



HAL
open science

Les légionelloses nosocomiales

Sabine Gamberre

► **To cite this version:**

| Sabine Gamberre. Les légionelloses nosocomiales. Sciences pharmaceutiques. 2003. hal-01733432

HAL Id: hal-01733432

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733432>

Submitted on 14 Mar 2018

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 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 : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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/V2/leg/leg_droi.php

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

2003

FACULTE DE PHARMACIE

LES LEGIONELLOSES NOSOCOMIALES

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 8 janvier 2003

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Sabine GAMERRE
née le 2 août 1974

DS 2003

Membres du Jury

Président : M. Jean-Claude BLOCK, Professeur

Juges : M. Christian RABAUD, Professeur, Praticien Hospitalier
M. Loïc SIMON, Pharmacien, Praticien Hospitalier



BU PHARMA-ODONTOL



D

104 062405 3

FACULTE DE PHARMACIE

LES LEGIONELLOSES NOSOCOMIALES

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 8 janvier 2003

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Sabine GAMERRE
née le 2 août 1974

DB 28523



Membres du Jury

Président : M. Jean-Claude BLOCK, Professeur

Juges : M. Christian RABAUD, Professeur, Praticien Hospitalier
M. Loïc SIMON, Pharmacien, Praticien Hospitalier

Membres du personnel enseignant 2002/2003

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsable de la Filière industrie

Jeffrey ATKINSON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. MARTIN Jean-Armand

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M.	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
Mlle	BATT Anne-Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean-Claude	Santé publique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Bactériologie -Immunologie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique, audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie-Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Chimie physique générale
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean-Bernard	Chimie Thérapeutique
M.	RIHN Bertrand (Professeur associé)	Biochimie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie, immunologie
M.	SIEST Gérard	Biologie, pharmacologie moléculaire
M.	SIMON Jean-Michel	Droit officinal, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève

Pratique officinale

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme BANAS Sandrine	Parasitologie
M. BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
M. BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacologie
M. CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M. CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M. CLAROT Igor	Chimie analytique
M. COLLIN Jean-François	Santé publique
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M. FERRARI Luc	Toxicologie
Mlle FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mlle HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M. HUMBERT Thierry	Chimie organique
Mlle IMBS Marie Andrée	Bactériologie, virologie, parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mlle LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication et santé
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie-France	Chimie physique générale
Mme ROVEL Anne	Histologie, physiologie
Mme SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M. VISVIKIS Athanase	Biologie moléculaire
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria-Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Mycologie
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHECAIRES



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.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A notre Président de thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Claude BLOCK,
Professeur de Santé Publique.

Vous nous faites l'honneur de présider ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de nos
profonds remerciements.

A notre Maître et Juge,
Monsieur Loïc Simon,
Pharmacien, Praticien hospitalier, responsable du laboratoire d'hygiène du CHU de Nancy-
Brabois.

Nous vous remercions sincèrement pour votre gentillesse, votre aide, votre disponibilité et
votre expérience tout au long de ce travail.

A notre Maître et Juge,
Monsieur le Professeur Christian RABAUD,
Professeur de Maladies Infectieuses : Maladies tropicales.

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger notre thèse ainsi que de votre aide. Que vous
soyez assuré de notre profond respect.

A mes parents

Pour votre soutien tout au long de mes études. Avec toute mon affection...

A Vincent, pour ton sourire

A Simon

A Cécile, Christian, Prouhèze, Myrto et Vivant

A mes amis

A Utitsie, Pita, Pipaluk, Oline, Hilda, Sofie-Mette pour leur générosité et à Upernavik...





SERMENT DES APOTHICAIRES



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.



TABLE DES MATIERES :

Introduction

1^{ère} Partie : Légionelles et légionelloses

1. Historique	p 2
2. Bactériologie :	p 3
21- Taxonomie	p 3
22- Réservoirs	p 4
23- Caractères morphologiques	p 7
24- Caractères cultureux et biochimiques	p 8
25- Caractères immunologiques	p 10
26- Sensibilité aux antibiotiques et désinfectants	p 11
3. Pathologie :	p 12
31- Physiopathologie	p 12
32- Clinique	p 15
33- Diagnostic	p 18
34- Thérapeutique	p 23

2^{ème} Partie : Epidémiologie des légionelloses nosocomiales

1- Caractéristiques épidémiologiques des légionelloses :	p 25
11- Fréquence, incidence.	P 26
12- Létalité	p 27
13- Répartition par âge et sexe	p 29
14- Répartition par facteurs de risques	p 31
15- Répartition par expositions à risques	p 32
16- Répartition par espèces et sérogroupe	p 34
17- Répartition par méthodes de diagnostic	p 35
18- Prévalence des légionelles dans les réseaux d'eau et tours aérorefrigérantes	p 37
2- Le système de surveillance épidémiologique des légionelloses	p 39
3- Investigation épidémiologique et environnementale :	p 44
31- Investigation épidémiologique	p 44
32- Investigation environnementale	p 45



3^{ème} Partie : Prévention des légionelloses nosocomiales

1. Contexte réglementaire :	p 46
11- Circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose.	p 46
12- Circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre des 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.	p 47
13- Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.	p 48
14- Réglementation concernant les tours aérorefrigérantes.	p 49
15- Réglementation concernant les établissements thermaux.	p 49
2. Contrôle de la qualité de l'eau, surveillance sanitaire:	p 50
21- Paramètres mesurés :	p 50
211- <i>Legionella</i> , Norme AFNOR NF T 90-431 de Novembre 1993.	p 50
212- Température.	p 51
213- Germes totaux.	p 51
22- Problèmes liés à l'analyse des légionelles dans l'eau :	p 51
221- Représentativité spatio-temporelle de l'échantillonnage.	p 51
222- Variabilité des résultats d'analyse.	p 52
223- Problèmes d'interprétation des résultats.	p 52
23- Modalités de surveillance en établissements de santé.	p 53
24- Niveaux d'intervention.	p 55
3. Prévention :	p 59
31- Installations concernées.	p 59
32- Carnet sanitaire :	p 60

321- Etat des lieux, description des installations.	p 60
322- Procédures de fonctionnement, de maintenance, d'entretien et de suivi.	p 61
323- Identification des points critiques.	p 62
324- Programme d'amélioration.	p 62
33- Mesures générales à prendre.	p 63
34- Recommandations pour la prévention des légionelloses nosocomiales :	p 64
341- Oxygénothérapie et aérosolthérapie.	p 64
342- Eau chaude sanitaire :	p 65
3421- Conception des réseaux.	p 65
3422- Entretien et maintenance.	p 67
343- Tours aéroréfrigérantes et climatiseurs.	p 68
4. Traitements physiques et chimiques curatifs et préventifs :	p 72
41- Nettoyage des réseaux d'eau chaude sanitaire.	p 72
42- Désinfection des réseaux d'eau chaude sanitaire :	p 72
421- Réglementation, produits utilisés.	p 72
422- Mise en œuvre	p 73

Conclusion

Bibliographie

Annexes



INTRODUCTION :

Les premiers cas de légionellose furent décrits il y a à peine plus de vingt cinq ans. Depuis, le nombre de cas découverts ne cesse d'augmenter d'années en années. Mais doit-on considérer que le nombre réel de cas de légionellose augmente, et que avant 1976 ni la maladie ni la bactérie n'existaient ? La réponse est que la maladie a toujours existé, à un niveau variable au cours du temps. En effet, les conditions de survie de la bactérie, du genre *Legionella*, font penser que le développement des systèmes d'humidification de l'air, de type climatiseurs, ou des procédés industriels de récupération d'énergie comme les tours aéroréfrigérantes, a pour conséquence de favoriser le développement de la bactérie ainsi que sa dissémination. De plus, l'amélioration permanente du système de déclaration des cas de légionellose ainsi que la médiatisation récente d'épidémies nosocomiales ou communautaires donne l'impression d'une progression de la maladie alors qu'il ne s'agit en fait que d'une meilleure déclaration de celle-ci.

Les légionelloses nosocomiales représentent environ 20 % de l'ensemble des légionelloses. En milieu hospitalier, les réseaux d'eau chaude sanitaire, les systèmes de conditionnement de l'air comme les climatiseurs et les appareils de traitement respiratoire constituent des milieux favorables à la multiplication des légionelles. La surveillance et la prévention des légionelloses est non seulement indispensable mais aussi rendue obligatoire depuis 1998 dans tous les établissements de santé.

Bien que l'agent infectieux responsable de la légionellose, *Legionella*, soit aujourd'hui assez bien connu, des incertitudes demeurent sur les conditions de transmission de la bactérie chez l'homme, et donc sur la survenue d'une légionellose. Cela rend d'autant plus difficile la prise de mesures préventives de lutte contre les légionelloses et en particulier l'établissement de valeurs seuils de concentration en légionelles de l'eau. Aussi, ce travail ne tente pas de préconiser des mesures de prévention, ni d'établir des valeurs seuils mais fait le point sur l'ensemble des recommandations récemment émises par les hospitaliers hygiénistes, bactériologistes et légistes.

1- Historique (3)(17):

Du 21 au 24 Juillet 1976, les anciens combattants de "l'American Legion" tiennent leur congrès annuel à Philadelphie. 4000 congressistes sont hébergés pour cette occasion à l'hôtel "Bellevue-Stratford".

En quatre semaines, 183 personnes sont atteintes d'une pneumopathie aiguë sévère et d'autres d'un simple syndrome respiratoire fébrile. Vingt neuf décèdent.

Ces personnes touchées se sont révélées être en majorité des résidents de l'hôtel "Bellevue-Stratford" mais des pneumopathies similaires ont été notées chez des personnes qui, sans être rentrées dans l'hôtel, étaient passés à proximité de l'établissement. Ces cas ont été appelés "pneumopathies de la Grand-Rue".

Une enquête épidémiologique est mise en place ainsi que des recherches bactériologiques.

Les sources de contamination furent recherchées au cours de l'enquête épidémiologique et on démontra que les personnes s'étaient contaminées par voie aérienne dans le hall de l'hôtel ou sur le trottoir.

Les premiers résultats bactériologiques étant négatifs pour les germes connus, on nomme cette nouvelle maladie "Maladie du légionnaire".

En 1977, Mac Dade identifie l'agent microbien responsable, une bactérie encore inconnue, proche des *Rickettsiae*, Bacille Gram négatif, isolée de fragments de poumons de malades décédés, qu'il nomme "*Legionella pneumophila*" (*Legionella* pour son origine et *pneumophila* pour son tropisme pulmonaire).

Il confirme la mise en cause de *Legionella pneumophila* dans l'épidémie de Philadelphie en mettant en évidence la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la bactérie qu'il a mis en évidence dans le sang de malades convalescents.

Rétrospectivement, des épidémies semblables sont imputées à *Legionella pneumophila*.

En 1965 à Washington dans un hôpital, une épidémie de pneumopathies s'était déclarée et l'hypothèse d'une contamination lors de travaux de terrassement avait été évoquée.

En 1968 à Pontiac, également dans un centre de soins, 95% des employés et patients furent atteints d'un syndrome respiratoire fébrile aigu et bénin (Maladie appelée alors fièvre de Pontiac).

En 1973, à Benidorm en Espagne, une épidémie de pneumopathies aiguës avait touché des touristes résidants dans le même hôtel.

Par la suite, les recherches bactériologiques, cliniques et épidémiologiques ont permis d'identifier les réservoirs, modes de contamination, prévalence, ... de *Legionella pneumophila* et des autres légionelles.

C'est en 1981 que, pour la première fois en France, *Legionella pneumophila* est isolée lors d'une épidémie en milieu hospitalier (Hôpital Bichat).

2- Bactériologie :

21- Taxonomie (15)(16)(17)(18)(19):

Les légionelles appartiennent à la famille des *Legionellacae* dont le seul genre est *Legionella*. 45 espèces sont actuellement connues dont *Legionella pneumophila* qui tient une place importante. 64 sérogroupes de *Legionella* sont connus, dont au moins quinze pour *Legionella pneumophila*.(11)

Récemment, l'espèce *Legionella pneumophila* a été divisée en trois sous-espèces :

-*Legionella pneumophila subsp pneumophila*

-*Legionella pneumophila subsp frascii*

-*Legionella pneumophila subsp pasculli*

Le tableau n°1 montre les différentes espèces de légionelles et les milieux dans lesquels elles sont habituellement isolées.

Tableau n° 1 : Sources d'isolement de différentes espèces de Légionelles. (17)

Espèces	Sources d'isolement
<i>L. anisa</i>	Plèvre, eau chaude
<i>L. birminghamensis</i>	Poumons
<i>L. bozemanii</i>	Poumons
<i>L. tucsonensis</i>	Poumons
<i>L. cherrii</i>	Citernes d'eau potable
<i>L. cincinnatiensis</i>	Poumons
<i>L. dumoffii</i>	Poumons
<i>L. cruthra</i>	Circuits de refroidissement
<i>L. fecleii</i>	Poumons
<i>L. gormanii</i>	Terre
<i>L. fairfieldensis</i>	Circuits de refroidissement
<i>L. hackeliae</i>	Poumons
<i>L. jamestownensis</i>	Terre humide
<i>L. jordanis</i>	Biopsie pulmonaire, eau de rivière
<i>L. longbeachae</i>	Aspiration trans-trachéale, pneumonie
<i>L. maceachernii</i>	Poumons, citernes d'eau potable
<i>L. micdadei</i>	Poumons, sang
<i>L. oakridgensis</i>	Poumons
<i>L. parisiensis</i>	Circuits de refroidissement
<i>L.pneumophila</i>	Poumons, circuits de refroidissement, eau, ...
<i>L. rubrilucens</i>	Eau du robinet
<i>L. saintelensis</i>	Fontaine
<i>L. spiritensis</i>	Étang
<i>L. wadsworthii</i>	Poumons

22- Réservoirs (3)(6)(17):

Les légionelles sont des bactéries ubiquitaires, banales dans notre environnement.

