, des seuils de positivité de 200 et 528 équivalents de copies de génome bactérien par litre d'eau pour la PCR *Legionella spp* et pour la PCR *L. pneumophila*. La quantification s'est révélée reproductible jusqu'à 454 et 1000 équivalents de copies de génome bactérien par litre d'eau respectivement. L'analyse en prospectif de 98 prélèvements d'eau a montré une quantification en moyenne 13.2 fois plus élevée par PCR que par culture. Nous avons pu constater une corrélation entre les résultats des deux techniques pour la plupart des prélèvements, malgré l'absence d'une relation strictement linéaire. Nous avons remarqué que les discordances majeures entre les deux techniques correspondaient à des prélèvements qui avaient nécessité une étape de décontamination pour le dénombrement par la méthode normalisée, entraînant une sous-évaluation du nombre réel de *Legionella spp*. Par rapport aux techniques par ensemencement, le dénombrement par PCR apparaît plus précis et plus proche de la quantité réelle de bactéries présentes dans l'échantillon. Il est en effet indépendant de l'interférence éventuelle d'une flore bactérienne contaminante et il permet la quantification de souches ou espèces de *Legionella spp* non cultivables. La PCR permet d'obtenir des résultats plus rapidement que les méthodes basées sur la culture. Elle est aussi plus facilement automatisable. Elle autorise donc un travail par séries, ce qui permet de multiplier les contrôles et d'améliorer la surveillance des installations à risque. La PCR quantitative représente une alternative intéressante à la culture pour la numération des *Legionella spp* dans l'eau, couplée à l'isolement des souches éventuellement détectées, en vue de leur caractérisation phénotypique. L'utilisation de la PCR en routine nécessiterait en particulier l'emploi d'un contrôle interne d'inhibition et une réévaluation des seuils d'intervention et d'alerte qui avaient été fixés en fonction de la méthode normalisée.

Mots clefs : environnement, *Legionella pneumophila*, PCR en temps réel, pneumonie

Auteur :

Pierre-Alain FALCONNET,

[Données à caractère personnel]