Elles sont hydrotelluriques, retrouvées dans la plupart des milieux aquatiques (rivières, lacs, étangs, eaux thermales), ainsi que dans des boues et composts. Plusieurs études montrent leur présence

dans la quasi totalité des eaux douces telles que rivières, lacs, étangs. Elles ne survivent pas dans l'eau de mer.

La température optimale de croissance des légionelles dans l'eau est de 35-40° C mais elles peuvent survivre jusqu'à des températures de 60° C et à partir de quelques degrés. Le pH de l'eau doit être compris entre 5,5 et 8,1, avec un optimum à 6,9.

Les légionelles sont détectées dans les milieux aquatiques naturels à de faibles concentrations, représentant moins de 1% de la flore aquatique bactérienne.

Les réservoirs naturels sont très rarement à l'origine de légionelloses, à la différence des eaux domestiquées qui constituent des sites de prolifération et de dissémination (réseaux d'eau, surtout ballons de stockage d'eau chaude sanitaire, humidificateurs d'air, climatiseurs, etc.).

Certaines légionelles ont été isolées à la fois dans l'environnement et chez des malades, d'autres n'ont été trouvées que dans l'environnement.

Le tableau n°2 montre les différentes espèces de *Legionella* et l'obtention ou non d'un isolement clinique.

Tableau n°2 : Espèces de légionelles et leur isolement chez l'homme (3)

Espèces	Isolement chez l'homme
<i>L adclaidensis</i>	-
<i>L anisa</i>	+
<i>L birminghamensis</i>	+
<i>L bozemanii</i>	+
<i>L brunensis</i>	-
<i>L cherrii</i>	+
<i>L cincinnaticensis</i>	+
<i>L dumofii</i>	+
<i>L erythra</i>	+
<i>L fairfieldensis</i>	-
<i>L feeleii</i>	+
<i>L geestiana</i>	-
<i>L genomospecies 1</i>	-
<i>L gormanii</i>	+
<i>L gratiana</i>	-
<i>L hackeliae</i>	+
<i>L israelensis</i>	-
<i>L jamcstowniensis</i>	-
<i>L jordanis</i>	+
<i>L lansigensis</i>	+
<i>L londiniensis</i>	-
<i>L longbeachae</i>	+
<i>L lytica VNC</i>	-
<i>L maceachernii</i>	+
<i>L micdadei</i>	+
<i>L moravica</i>	-
<i>L nautarum</i>	-
<i>L oakridgensis</i>	+
<i>L parisiensis</i>	+
<i>L pneumophila</i>	+
<i>L pneumophila subsp pneumophila</i>	+
<i>L pneumophila subsp pasculli</i>	+
<i>L quateirensis</i>	-
<i>L quinlivanii</i>	-
<i>L rubrilucens</i>	-
<i>L saintclensis</i>	+
<i>L santicrucis</i>	-
<i>L shakespearei</i>	-
<i>L spiritensis</i>	-
<i>L steigerwaltii</i>	-
<i>L tucsonensis</i>	+
<i>L wadsworthii</i>	+
<i>L waltersii</i>	-
<i>L worsleiensis</i>	-

Les légionelles sont des micro-organismes saprophytes qui peuvent devenir pour l'homme des pathogènes opportunistes.

Relation amibes libres – légionelles (3)(6):

Les légionelles sont des parasites intracellulaires facultatifs. Elles peuvent se multiplier extracellulairement, mais uniquement sur des milieux spécifiques riches. Le plus souvent, le développement est intracellulaire. Les légionelles doivent donc parasiter d'autres organismes pour se multiplier dans l'environnement. Les cellules hôtes sont des cellules humaines (cellules épithéliales respiratoires ou macrophages) ou des protozoaires ciliés.

C'est ainsi que les légionelles trouvent un mode de protection durable dans l'environnement en s'hébergeant dans des kystes d'amibes libres (*Acanthamoeba*, *Nacgleria fowleri*, *Hartmanella*) ou de protozoaires ciliés (*Tetrahymena*). Ces organismes permettent aussi leur multiplication.

Les amibes incorporent les légionelles dans leur cytoplasme, au sein de vésicules. Les légionelles sont capables de dissoudre la membrane de ces vésicules de digestion. Les légionelles peuvent ensuite provoquer l'éclatement de l'amibe et se disperser. Mais si les conditions environnementales sont défavorables, les légionelles survivent très longtemps dans les kystes de ces amibes.

Il existe une catégorie de légionelle appelée *Legionella* Like Amoebal Pathogens (LLAP) qui sont intracellulaires obligatoires.

23- Caractères morphologiques (15)(18):

Legionella est un bacille à Gram négatif, non sporulé, non encapsulé, de 0,2 à 0,9 μm de large sur 2 à 20 μm de long, mobile pour la plus part des espèces grâce à des flagelles situés en position polaire ou subpolaire. Toutefois, *L. faifieldensis*, *L. londoniensis*, *L. nautarum* et *L. oakridgensis* sont toujours immobiles.

Dans les échantillons cliniques, la taille des légionelles est faible (2 μm au maximum), alors que sur milieu de culture artificiel, les bactéries peuvent devenir filamenteuses (jusqu'à 20 μm). Dans les tissus, les légionelles sont immobiles.

Aspect des bactéries après coloration :

Issues de prélèvements cliniques, les légionelles se colorent en coloration de Diéterlé (par imprégnation argentique) en brun ou noir. Elles apparaissent en rouge par la coloration de Gimenez (à la fuschine et au vert malachite). Elles ne se colorent pas par les colorations de Gram ou Ziehl. Issues de cultures, les légionelles se colorent par la coloration de Gram.

Toutefois, la safranine seule ne colore que faiblement les légionelles. Il convient d'utiliser un mélange safranine + fuchsine ou de remplacer la safranine par de la fuchsine à 0,05%. (11)

24- Caractères cultureux et biochimiques (3):

Les légionelles sont des bactéries exigeantes à croissance lente.

Aérobies strictes, elles cultivent mieux en présence de CO₂ à 2,5%, ce gaz ayant un effet tampon intéressant. (11)

Le pH doit être stable aux environs de 6,9.

La température optimale de culture est de 35 à 37 ° C.

Fer et cystéine sont indispensables pour leur croissance. Elles nécessitent en plus d'autres acides aminés (arginine, acide L-glutamique) comme source de carbone et d'énergie.

Les caractéristiques biochimiques ont peu d'intérêt pour caractériser le genre *Legionella* ou pour différencier les diverses espèces. (11)

Elles n'oxydent pas et ne fermentent pas les sucres.

Les caractères biochimiques constants chez toutes les espèces de légionelles sont la présence d'une catalase, d'une gélatinase, d'une phosphatase acide, l'absence de nitratase, l'absence d'uréase.

Au contraire, l'oxydase n'est pas retrouvée parmi toutes les espèces, de même que la bêta-lactamase. *Legionella pneumophila* présente ces deux enzymes.

Le milieu de choix est la gélose BCYE (buffered charcoal yeast extract), milieu contenant du charbon (détoxifiant), de l'extrait de levure, du pyrophosphate de fer, de la cystéine (absolument indispensable à la croissance de la plupart des espèces de légionelles), de l'alpha céto glutarate et un tampon pH. Cette base peut être additionnée d'antibiotiques (polymixine B, vancomycine, cycloheximide) afin d'améliorer sa sélectivité vis à vis du genre *Legionella*.

Les légionelles sont capables de se multiplier dans des œufs de poule embryonnés et sur différents systèmes cellulaires.

Les LLAP ne cultivent pas sur milieu BCYE mais uniquement en réalisant des co-cultures avec des amibes.

En 2 à 14 jours (7j en moyenne) se développent des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, grises ou blanchâtres en vieillissant, muqueuses, luisantes, à aspect de verre fritté, translucides en périphérie, avec un bord net rosé. En les observant sous lumière UV à 366 nm, les colonies apparaissent fluorescentes.

Les colonies de *L bozemanii*, *L cherrii*, *L dumoffii*, *L gormanii*, *L parisiensis*, *L stcigerwaltii*, *L tucsonensis*, *L anisa*, présentent une fluorescence bleue. Une fluorescence jaune ou verte est obtenue avec *L birminghamensis* et *L wadsworthii* et une fluorescence rouge est observée avec des souches de *L crythra*, *L rubrilucens* et *L taurinensis*. (11)

En annexe 1 se trouvent des images et photographies de légionelles.

Le tableau n°3 montre les caractères cultureux et biochimiques de différentes espèces de *legionella*.

Tableau n°3 : Caractères cultureux et biochimiques de différentes espèces de légionelles. (1)

Espèces	oxydase	Catalase	gélatinase	Béta-lactamase	Besoin en cystéine
<i>L. anisa</i>	+	+	+	+	+
<i>L. birminghamensis</i>	+/-	+	+	+	+
<i>L. bozemanii</i>	-	+	+	+	+
<i>L. cincinnatiensis</i>	-	+	+	+	+
<i>L. dcumoffii</i>	-	+	+	+	+
<i>L. feeleii</i>	-	+	-	-	+
<i>L. gormanii</i>	-	+	+	+	+
<i>L. jordanis</i>	+	+	+	+	+/-
<i>L. longbeachae</i>	+	+	+	+	+
<i>L. maceachernii</i>	+	+	+	-	+
<i>L. micdadei</i>	+/-	+	-	-	+
<i>L. oakridgensis</i>	-	+	+	+/-	-
<i>L.pneumophila</i>	+	+	+	+	+
<i>L. sainthelensis</i>	+	+	+	+	+
<i>L. wadsworthii</i>	-	+	+	+	+

Particularité de la structure chimique de la paroi (12):

La structure chimique de la paroi des légionelles est particulière par le fait qu'elle est composée d'acides gras ramifiés, que l'on trouve normalement chez les bactéries à Gram positif. 90% des acides gras de la paroi des légionelles sont ramifiés. La composition en acides gras est spécifique de chaque espèce de *Legionella*.

Toxines produites :

Les légionelles produisent deux types de toxines, des endotoxines et des exotoxines.

Les exotoxines sont d'une part une hémolysine extra-cellulaire surtout active sur le sang de lapin et d'autre part une cytotoxine thermostable dirigée contre les cellules CHO. Cette exotoxine cytolytique a une activité phospholipase.

L'endotoxine produite par *Legionella pneumophila* est comme chez les bactéries Gram négatif portée par la paroi. Cette endotoxine est pyrogène et est responsable des complications de la maladie.

25- Caractères immunologiques (12):

Les caractères antigéniques des légionelles sont portés par différentes structures de la paroi. Deux groupes d'éléments de la bactérie sont antigéniques :

Sur la membrane externe, le LPS et la protéine majeure MOMP (Major outer membran protein).

Le LPS a une activité biologique de type endotoxine. Le polysaccharide du LPS est support de l'antigène O, celui-ci servant à différencier les sérogroupes.

La protéine majeure, MOMP est spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila*.

Les flagelles sont également immunogènes, et spécifiques du genre *Legionella*.

Les anticorps produits chez le malade sont en majorité dirigés contre le LPS.

26- Sensibilité aux antibiotiques et désinfectants (6):

In vitro, les légionelles sont sensibles aux désinfectants suivants :

<i>Agent chimique ou physique</i>	<i>Dose</i>
hypochlorite	5 à 15 ppm
Iodure, bromure	10 ppm
phénols	0.05%
glutaraldéhyde	0.03%
Chauffage à 58° C	30 minutes

In vitro, les légionelles sont sensibles aux antibiotiques suivants : érythromycine, rifampicine, céfoxitine, fluoroquinolones, péfloxacine, ciprofloxacine, ofloxacine, josamycine, aminosides (gentamicine, amikacine), chloramphénicol et cotrimoxazole.

La bêta-lactamase produite par *Legionella pneumophila* est plus active sur les céphalosporines que sur les pénicillines. La pénicilline-G et la céfalotine sont inactivées. *Legionella pneumophila* est sensible à la céfoxitine et céfuroxime. L'ajout d'acide clavulanique permet d'inhiber partiellement l'hydrolyse des bêta-lactamines.

Par contre, *Legionella pneumophila* est résistante à la colistine, vancomycine et aux lincosamides.

In vivo, les résistances proviennent essentiellement de la situation intra-cellulaire des légionelles. Les antibiotiques efficaces sont donc à pénétration intra-cellulaire, comme l'érythromycine, molécule de choix pour le traitement d'une légionellose.

3- Pathologie :

31- Physiopathologie (3)(4):

311- Modes de transmission et de contamination :

La transmission par voie aérienne est le mode privilégié dans l'acquisition d'une légionellose. L'inhalation d'aérosols contaminés est l'hypothèse retenue dans la majorité des cas. Les aérosols doivent avoir des gouttelettes de moins de 5 microns de diamètre pour pouvoir arriver au contact des bronchioles et des alvéoles.

Exemples d'expositions à risque : douches, bains à remous (thermalisme), climatiseurs, systèmes de ventilation assistée, nébuliseurs, ...

Les formes infectieuses sont les légionelles libres inhalées directement ou des amibes infectées elles-mêmes par des légionelles, formes beaucoup plus virulentes. A la lyse de l'amibe, une grande quantité de légionelles est alors libérée dans le système pulmonaire.

On pense même que l'exposition à des légionelles provenant d'amibes serait responsable des formes graves de légionellose, alors que les légionelles libres n'entraîneraient que des pathologies bénignes. (3)

Une étude a montré que la croissance de *Legionella pneumophila* dans une amibe la rendait dix fois plus invasive pour les macrophages alvéolaires et cent fois plus pour les cellules épithéliales que les souches issues de cultures.

La DMI (dose minimale infectieuse) reste toujours indéterminée chez l'homme.

Aucun cas de transmission interhumaine n'a été rapporté. L'existence d'un portage sain non plus.

L'hypothèse d'une contamination digestive a été posée dans quelques études. En effet, un traitement anti-acide augmenterait le risque en supprimant la barrière du pH acide de l'estomac. Les légionelles pénétreraient alors par le tissu lymphoïde intestinal et provoqueraient une bactériémie, responsable de la dissémination dans l'organisme par voie hématogène.

312- Pathogénicité, virulence (15):

Le pouvoir pathogène des légionelles a été étudié *in vitro* sur des modèles expérimentaux de type cultures cellulaires et sur l'animal. L'inoculation par aérosol reste la meilleure méthode puisqu'elle se rapproche du mode de contamination de l'homme. Sur culture cellulaire, l'inoculation est réalisée par mise en contact d'une suspension de légionelles sur une culture de macrophages alvéolaires, monocytes ou cellules d'embryons de poulet.

La virulence est conservée chez l'animal et sur culture cellulaire alors qu'elle diminue rapidement par culture sur milieu BCYE.

Les facteurs de virulence, plus ou moins bien connus, sont de différents types, toxiques ou éléments de la paroi.

Ainsi, le LPS favorise l'adhésion de *Legionella pneumophila*, intervient dans l'adaptation de la bactérie aux conditions environnantes et est indispensable à la multiplication. La protéine MOMP intervient dans la phagocytose de *Legionella pneumophila* dans les cellules (amibes ou macrophages alvéolaires).

Diverses enzymes sont impliquées dans le processus de résistance des légionelles aux macrophages alvéolaires.

Plusieurs toxines, plus ou moins bien étudiées interviennent dans l'activité cytotoxique de *Legionella pneumophila* ou en inhibant certains mécanismes de défense de l'hôte.

Les mécanismes d'invasion des cellules de mammifères et de protozoaires présentent de nombreuses analogies. Ces analogies suggèrent que les légionelles sont des parasites des protozoaires secondairement aptes à infecter l'homme. Les légionelles sont capables d'infecter les cellules humaines grâce à des mécanismes primitivement destinés à infecter les protozoaires. Les légionelloses ne seraient que des accidents liés au développement de techniques, telles que la climatisation générant des aérosols infectieux. (11)

313- Physiopathologie :

Les légionelles inhalées sont phagocytées par les macrophages alvéolaires. Là, les bactéries résistent aux enzymes lysosomiales et vont se multiplier puis provoquer l'éclatement des cellules. La destruction des macrophages et la dissémination des légionelles entraînent une alvéolite purulente,

souvent accompagnée d'hémorragies intra-alvéolaires, d'une réaction inflammatoire avec œdème et infiltrat de nombreux polynucléaires neutrophiles, macrophages et fibrine.

Par diffusion lymphatique, les légionelles sont retrouvées dans les ganglions pulmonaires et dans certains organes.

Par voie hématogène, les légionelles provoquent des bactériémies intermittentes, ainsi que des foyers d'infection secondaires (foie, rate, cœur, ...).

Au niveau pulmonaire, les lésions peuvent être importantes, pouvant aller jusqu'à l'abcès.

314- Réponse immunitaire (12):

Les légionelles étant des bactéries à développement intracellulaire, l'immunité à médiation cellulaire est le mécanisme de défense prédominant et le plus efficace, l'immunité à médiation humorale restant secondaire.

Au cours du mécanisme humoral, on observe une augmentation des immunoglobulines M et G. Ces protéines sériques activent le complément, et ces éléments réunis tentent de provoquer la phagocytose des bactéries par les polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes et macrophages, sans toutefois y parvenir dans de grandes proportions.

Une preuve de l'efficacité du processus d'immunité spécifique cellulaire est le pourcentage élevé de cas de légionelloses chez des personnes immunodéprimées (dont l'immunité cellulaire est réprimée volontairement ou non).

Les cellules immunitaires intervenant dans ce mécanisme sont les monocytes, macrophages et PNN. Les monocytes et macrophages phagocytent les légionelles avec l'aide du complément qui active l'opsonisation. les PNN intègrent eux aussi les bactéries mais les légionelles ingérées seront incapables de s'y multiplier.

Dans les premiers temps de l'infection, des cytokines sont sécrétées. L'interféron Gamma permet de limiter la multiplication des légionelles.

Les cellules Natural-Killer viennent ensuite détruire les macrophages infectés.

32- Clinique (3)(6)(1):

321- Forme clinique grave : La maladie du Légionnaire :

- Phase d'incubation :

Cette phase dure 2 à 10 jours, habituellement 5 à 6 jours.

- Phase d'invasion :

Un tableau de syndrome pseudo-grippal non spécifique se met brutalement en place et dure 12 à 48 heures, avec fièvre modérée, céphalées, myalgies et asthénie.

- phase d'état :

⇒ Syndrome infectieux :

Fièvre élevée en plateau à 39-40° C

Frissons, sueurs, asthénie

Céphalées, myalgies

⇒ Pneumonie :

Toux sèche précoce et douloureuse qui peut devenir productive d'expectorations mucopurulentes voire hémoptoïques.

Douleurs thoraciques.

Dyspnée (pouvant aller jusqu'à la détresse respiratoire aiguë).

Râles crépitants à l'auscultation en cas d'épanchement pleural.

Image de pneumonie atypique diffuse sur la radiographie avec des opacités alvéolaires unilatérales puis bilatérales.

Ni la radiographie ni les signes cliniques ne sont spécifiques d'une légionellose par rapport à d'autres pneumonies atypiques.

L'examen des gaz du sang révèle une hypoxie, hypocapnie, et alcalose respiratoire.

⇒ Signes digestifs :

Présents dans 50% des cas, ils apparaissent rapidement avec des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhée cholériforme, pouvant entraîner une déshydratation.

⇒ Signes neurologiques :

Céphalées, hallucinations, obnubilation, agitation, tremblements, confusion, désorientation, crises convulsives, symptômes dus à une hypoxie cérébrale.

⇒ Evolution :

L'évolution est en général favorable en 2 semaines sous traitement antibiotique. Un diagnostic et un traitement précoce améliorent l'évolution. Le pronostic de la maladie dépend en grande partie de l'état immunitaire du malade. Le taux de létalité est de 10 à 15% chez les sujets immunocompétents et de 80% chez l'immunodéprimé.

Une insuffisance rénale aiguë ou une détresse respiratoire sont de mauvais pronostic pour le malade.

⇒ Complications extra-pulmonaires :

Atteintes cardiaques (bradycardie, myocardites, péricardites, endocardites).

Rhabdomyolyses.

Atteintes digestives.

Atteintes cutanées.

Atteintes rénales.

Atteintes hépatiques.

322- Forme clinique bénigne : la fièvre de Pontiac :

Cette forme de légionellose est due aux espèces suivantes : *Legionella pneumophila* sérogroupes 1 et 6, *Legionella anisa*, *Legionella feclcii*, *Legionella micdadci*.

D'incubation courte (5 à 70 heures avec une moyenne à 36 heures), le tableau clinique se caractérise par un syndrome pseudo-grippal pauci symptomatique : fièvre, rhinite, mal de gorge, irritation oculaire, céphalées, etc. Ces signes sont accompagnés d'une toux sèche.

Le fièvre de Pontiac touche uniquement les voies aériennes supérieures, sans pneumopathie. La radiographie pulmonaire est normale.

La guérison est spontanée et rapide en 2 à 5 jours.

Le diagnostic est le plus souvent rétrospectif par sérologie ou antigénurie, dans un contexte épidémiologique.

Tableau n°4 : Manifestations cliniques des légionelloses (1)

	Maladie du légionnaire	Fièvre de Pontiac	Localisations extra-pulmonaires
Mortalité	15-20%	0%	Atteintes : Hématologiques Neurologiques Cardiaques Musculaires Digestives Rétinite, sinusite
Incubation	2-10 j	1-2 j	
Symptômes	Fièvre, toux, myalgies, céphalées, douleurs thoraciques, diarrhée, confusion	Syndrome grippal	
Poumon	Pneumopathie, pleurésie, abcès pulmonaire	-	
Rein	Désordres rénaux : protéinurie, hématurie, insuffisance rénale	-	
Foie	Peu de symptômes	-	
Tube digestif	Diarrhée aqueuse, douleurs abdominales, nausées, vomissements	-	
Système nerveux central	Somnolence, délire, désorientation, confusion	-	

33- Diagnostic (3)(1)(4):

331- Diagnostic clinique :

Les signes cliniques n'étant pas spécifiques d'une légionellose, on préfère les associer aux autres méthodes diagnostiques.

332- Radiographie pulmonaire :

La radiographie thoracique montre rapidement après le début de la phase d'état des opacités d'abord uni puis bilatérales, correspondant à des infiltrats alvéolaires diffus, mal délimités.

La diffusion des infiltrats continue même après le début du traitement antibiotique et ne concorde pas avec la sévérité du tableau clinique.

La radiographie pulmonaire redevient normale 1 à 4 mois après la maladie.

333- Diagnostic biologique :

<u>Paramètres recherchés</u>	<u>Evolution ou valeur</u>
VS	> 100mm à la 1 ^{ère} heure
CPK	> 175 U/L
Transaminases	Augmentées
Lymphocytes	< 1000 / mm ³
Leucocytes	Augmentés
Natrémie	< 130 mmol/ L
Protéinurie	Positive
Albuminémie	Diminuée
Urémie	Augmentée
Hématurie microscopique	

334- Diagnostic bactériologique :

Il a pour but de confirmer l'orientation clinique ou radiologique d'une légionellose en identifiant le micro-organisme responsable. Il permet ainsi la prescription d'un traitement antibiotique efficace ou le plus souvent de réadapter un traitement initialement mis en place. On distingue des méthodes de diagnostic direct, par recherche de l'agent infectieux lui-même ou de diagnostic indirect, par recherche d'anticorps dirigés contre cet agent.

↔ Diagnostic direct :

Les prélèvements cliniques sont divers : crachats, ponctions trachéales, biopsie pulmonaire, aspirations trachéales ou bronchiques, liquide pleural et surtout lavage broncho alvéolaire. Ce dernier mode de prélèvement, le mieux protégé des contaminations par la flore commensale des voies aériennes supérieures, doit toujours être privilégié.

Lors de complications extra-pulmonaires, on peut également mettre en évidence la bactérie dans les épanchements péricardiques et péritonéaux, dans les prélèvements d'abcès, dans les biopsies d'organes infectés, dans les hémocultures, les coprocultures et les urocultures.

Examen direct :

Issues de prélèvements cliniques, les légionelles ne se colorent pas par la coloration de Gram mais apparaissent par la technique d'imprégnation argentique de Diéterlé.

Culture :

C'est la méthode de référence pour la mise en évidence des différentes espèces de *Legionella*, mais c'est aussi la plus longue et la plus délicate pour un opérateur non expérimenté. Le milieu de culture est la gélose BCYE (Buffered charcoal yeast extract). Après incubation à 37 ° C, en 3 à 10 jours se développent les colonies caractéristiques de légionelles, qui pourront ensuite être identifiées par leurs caractères cultureux et biochimiques ou par immunofluorescence directe ou agglutination.

En cas de contamination par la flore commensale, une acidification ou un chauffage de l'échantillon permettent d'améliorer la sélectivité de la culture.

La mise en culture a une bonne spécificité (100%) mais une faible sensibilité (40-60%).

Immunofluorescence directe :

Cette méthode, rapide, consiste à mettre en présence de l'échantillon des anticorps mono ou polyclonaux marqués à la fluorescéine dirigés contre les antigènes de *Legionella*. Cette méthode est peu sensible et nécessite une concentration importante de légionelles dans l'échantillon clinique (Seuil de Détection (SD) = 10^4 UFC/L).

Il existe des réactions croisées avec d'autres germes.

Avantage : Rapidité d'exécution (1 à 2 h)

Inconvénients : Faible sensibilité (25-40%) avec seuil de détection élevé (10000 UFC/L) et spécificité moyenne (60-70%).

Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR permet d'amplifier deux gènes : un gène de virulence mip et un gène rrf. Les produits de la PCR sont ensuite hybridés par des sondes nucléiques.

La présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase peuvent fausser la réaction.

Antigénurie :

Sur un échantillon d'urine de malade, on recherche les antigènes solubles de *Legionella* par méthode immunoenzymatique (ELISA), radioimmunologique (RIA) ou par agglutination.

Cette méthode a une bonne sensibilité et spécificité pour *Legionella pneumophila* 1.

Les antigènes solubles apparaissent dès les premiers symptômes et restent longtemps présents, même après le début d'un traitement antibiotique. Donc cette méthode permet de confirmer le diagnostic après traitement.

Ce test est en plus très rapide et très facile à mettre en œuvre.

Sensibilité : 80% (pour LP1)

Spécificité : 99%

Avantages : Précocité de la positivité de la réaction, recueil facile des urines, rapidité technique, détection possible des antigènes même après antibiothérapie et détection tardive possible plusieurs semaines à plusieurs mois après la pneumopathie.

Inconvénients : Facilité d'utilisation occultant la culture et test valable uniquement pour *Legionella pneumophila* sérotype 1.

Tableau n°5 : Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative des méthodes de diagnostic de la légionellose (1)

Méthode	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Culture	62	100		
Culture sur LBA ou sécrétions bronchiques	80-90	100		
Culture sur biopsie pulmonaire	90-99	100		
Culture sur sang	10-30	100		
Antigènes urinaires	56	99	86	95
Immunofluorescence directe	25-70	65		
Sur biopsie pulmonaire	80-90	99		
Sur LBA ou sécrétions bronchiques	25-75	95-99		
Sérologie avec augmentation du titre	75	95-99		
Sérologie avec titre unique élevé précoce	10	94	15	91
Sérologie avec titre unique élevé tardif	65	94	54	96

⇒ Diagnostic indirect : Sérologie :

On recherche dans le sérum des malades la présence d'anticorps anti *Legionella* (anti LPS) et leur titre.

Les anticorps sont détectables à partir de 2 semaines environ après le début de l'infection (quelquefois pas du tout chez l'immunodéprimé). On dispose d'antigènes mono ou polyvalents. La spécificité de la sérologie est bonne dans le cas de *Legionella pneumophila* 1 mais la sensibilité est faible. Il existe des réactions croisées avec d'autres espèces de *Legionella* ou d'autres bactéries.

Un test est positif s'il y a augmentation du titre d'anticorps (fois 4) sur deux échantillons prélevés à 3 semaines d'intervalle avec un deuxième titre de 128 minimum pour *Legionella pneumophila* 1 à 6 et 256 minimum pour les autres *Legionella*, ou un titre unique supérieur à 256 quelque soit l'espèce.

La sérologie permet également d'étudier la séroprévalence de la maladie dans une population. En dehors de toute épidémie, la séroprévalence de *Legionella pneumophila* dans la population générale ne dépasse pas 2,5%. pour les autres *Legionella*, elle peut être plus élevée (14% pour *Legionella bozcmanni*).

34- Traitement :

L'érythromycine est le traitement de référence de la légionellose. Son activité intracellulaire la place en première intention chez des patients dont la légionellose est diagnostiquée de façon certaine au moment de l'installation du traitement antibiotique. Cependant, en pratique clinique, on instaure d'emblée, devant un tableau de pneumonie, une antibiothérapie probabiliste visant à toucher à la fois les germes extracellulaires comme les pneumocoques et les intra-cellulaires comme les légionelles. Les recommandations de la SPILF (Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française) sont les suivantes (66):

Devant un tableau de pneumonie et en cas de suspicion de légionellose :

Amoxicilline/acide clavulanique + macrolide

Ou Amoxicilline + ofloxacine

Ou Ceftriaxone + macrolide

Ou Quinolone antipneumocoque

Devant un tableau de pneumonie et en cas de suspicion de légionellose chez un patient en réanimation :

Amoxicilline/acide clavulanique ou Ceftriaxone

+ Macrolide ou quinolone antipneumocoque

+ rifampicine

Le tout par voie parentérale.

En pratique, le macrolide utilisé est toujours l'érythromycine à la dose de 1 à 3 g/24h. Cependant, cette molécule présente une toxicité importante (66):

- veinite en cas de voie IV
- Troubles digestifs importants : diarrhée
- Toxicité hépatique
- Interactions médicamenteuses avec la ciclosporine et les dérivés de l'ergot de seigle
- Ototoxicité

On préfère donc utiliser les quinolones et en particulier celles actives sur le pneumocoque (65):

Levofloxacin (TAVANIC ®) : 500mg/24h

Moxifloxacin (IZILOX ®) : 400mg/24h

Leur toxicité est moindre et elles sont par conséquent beaucoup mieux tolérées.

En conclusion, le traitement de référence d'une légionellose est l'érythromycine associée à la Rifampicine. Le traitement alternatif est une quinolone antipneumocoque associée à la Rifampicine (65)(66).

2^{ème} Partie : Epidémiologie des légionelloses nosocomiales :

Le nombre de cas de légionelloses déclarés a été multiplié par un facteur dix en cinq ans et des épidémies sont rapportées de plus en plus souvent. La progression des déclarations reflète les efforts entrepris pour détecter, diagnostiquer, prendre en charge, prévenir, contrôler et surveiller cette maladie. La déclaration précoce par les cliniciens aux DDASS (Directions départementales des affaires sanitaires et sociales), la lutte contre les légionelloses nosocomiales, la collaboration entre CNR (Centre national de référence), DDASS et INVS (Institut national de veille sanitaire) et la médiatisation des épidémies récentes ont fait progresser le taux de notification de près de 32% chaque année. Mais surtout ces progrès permettent de détecter plus de cas groupés et d'épidémies, auparavant ignorés, et de ce fait de mieux maîtriser de nouvelles sources de contamination, notamment les tours aéroréfrigérantes. Les progrès de la surveillance de la légionellose ont débouché sur un renforcement de la prévention mais des incertitudes demeurent. Les mesures visent le risque épidémique et nosocomial alors que plus de la moitié des cas sont isolés sans source identifiée.

Les légionelloses apparaissent sous trois formes épidémiologiques :

- Les **épidémies**, caractérisées par une augmentation brutale de l'incidence de la maladie sur une durée brève.
- Les **endémies**, au cours desquelles l'incidence augmente lentement et sur une période plus ou moins longue. Elles résultent de retards de diagnostics ou de difficultés d'éradication de la source de contamination.
- Les **cas sporadiques**, qui représentent entre 65 et 80% des cas totaux. (3)

1- Caractéristiques épidémiologiques des légionelloses :

11- Fréquence, incidence des légionelloses :

Le tableau n° 6 et le graphique n° 1 montrent l'évolution de la fréquence des légionelloses déclarées en France entre 1995 et 2001.(32 à 41)

Tableau n° 6 : Nombre de cas totaux et nosocomiaux français de 1995 à 2001.

Année	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Nombre de cas	55	80	213	381	440	610	807
Cas nosocomiaux			18%	21%	18%	19%	13%

Le graphique n° 1 fait bien apparaître la brusque augmentation en 1997 non pas du nombre de légionelloses mais des cas déclarés de la maladie. Cette meilleure déclaration des cas se poursuit régulièrement depuis 1997.

En 1997, l'incidence a été en France de **0,35 pour 100000 habitants**. Elle est multipliée par 2,5 par rapport à 1996. En effet, la circulaire de 1997 a sans aucun doute eu un effet très bénéfique en permettant une prise de conscience de la part des médecins et donc une meilleure déclaration des cas. (6)(29)(26)

En 1998, avec 381 cas déclarés, l'incidence était de **0,63 pour 100000 habitants**. Elle est encore multipliée par 1,6 par rapport à 1997. En 1998, l'incidence de la maladie en Europe était inférieure (0,43 pour 100000) (29)(30)(6)(31)(36).

En 1999, 445 cas ont été notifiés en France, soit un taux d'infection de 7,6 cas par million d'habitants (contre 5,4 cas par million pour l'Europe) (11). L'incidence (**0,73 pour 100000**) est donc stable par rapport à 1998. Elle est en France plus forte qu'en Europe (0,5 pour 100000), mais ces chiffres dépendent de la qualité du système de surveillance (voir ce chapitre).

En 2000, 610 cas ont été déclarés en France. L'incidence était de **1,0 pour 100000** (38).

En 2001, 807 cas ont été déclarés, ce qui donne une incidence de **1,35 pour 100000**. L'incidence en Europe est toujours plus faible (0,6 pour 100000) (39).

Les taux d'attaque (nombre de malades par rapport au nombre de personnes exposées) sont de 0,1 à 5% pour la forme grave de la maladie du légionnaire, et de 95 % pour la fièvre de Pontiac.(20)(6)

Enfin, la distribution des cas de légionellose au cours de l'année fait apparaître un caractère saisonnier. En moyenne, plus de 50% des cas annuels se déclarent entre Juin et Octobre (29)(30)(6)(32 à 41).

Le graphique n°2 montre la distribution mensuelle des cas apparus en France au cours des années 1997 et 1998 (36).

Cette distribution annuelle des cas est semblable quelle que soit l'année. On a toujours une augmentation des cas vers le mois de juin et une baisse progressive jusqu'à la fin de l'année. Les pics correspondent à des épidémies.

12- Létalité :

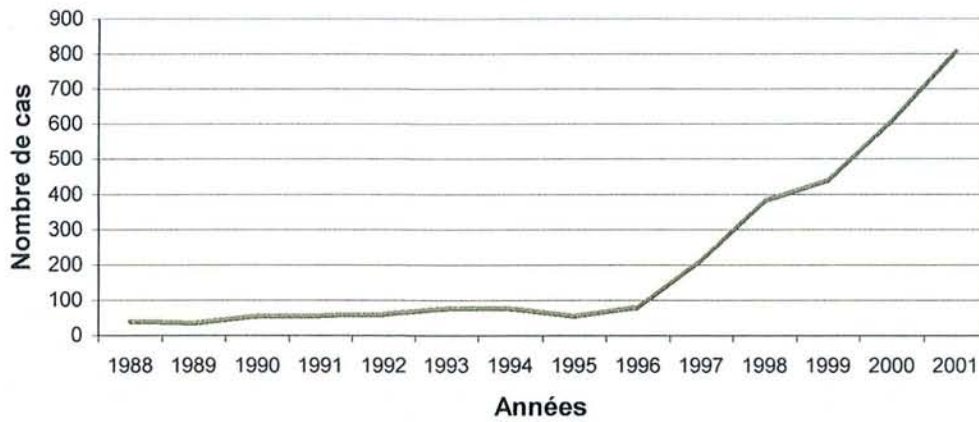
Le taux de létalité de la maladie est d'environ 20%, constant depuis quelques années. Ce taux est relativement élevé, mais les cas décédés sont probablement mieux déclarés. (29)(11)(26)

Le tableau n° 7 et le graphique n° 3 indiquent les pourcentages de décès parmi les cas annuels déclarés en France. (32-41)

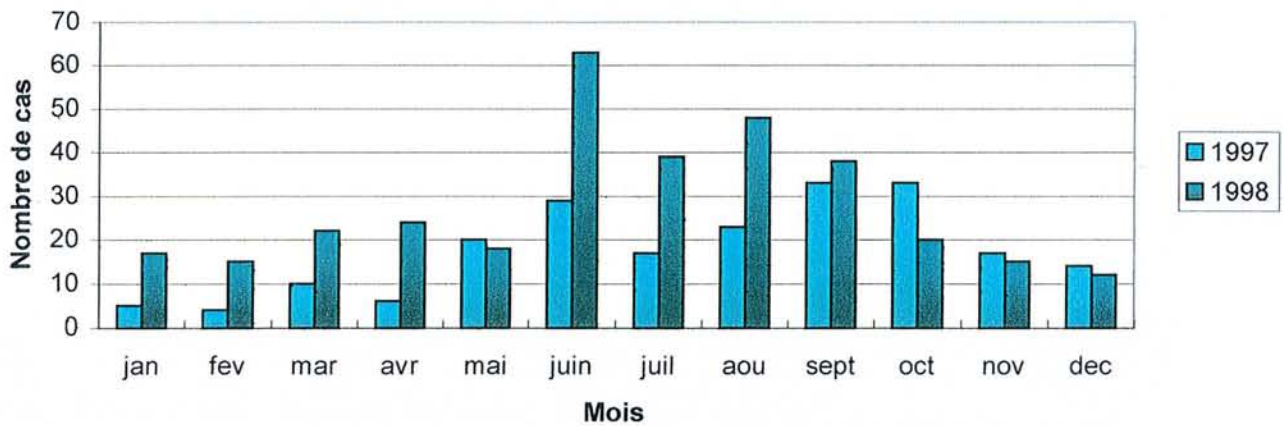
Tableau n° 7 : Taux de létalité annuels de la légionellose en France de 1996 à 2001.(32-41) ,

Année	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Létalité (en % des cas totaux)	16	20	23	20	25	19.9

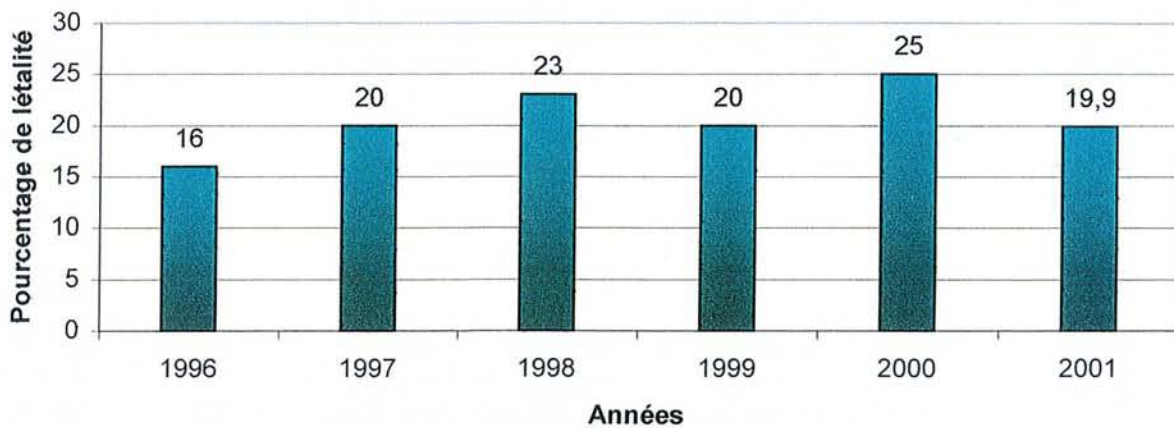
Graphique n° 1 : évolution des cas déclarés de légionelloses en France entre 1988 et 2001 (39)



Graphique n°2 : Distribution mensuelle des cas - France 1997-1998



Graphique n°3 : pourcentages de létalité en fonction de l'année



13- Distribution de la maladie en fonction de l'âge et du sexe :

L'âge médian est très constant, aux alentours de 57 ans. Les extrêmes varient de façon importante d'une année à l'autre surtout en ce qui concerne l'extrême inférieur. Il s'agit souvent de cas nosocomiaux d'enfants, hospitalisés pour transplantations ou hémopathies graves.(29)

Le sex-ratio est également stable vers 3. Ainsi, en 1999, 65% des malades étaient des hommes, contre 28% de femmes.(11)

Dans les deux groupes (hommes et femmes) , l'incidence augmente avec l'âge. Jusqu'en 1999, elle était maximale dans le groupe 70-79 ans. En 2000 et 2001, elle était maximale chez les plus de 80 ans (38)(39). Cette tendance devra être vérifiée pour les prochaines années.

50% des cas ont plus de 50 ans.

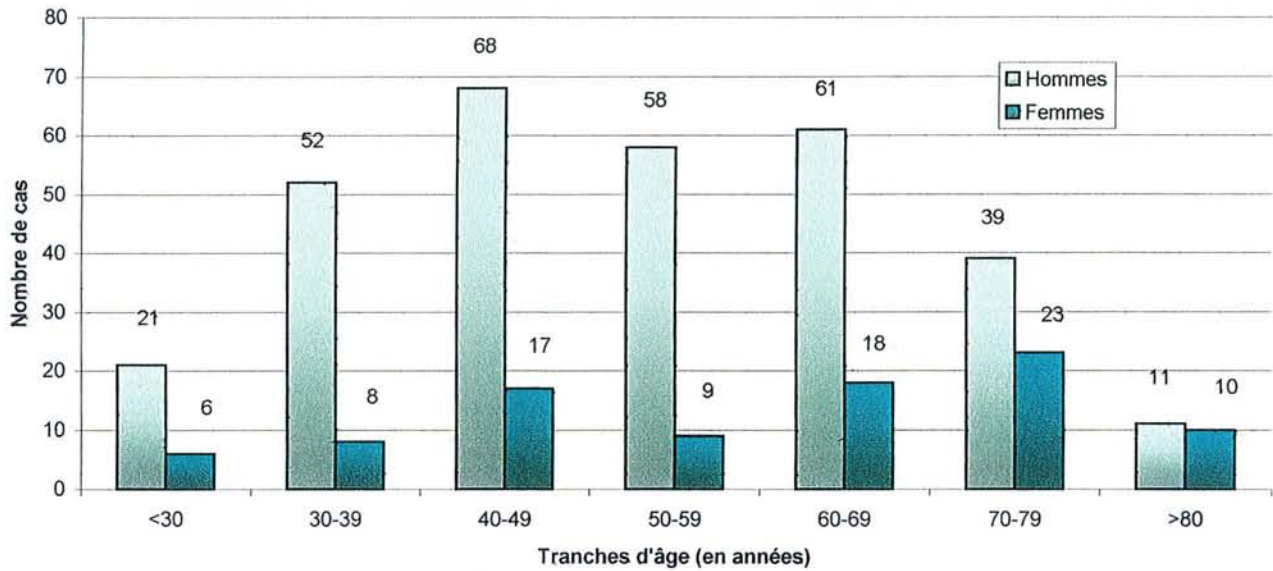
Le rapport d'incidence Hommes/Femmes est assez constant. Il était de 4,2 en 1997, de 3,4 en moyenne pour la période 1988 à 1996, et en 2001 de 3,1. Ce rapport augmente jusqu'à 60 ans et diminue ensuite. (3)

Le graphique n° 4 représente la distribution du nombre de cas en fonction de l'âge des malades en France en 1999 (3).

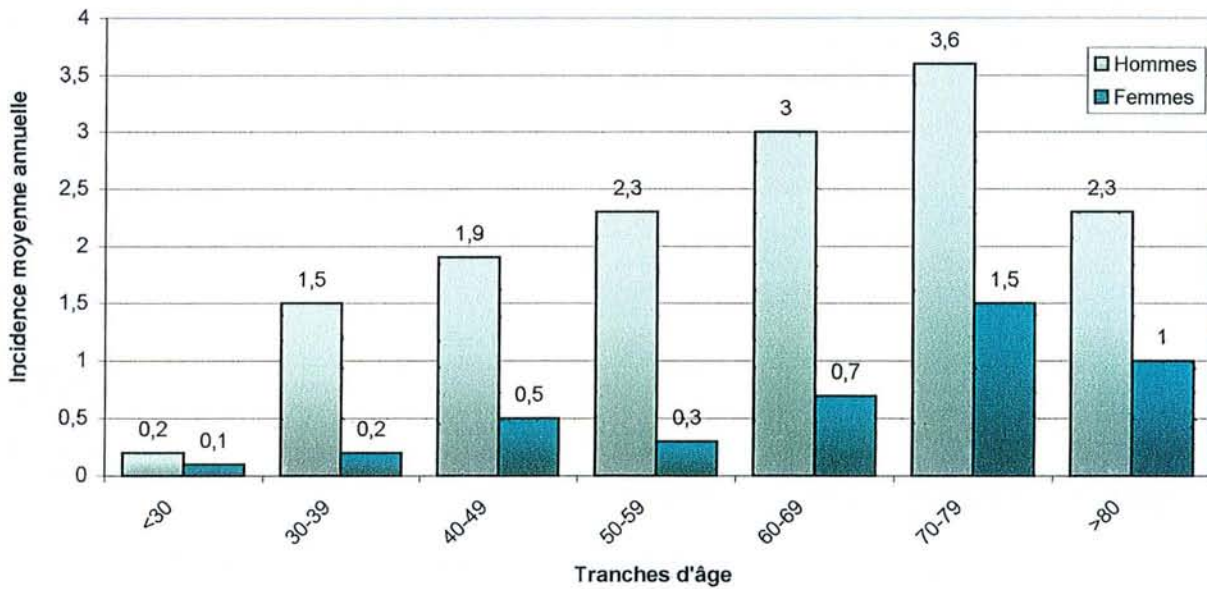
Le graphique n° 5 représente la distribution de l'incidence moyenne annuelle en fonction de l'âge en France en 1999. (3)

Le graphique n°6 montre l'évolution de l'incidence en fonction de la tranche d'âge en France en 2001 (39).

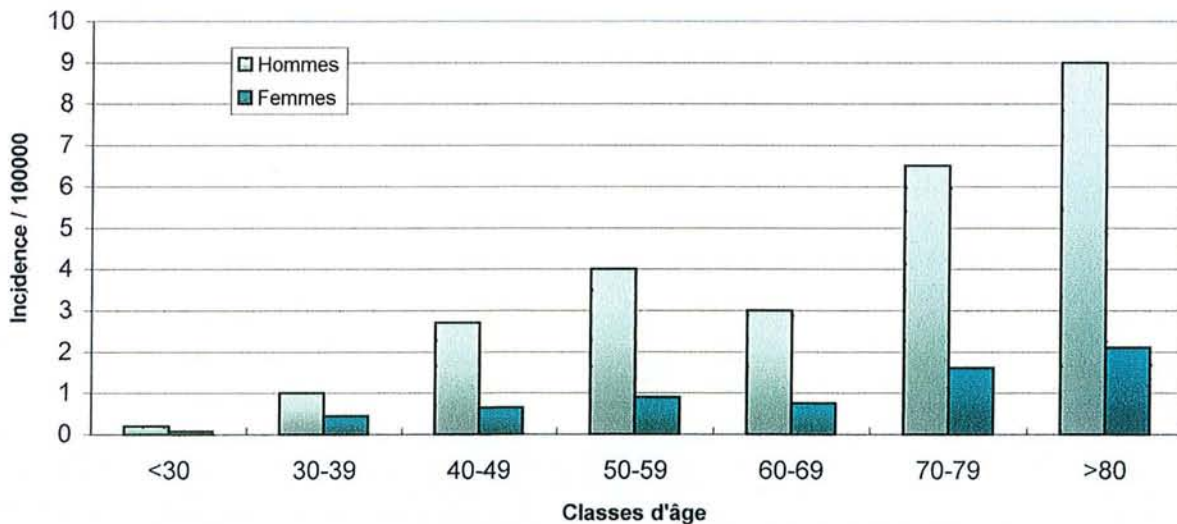
Graphique n°4 : Distribution du nombre de cas en fonction de l'âge en 1999.



Graphique n°5 : Distribution de l'incidence en fonction de l'âge en 1999.



Graphique n°6 : Taux d'incidence de la légionellose par classes d'âge, France, 2001



Le tableau suivant donne pour les années 1998 et 1999 l'âge médian, le sex-ratio, la létalité et la présence de facteurs de risques. (31)

Tableau n° 8 : âge médian, sex ratio, létalité et facteurs de risque pour les cas notifiés des années 1998 et 1999 en France.

	Age médian	Sex ratio	décès	Facteurs de risque
1998 (381 cas)	56	3.1	22%	63%
1999 (440 cas)	57	2.8	20%	68%

14- Répartition en fonction des facteurs de risque :

Le tableau n° 9 indique les pourcentages de facteurs prédisposants parmi les cas de légionellose déclarés en France entre 1988 et 2001. (32-41)

Tableau n° 9 : Facteurs prédisposants parmi les légionelloses déclarées- France 1988-2001

Facteurs de risque *	1988-95	1996	1997	1998	1999	2000	2001
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Cancer/hémopathie	8	9	13	12	16	13	11
Corticothérapie/immuno-suppresseurs	11	6	13	13	7	13	12
Diabète			6	7	9	11	10
Tabagisme			32	37	41	40	40
Autres	26	17	20	24	20	21	22
Au moins un facteur	42	32	62	67	68	72	69

* Non mutuellement exclusif

Un ou plusieurs facteurs de risque sont retrouvés dans 60% des cas en moyenne. Parmi ces facteurs de risque, un cancer ou une hémopathie sont retrouvés dans 10% des cas, une corticothérapie ou tout autre traitement immunosuppresseur dans 10% des cas, un diabète dans 10%, un tabagisme dans

40% des cas et l'alcoolisme est présent entre autre facteur de risque chez moins de 10% des malades (29). Ces chiffres varient très peu d'une année sur l'autre depuis 1988, ce qui fait penser que les "patients à risque" pour une légionellose sont les mêmes depuis longtemps.

Le tableau n° 10 compare la distribution des cas déclarés selon la présence ou non de facteurs de risque. (38)

Tableau n° 10 : Comparaison des cas déclarés en France en 2000 selon la présence ou non de facteurs de risques.

Caractère étudié	Cas avec facteurs de risque	Cas sans facteur de risque	Liaison entre la présence de facteurs de risque et le caractère étudié
Moyenne d'âge	57,6 ans	64,5 ans	Liaison démontrée
Sexe masculin	79,4%	66,1%	Liaison démontrée
Décès	25,7%	23,1%	Liaison non établie
Cas nosocomiaux	22,9%	10,9%	Liaison démontrée

Les malades qui présentaient des facteurs de risque sont significativement plus jeunes que les autres et sont plus souvent des hommes. Les cas de légionellose nosocomiale présentent plus souvent des facteurs de risque. Par contre, la létalité ne semble pas être reliée à la présence de facteurs prédisposants.

15- Répartition en fonction des expositions à risque :

La proportion des légionelloses parmi les pneumopathies communautaires est estimée à 0.5 à 5%. Cette proportion est nettement supérieure parmi les pneumopathies nosocomiales puisque les légionelloses en représentent 15 à 25%. (20)(6)

Selon une étude sur la population hospitalière française, les légionelloses représentent entre 6 et 10% des pneumopathies nécessitant une hospitalisation. (26)

Un classement des cas est effectué chaque année en fonction de l'origine de la contamination. Ainsi en 1999 en Europe, 32% des cas étaient communautaires, 9% nosocomiaux et 21% dus à des voyages.

En 1998, parmi les 381 cas déclarés, 21% ont rapporté un séjour en hôpital avant ou pendant la maladie, 11% un séjour en hôtel ou camping, 2% une cure thermale, 1% un établissement de santé, 5% un voyage à l'étranger et 10% la fréquentation d'une maison de retraite, d'un lieu de travail ou d'un lieu de loisirs (piscines, ...). (29)

Le tableau n° 11 indique les expositions à risque parmi les légionelloses déclarées depuis 1988 (32-41).

Tableau n° 11 : Expositions à risque parmi les cas de légionellose déclarés- France- 1988-2001

Exposition à risque	1988-95	1996	1997	1998	1999	2000	2001
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Station thermale	5	4	4	2	1	1	1
Hôtel/camping	9	10	21	11	10	9	11
Hôpital	17	16	18	21	17	20	13
Etablissement de santé			2	1	1	1	2
Voyage				5	5	3	4
Résidence temporaire							3
Travail							4
Autre	21	17	5	10	11	15	
Au moins une	47	47	50	50	46	48	42

Le graphique n° 7 représente l'évolution des taux de différentes expositions à risque parmi les cas de légionelloses déclarées en France entre 1988 et 2001.

Ce graphique montre que l'origine thermale des légionelloses est minime par rapport aux autres causes et en régression. Nous remarquons que cette diminution des cas reflète les efforts entrepris par les établissements thermaux dans la lutte contre la légionellose. Elle est à saluer étant donné le suivi épidémiologique poussé imposé à ces établissements.

En dehors de l'année 1997 au cours de laquelle plusieurs épidémies de légionelloses dans des hôtels s'étaient déclarées, les cas liés à des hôtels ou des campings représentent en général la moitié des cas nosocomiaux.

En ce qui concerne l'année 2001, il semblerait que la part des cas nosocomiaux baisse. Cette tendance devra être confirmée au cours des années à venir.

Le tableau n° 12 compare les cas Français de l'année 2000 selon leur caractère nosocomial ou non (38).

Tableau n° 12 : Comparaison des cas de légionellose déclarés selon le caractère nosocomial ou non- France, 2000 (38).

Caractère étudié	Cas nosocomiaux	Cas non nosocomiaux	Liaison entre le caractère nosocomial et le caractère étudié
Moyenne d'âge	64,6 ans	58,4 ans	Liaison démontrée
Sexe masculin	67,7%	77,4%	Lien non démontré
Décès	41,4%	21%	Liaison démontrée
Présence de facteurs favorisants	84%	68,4%	Liaison démontrée

Les cas nosocomiaux sont significativement plus âgés que les cas communautaires, ils sont plus souvent létaux et présentent plus souvent des facteurs prédisposants.

16- Répartition en fonction des espèces et sérogroupes

Le tableau suivant présente les différentes espèces de *Legionella* retrouvées parmi les cas déclarés de légionellose de 1988 à 2001 en France.

Tableau n° 13 : espèces et sérogroupes de *Legionella* parmi les cas déclarés- France, 1988-2001 (32-41).

Espèce	1988-96		1997		1998		2000	
	%	n	%	n	%	n	%	n
<i>Legionella pneumophila</i>	47	227	90	186	97	306	98	480
LP 1	26	126	75	154	80	251	81	396
LP autres sérogroupes	12	57	12	24				
LP séro groupe non précisé	9	44	4	8				
<i>Legionella</i> autres espèces	5	25	4	8				
<i>Legionella</i> espèce non précisée	48	234	6	12				
Total	100	486	100	206	100	315	100	488

Légende : LP : *Legionella pneumophila*

Alors qu'en 1996 *Legionella pneumophila* représentait environ 50% des légionelloses, en 2001 cette espèce était responsable de 98% des cas déclarés. Cette souche est-elle plus souvent responsable de la maladie ou plus souvent recherchée ? La même question se pose pour le seul sérotype 1 de cette espèce qui représente 80% du total des souches retrouvées chez les malades. Ces chiffres sont très différents de ceux trouvés en Europe. En effet, en 1999 pour l'Europe, *Legionella pneumophila* 1 a été responsable de 65% des cas, d'autres sérotypes de *Legionella pneumophila* de 30% des cas et d'autres *Legionella* de 5% des cas. (11) Sachant que le diagnostic en France se fait de plus en plus par détection de l'antigène urinaire de *Legionella pneumophila* sérotype 1, on peut penser qu'il y a une surévaluation de ce sérotype et de l'espèce *Legionella pneumophila* parmi l'ensemble des légionelloses. Ainsi, dans bon nombre de cas, le diagnostic n'est fait que sur détection de l'antigène urinaire. On comprend bien ici l'intérêt de la culture du germe, malheureusement trop souvent absente.

Dans l'environnement, on retrouve 40 à 50% de *Legionella pneumophila* 1, 30% de *Legionella pneumophila* d'autres sérotypes et 20 à 30% d'autres espèces de *Legionella*.(6)

17- Répartition en fonction des méthodes de diagnostic :

Le tableau suivant indique la répartition des cas déclarés de légionellose en France par type de diagnostic (35)(36)(39).

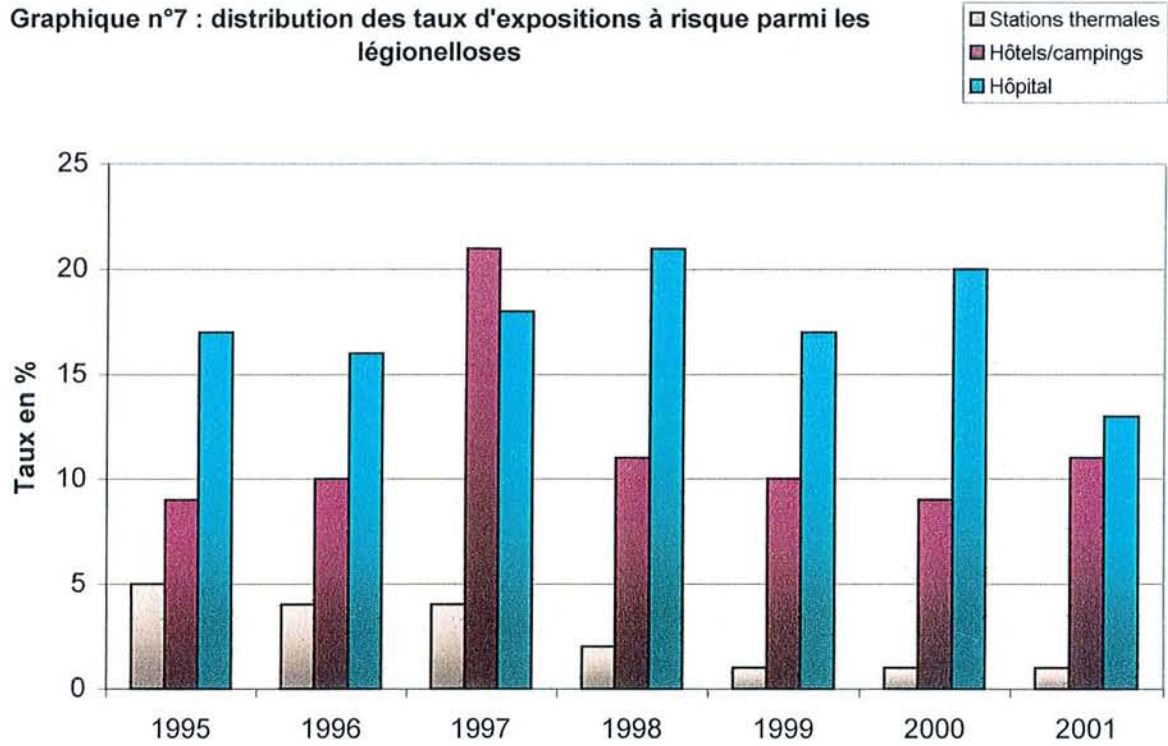
Tableau n° 14 : Répartition des cas déclarés de légionellose en France par type de diagnostic.

Méthode diagnostique	1988-95	1996	1997	1998	1999	2000	2001
	En % de cas	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Isolement	33	36	29	26	16	22	20
Séroconversion *	50	53	41	30	20	22	15
Antigène urinaire			17	27	47	43	54
Immunofluorescence			5	3	4	3	1
Titre unique élevé			8	14	12	10	10
PCR					1 (CNR)	0	0
Non précisée	17	10					

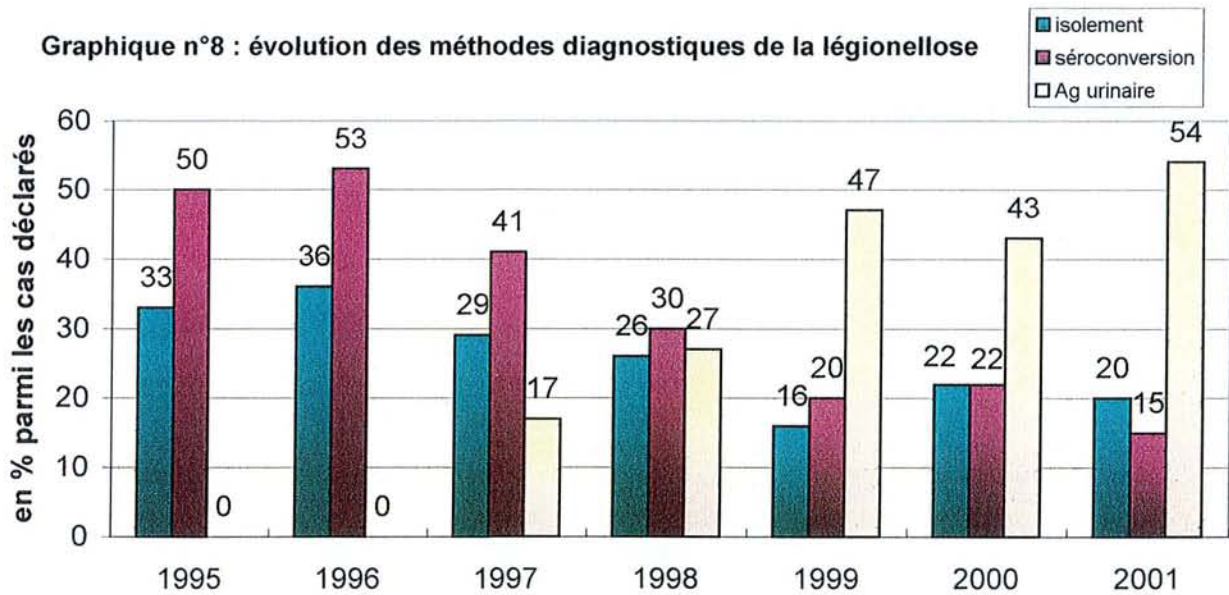
* Avant 1997, séroconversion et titre unique élevé n'étaient pas différenciés.

Le graphique n° 8 montre l'évolution des différents types de diagnostics parmi les cas de légionellose déclarés.

Graphique n°7 : distribution des taux d'expositions à risque parmi les légionelloses



Graphique n°8 : évolution des méthodes diagnostiques de la légionellose



18- Prévalence des légionelles dans les réseaux d'eau et tours aéroréfrigérantes :

Une étude réalisée en 2000 par la DRASS d'Aquitaine et la DDASS de Gironde a montré les résultats suivants (26) :

→ Prévalence des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire d'établissements de santé et d'établissements recevant du public :

- 32% des analyses effectuées sont positives
- 16% des analyses sont supérieures à 1000 UFC/L
- Dans les établissements de santé, 34,3% des analyses sont positives et 21,8% des résultats sont supérieurs à 1000 UFC/L.
- Dans les établissements recevant du public, 26,8% des analyses sont positives et 12,5% supérieures à 1000 UFC/L.

Ces résultats montrent bien l'omniprésence des légionelles dans les réseaux d'eau et annoncent la difficulté de la gestion du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

Le même type d'enquête a été effectuée par le laboratoire d'hygiène de la ville de Paris sur les tours aéroréfrigérantes (TAR) des établissements recevant du public. 75% des tours contrôlées ont révélé un taux de Légionelles supérieur à 100UFC/L, 20% étant compris entre 100 et 1000UFC/L, 30% entre 1000 et 10000 UFC/L et 25% supérieurs à 100000.

Là aussi, le risque lié aux légionelles dans les TAR est bien présent.

Enfin, une étude a été réalisée entre 1999 et 2001 sur les installations d'eau chaude sanitaire dans les établissements de santé Lorrains (32). Cette surveillance environnementale des légionelles a montré les résultats suivants :

- Température de l'eau chaude sanitaire :

Extrêmes : 27-82,4° C

Température médiane : 48,3° C (46,7° C sur les points d'usage et 52,7° C en production)

- Nombre de prélèvements, respect de la circulaire de 1998 applicable aux établissements de santé :

Année	% d'établissements ayant effectué au moins		
	10 prélèvements aux points d'usage	5 prélèvements aux points d'usage	1 prélèvement en production
1999	10,5	31,6	73,7
2000	0	35,7	78,6
2001	26,3	52,6	68,4

La circulaire de 1998 n'est pas respectée pour plus de la moitié des établissements, mais son application tend à augmenter au cours du temps.

- Concentration en légionelles des prélèvements :

49,8 % des prélèvements sont positifs en légionelles.

19,2 % de ces prélèvements positifs concernent la production d'ECS, 56,7 % les pommeaux de douche et 20,7 % les robinets.

La concentration maximale en légionelles est de 88000 UFC/L. La médiane est de 1850 UFC/L.

69,1 % des prélèvements positifs sont en niveau cible (<1000 UFC/L), 17,9 % sont en niveau d'alerte (1000 à 10000 UFC/L) et 13 % sont en niveau impératif (>10000 UFC/L).

Que près de 50% des prélèvements soient positifs en recherche de légionelles est tout à fait normal. Les légionelles sont des bactéries à réservoir hydrique. Il est donc normal de les trouver dans des réseaux d'ECS. Que la concentration maximale retrouvée soit de 88000 UFC/L ne signifie rien dans l'absolu. Ce prélèvement peut avoir été effectué sur un point n'ayant pas servi depuis longtemps. Par contre, que 30 % des prélèvements présentent un taux de légionelles

supérieur à 1000 UFC/L et 13 % supérieur à 10000 UFC/L est nettement plus inquiétant en terme de risque sanitaire. Il serait intéressant de comparer ces chiffres aux cas déclarés de légionelloses nosocomiales en Lorraine pour cette période. Cela donnerait des informations pour tenter de relier le risque de survenue de légionelloses avec la concentration en légionelles de l'eau chaude sanitaire.

- Distribution des niveaux de contamination en fonction de la zone géographique :

Ces deux paramètres sont statistiquement liés. Il apparaît un gradient Nord-Sud.

- Distribution des niveaux de contamination en fonction du type d'établissement :

Aucun lien n'a pu être établi entre la contamination de l'eau et le type d'établissement.

- Distribution des niveaux de contamination en fonction de la saison :

En ce qui concerne la présence de légionelles, la saison ne semble pas jouer de rôle. Par contre, les niveaux de contamination sont plus élevés en été qu'en hiver. Ceci implique que les prélèvements mériteraient d'être étalés sur l'année afin de ne pas sous-estimer ou surestimer la contamination en un moment donné.

- Distribution des niveaux de contamination en fonction du point de prélèvement :

Les points d'usage apparaissent plus souvent contaminés et à un niveau supérieur que les systèmes de production et parmi les points d'usage, les pommeaux de douche sont plus souvent et plus contaminés que les robinets.

Les pommeaux de douche peuvent donc être considérés comme critiques et une procédure d'entretien de ces éléments est donc indispensable.

- Distribution des niveaux de contamination en fonction de la température de l'eau :

Comme attendu, température de l'eau et niveaux de contamination sont liés. En effet, la température médiane des prélèvements négatifs en légionelles est de 50° C et celle des prélèvements positifs est inférieure à 50° C (45,5° C). Le maintien de la température de l'ECS au dessus de 50° C peut donc être préconisée.

2- Le système de surveillance épidémiologique des légionelloses :

Le système de surveillance des légionelloses en France repose en premier lieu sur la déclaration obligatoire et également sur le réseau EWGLI (European working group on *Legionella* infections).

Au niveau local, la déclaration obligatoire permet aux DDASS d'identifier les expositions à risque, de rechercher d'autres cas liés à ces expositions et de prendre les mesures environnementales de contrôle appropriées.

Au niveau national, elle permet de mesurer les caractéristiques épidémiologiques et tendances de la légionellose.

Au niveau Européen, elle aide à identifier les cas groupés. (29)

En 1999 a été créée l'Observatoire des légionelles regroupant 37 services de microbiologie volontaires. Cet élément vient renforcer le système interactif préexistant entre le CNR (Centre national de référence) et l'INVS (Institut de veille sanitaire). (31)

Il existe en France trois entités sources d'informations dans la surveillance des légionelloses :

- **Le système des déclarations obligatoires :**

Les cas diagnostiqués sont déclarés par les cliniciens aux médecins inspecteurs de santé publique locaux qui les notifient à leur tour aux autorités nationales de santé publique.

- **Le CNR des *Legionella* :**

Ce laboratoire a été désigné comme centre national de référence en 1980. Il possède l'équipement permettant la confirmation des diagnostic et une solide expérience dans l'examen des échantillons et des souches envoyés de façon volontaire par les laboratoires privés ou publics.

- **enquêtes ponctuelles auprès des laboratoires hospitaliers.**

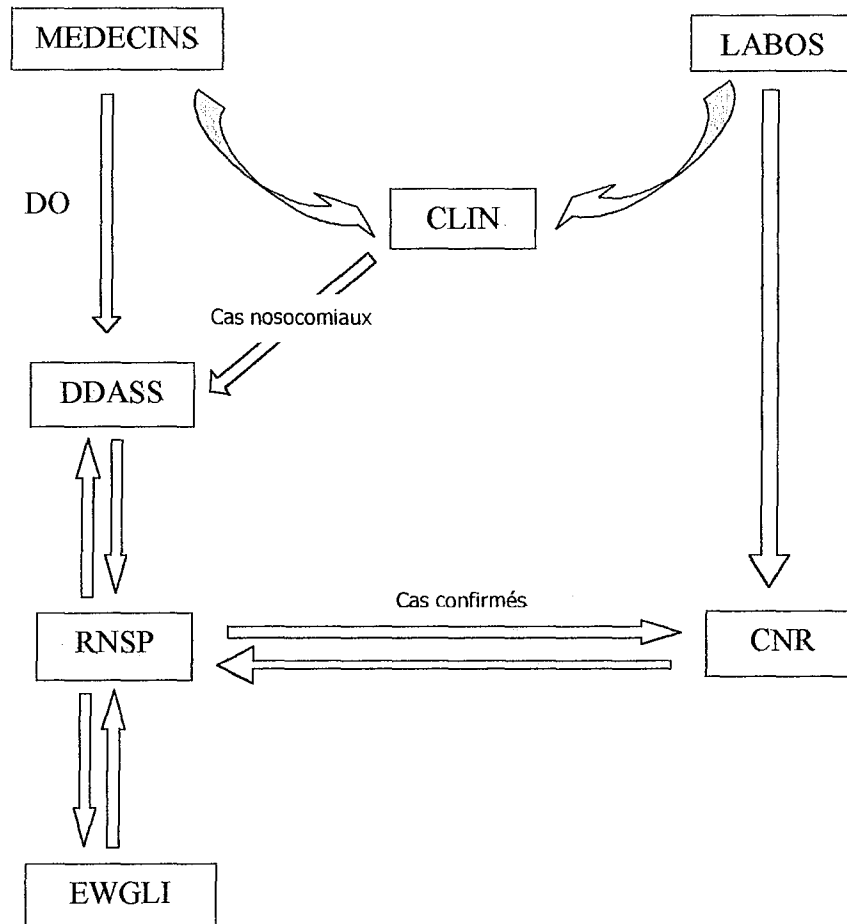


Schéma n°1 : Organisation de la surveillance des légionelloses en France.

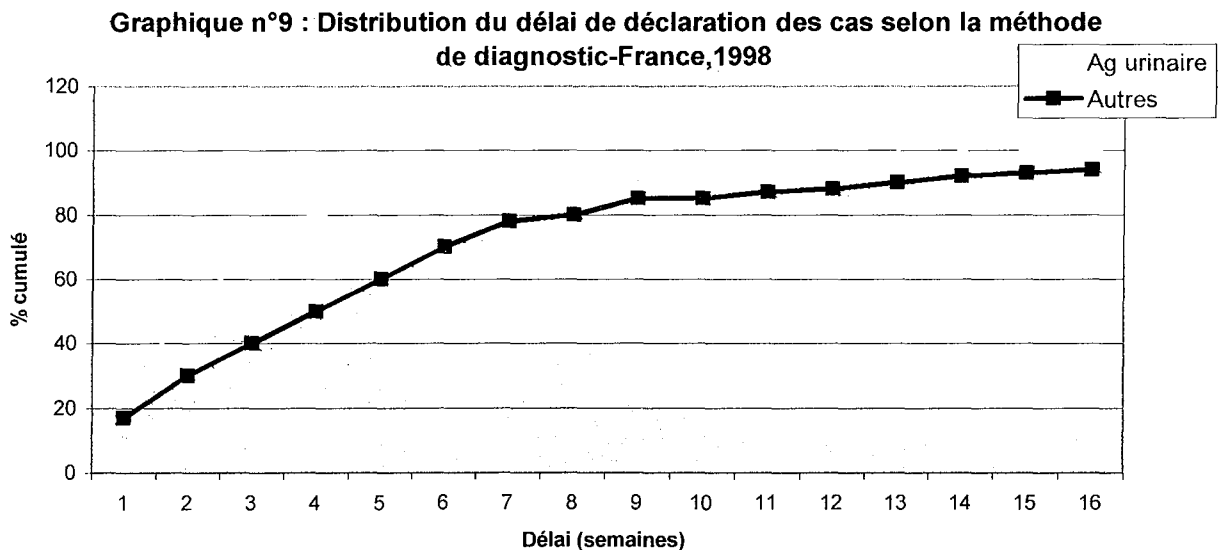
Qualité du système de surveillance :

En 1995, 530 cas de légionellose ont été diagnostiqués, soit une incidence réelle de 0.9 pour 100000 habitants. (20) En fait, 55 cas ont été déclarés, ce qui fait chuter l'incidence de façon importante. L'exhaustivité et la représentativité du système des déclarations obligatoires ont été évaluées en 1995. L'exhaustivité était alors d'à peine 10 % (35).

En 1997, le CNR a notifié 192 diagnostics de légionellose. Pour 72 d'entre eux (37%), aucune fiche de déclaration n'a été reçue. Le délai entre la date de début des signes et la date de déclaration s'étendait en 1997 de 1 jour à 51 semaines avec 50 % des cas déclarés dans les 5 premières semaines. (35).

En 1998, 381 fiches de déclaration ont été reçues par l'INVS. Parallèlement, 235 diagnostics de légionelloses ont été posés par le CNR dont 23 % sans fiche de déclaration. L'exhaustivité du système de déclaration obligatoire a alors été estimée à 30% en 1998. L'incidence de 0,63 pour 100000 habitants a donc été corrigée à 1,8. Le délai de déclaration s'étendait de 5 jours à 38 semaines, dont 61 % des cas dans les 4 premières semaines et 10 % après 3 mois. Le délai moyen de déclaration des cas diagnostiqués par antigénie urinaire était de 2 semaines. (36)

Le graphique n°9 montre la distribution du délai de déclaration des cas selon la méthode de diagnostic (36).



En France, on a estimé que seuls 33% des cas avaient été déclarés en 1999.(5)(31)

En 2000, le CNR a diagnostiqué 241 légionelloses, dont 87% n'avait pas de fiche de déclaration. En 2000, le délai s'étendait de 1 jour à 40 semaines. 74% des cas étaient déclarés dans les 4 premières semaines (contre 70% en 1999) mais 7 % au delà de 3 mois (contre 5 % en 1999). Le délai médian était de 15 jours pour les cas diagnostiqués par culture et de 12 jours par antigénie urinaire (38).

En 2001, le CNR a notifié 256 diagnostics de légionellose, pour lesquels une fiche de déclaration existe dans 91,4 % des cas. Le délai s'étendait de 1 jour à 49 semaines. 79 % des cas étaient déclarés dans les 4 premières semaines et 3 % au delà de 3 mois. Le délai médian était de 22,5 jours pour les cas diagnostiqués par culture et de 10 j par antigène urinaire. (39)

Aujourd'hui, le nombre de cas réels est estimé à 2000 à 3000 cas par an en France. (20)

Aux Etats-Unis, il a été estimé que 8000 à 18000 cas survenaient chaque année, mais que seuls 10% de ces malades étaient déclarés (38).

Cas groupés :

1997 (35)					
Nombre de cas	16	3	20cas chez des français	25 cas chez des Européens en	
Origine de la contamination	Hôtel / Istanbul	Station thermale	en voyage	France	
1998 (36)					
Nombre de cas	20	5	6	33 cas en	Hôpital de Tarbes : 6 diagnostics par CNR sans déclaration
Origine de la contamination	TAR / Paris	Hôpital / Paris	Hôtel / Istanbul	hôtels en France	
2000 (38)					
Nombre de cas	22 dont 4 décès	9			
Origine de la contamination	TAR / Rennes	Hôpital Pompidou / Paris			
2001 (39)					
Nombre de cas	4	20			
Origine de la contamination	Limoges / source inconnue	Lyon			

Tableau n° 14 : Cas groupés de légionellose en France de 1997 à 2001. (non exhaustif)

En 1998, 32 épisodes de cas groupés de légionellose sont survenus en Europe, dont 14 étaient associés à des réseaux d'eau (dont 9 en hôpital), 5 associés à des TAR (dont 1 en hôpital), 1 associé à un spa et 12 de source inconnue.(30)

3- Investigation épidémiologique et environnementale :

31- Investigation épidémiologique :

Une enquête épidémiologique doit toujours se baser sur une bonne définition des cas.

311- Définition des cas :

Un cas est défini comme une **légionellose** devant un tableau de signes cliniques et/ou radiologiques de pneumopathie infectieuse avec en plus au moins un des signes biologiques suivants :

→ Cas confirmé :

- Identification de la souche *Legionella* par culture ou par immunofluorescence directe sur un prélèvement clinique.
- Présence d'antigènes solubles urinaires de *Legionella*
- Elévation du titre d'anticorps de 4 fois le titre initial avec un second titre de 128 minimum

→ cas possible :

- Titre unique élevé supérieur à 256, quelle que soit l'espèce.

Les **cas groupés** correspondent à au moins deux cas de légionellose survenus en moins de 6 mois chez des personnes ayant fréquenté un même lieu et parmi lesquels au moins un des cas est confirmé.

Les **cas liés** sont des cas groupés mais survenus dans une période de plus de 6 mois.

Une légionellose est dite **nosocomiale certaine** si le malade a séjourné dans un établissement de santé pendant les dix jours précédant le début des signes cliniques. Elle est **probable** si le malade a séjourné dans l'établissement au moins un jour parmi les dix jours précédant les signes cliniques.

312- Investigation d'un cas isolé de légionellose :

Les objectifs de cette investigation sont de confirmer le diagnostic, d'identifier les lieux fréquentés par le malade qui constituent une source potentielle d'infection, de rechercher d'autres cas dans l'entourage et de prendre des mesures systématiques de prévention.

313- Investigation de cas groupés :

Cette investigation est la suite logique de l'étape précédente lorsque deux ou plusieurs cas ont été identifiés. Son objectif est d'identifier une source commune d'infection pour adapter les mesures de prévention. L'étude épidémiologique des cas groupés de légionellose est habituellement complexe pour plusieurs raisons : cas relativement peu nombreux et espacés dans le temps, confirmation du diagnostic souvent incomplète, multiplicité des expositions, difficulté à mesurer l'intensité et la durée de ces expositions.

Etude descriptive :

- Définition des cas
- Recherche de dénominateurs de population et calcul des incidences
- Représentation de la distribution spatio-temporelle
- Emission d'hypothèses sur les sources d'infection

Etude analytique :

- ➔ Comparaison des cas à des témoins exposés mais non malades.
 - Tests statistiques des hypothèses par un questionnaire distribué aux cas et aux témoins.

32- Investigation environnementale :

- ➔ Recherche des sources potentielles de contamination par diagnostic du contexte environnemental.
- ➔ Recherche des légionelles dans l'environnement, interprétation des résultats et comparaison des souches cliniques et environnementales.

3ème Partie : Prévention des légionelloses nosocomiales

1- Contexte réglementaire :

La gestion du risque lié aux légionelles se base d'une part sur la surveillance épidémiologique et d'autre part sur les actions de contrôle et de prévention.

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987. Le nombre de cas déclarés est resté faible jusque 1997, puis, suite à la parution de la circulaire du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose et du guide d'investigation accompagnant le texte, la déclaration des cas a très nettement augmenté, et ce de façon continue jusqu'à aujourd'hui.

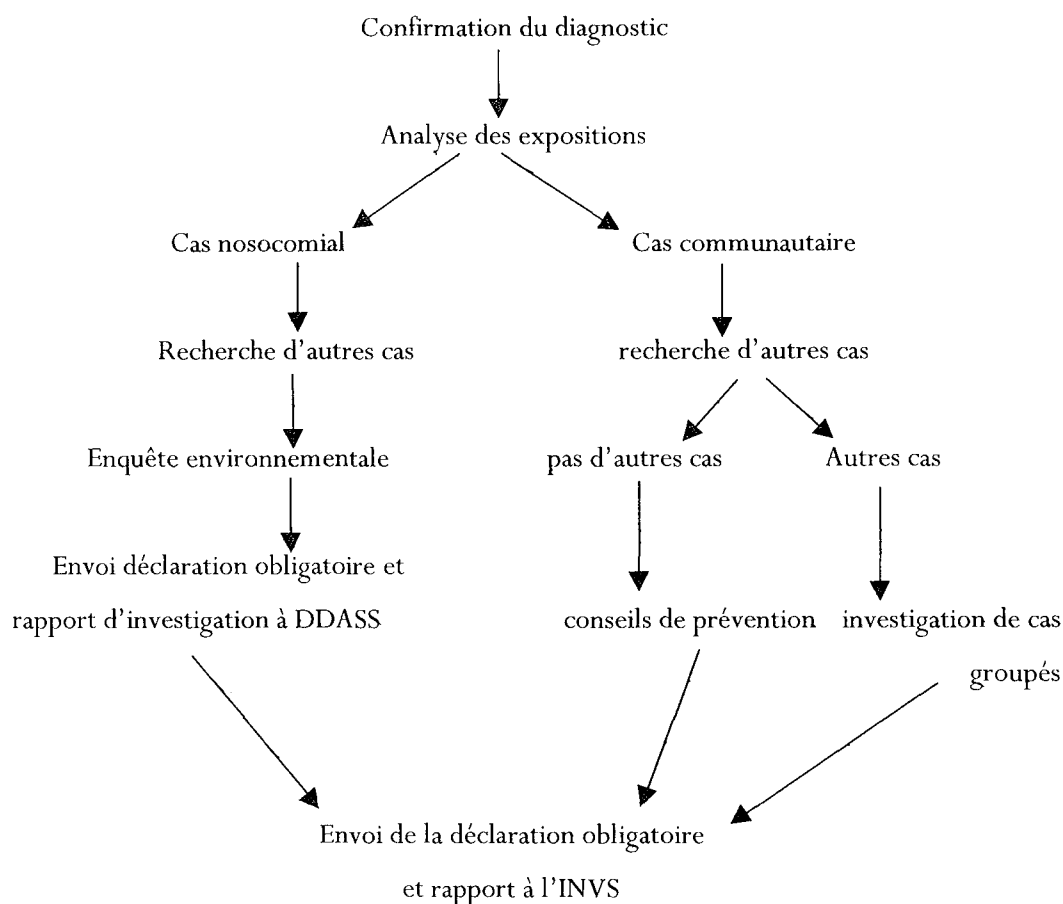
La surveillance épidémiologique se fait, à l'intérieur du territoire, par le système des maladies à déclaration obligatoire. Dans les cas de légionelloses contractées chez des personnes ayant voyagé, le réseau européen EWGLI (European Working Group For Legionella Infection) collecte les informations provenant de 31 pays.

Les actions de contrôle et de prévention sont contenues dans des recommandations concernant les établissements thermaux, établissements de santé et établissements recevant du public. Ces recommandations visent à instaurer des bonnes pratiques d'entretien des installations à risque ainsi que le respect du bon usage de l'eau dans ses différentes utilisations. (26)

11- Circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose (20):

Cette circulaire met l'accent sur deux points. D'une part sur le diagnostic et la déclaration des cas de légionellose, avec un guide d'investigation d'un ou plusieurs cas et une fiche standardisée de déclaration, et d'autre part sur la mise en œuvre de bonnes pratiques sanitaires (prévention primaire en l'absence de cas déclarés). (26)(20)

Les objectifs de cette circulaire sont d'améliorer la déclaration obligatoire, en donnant une nouvelle fiche de déclaration, une nouvelle définition des cas (cas possibles, confirmé, groupés, liés, et légionellose nosocomiale), et en proposant l'organisation de la surveillance (20).



12- Circulaire DGS n° 98-771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans celles des bâtiments recevant du public :

A la suite de la parution de la précédente circulaire, des épidémies de légionelloses communautaires ou nosocomiales ont conduit les autorités sanitaires à renforcer la réglementation.

Ainsi, ce texte rend responsable de la qualité de l'eau aux points d'usage les gestionnaires des établissements. Ces responsables sont tenus de mettre en œuvre tous les moyens pour atteindre cette qualité, en particulier par la connaissance des réseaux d'eau, leur entretien, la surveillance de leur niveau de contamination et les règles d'utilisation des eaux pour les soins.

La circulaire impose également de rechercher systématiquement une légionellose devant un cas de pneumopathie nosocomiale. (26)(21)(10)

13- Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002 / 243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé (23):

Ce texte modifie la circulaire de 1998.

Les objectifs de cette circulaire sont au nombre de trois :

- 1 → Gestion des installations à risque en établissement de santé.
- 2 → Prise en compte du risque "légionelles" dans les activités de soins.
- 3 → Modalités de mise en œuvre des dispositions de prévention du risque "légionelles" dans les établissements de santé.

1 → Gestion des installations à risque en établissement de santé :

Une installation à risque est définie comme une installation susceptible d'exposer des personnes à des aérosols d'eau contaminée inférieurs à 5 microns. De telles installations sont représentées en établissements de santé par les douches, tours aérorefrigérantes, bains à remous ou à jets, humidificateurs des systèmes de climatisation et appareils de traitements thérapeutiques respiratoires.

Les réseaux d'eau chaude sanitaire doivent être conçus et entretenus de manière à limiter la stagnation de l'eau, à lutter contre les dépôts et produits de corrosion et à permettre l'obtention d'une température élevée de l'eau jusqu'aux points d'usage.

2 → Prise en compte du risque "légionelles" dans les activités de soins :

Dans les activités de soins, la qualité des eaux utilisées doit être fonction de l'usage qui en est fait. L'eau utilisée pour un usage thérapeutique (aérosols, humidification en oxygénothérapie) doit être stérile. Pour les patients à haut risque (dont la définition sera traitée ultérieurement), ces mêmes dispositions s'appliquent, ainsi que l'utilisation d'eau stérile pour la préparation des aliments destinés à une alimentation par sonde naso-gastrique.

La circulaire rappelle également la recherche systématique d'une légionellose lors de la survenue d'un cas de pneumopathie infectieuse nosocomiale.

Devant un cas de légionellose nosocomiale, les méthodes préconisées de diagnostic biologique sont la recherche d'antigènes urinaires et la recherche de la souche par culture. Lors de la survenue d'un cas, une surveillance clinique de tous les patients susceptibles d'avoir été exposés doit être mise en place, ainsi qu'une enquête environnementale et épidémiologique.

3 → Modalités de mise en œuvre des dispositions de prévention du risque “légionelles” dans les établissements de santé :

Un programme d'action visant à diminuer le risque “légionelles” doit être défini et mis en œuvre. Un carnet sanitaire doit être créé, contenant les plans des réseaux, protocoles d'entretien et de suivi, résultats des analyses. Une procédure particulière concernant la gestion spécifique du risque pour les patients à haut risque doit être réfléchi, ainsi que la procédure classique d'intervention en cas d'apparition des légionelles ou de légionellose. (31)

14- Réglementation concernant les tours aéroréfrigérantes (TAR) (47):

L'arrêté préfectoral du 26 avril 1999 (Préfecture de Paris) concerne les TAR répertoriées en installations classées. Cet arrêté fixe les règles d'entretien de ces tours ainsi que les différents niveaux d'intervention en fonction des taux de légionelles mesurés :

- Taux supérieur ou égal à 1000 UFC / litre → mise en œuvre de mesures correctives visant à abaisser ce taux en dessous de 1000
- Taux supérieur ou égal à 100000 UFC / litre → Arrêt de la TAR, information de la DDASS, correction par désinfection avant remise en service.

Cet arrêté peut être repris par toute autre réglementation concernant les TAR au niveau départemental ou régional.

15- Réglementation concernant les établissements thermaux (25):

La spécificité de l'usage de l'eau thermale pour tous les soins a obligé les autorités sanitaires à réglementer fermement ces établissements. Une circulaire datant de 1992 a été modifiée par le CSHPF après étude des risques de légionellose liée à l'utilisation thérapeutique de l'eau. Cet organisme a donc édité un guide de recommandations pour la gestion du risque microbien en établissement thermal, en fixant des critères de qualité de l'eau, des règles de surveillance et de contrôle de cette qualité, des principes d'entretien des réseaux et de l'utilisation des désinfectants. Ce guide a été repris par la suite dans l'arrêté du 19 Juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales naturelles. (26)(25)(24)

2- Contrôle de la qualité de l'eau, surveillance sanitaire :

21- Paramètres mesurés :

211- *Legionella*, Norme AFNOR NF-T 90-431 de novembre 1993 (28):

On peut se poser la question de l'utilité de mesurer ou non les légionelles dans l'eau en raison des difficultés d'interprétation des résultats. En effet, l'analyse des légionelles dans l'eau ne reflète pas le taux de contamination de l'aérosol et c'est pourtant celui-ci qui constitue l'exposition à risque. De plus, les problèmes de représentativité de l'échantillonnage et la faible fiabilité de la méthode analytique pourraient faire douter de l'intérêt de telles mesures. Enfin, il est difficile de déterminer des seuils sanitaires en l'absence de relation dose-réponse établie. Ces points seront discutés plus tard. Par contre, les analyses interviennent dans la gestion des risques pour déterminer des niveaux d'intervention et pour justifier une action correctrice. De plus, la concentration de 1000 UFC/L correspondrait au seuil de nombreuses épidémies. (26)

En pratique, on mesure le taux du genre *Legionella* et de l'espèce *Legionella pneumophila*. En sachant que plus de 95 % des légionelloses sont dues à *Legionella pneumophila*, on choisit souvent de mesurer le taux de cette espèce. (26)

La technique de cette norme AFNOR est longue et fastidieuse à mettre en œuvre. Si l'ensemencement est fait directement sur gélose, il est parfois difficile d'interpréter les cultures. De plus, la sensibilité de la technique est faible. La méthode comprend différentes étapes : concentration d'un litre d'eau par filtration sur des membranes en polycarbonate de pores de 0,2 microns, récupération des bactéries qui sont décollées de la membrane par sonication ou grattage, mise en culture des légionelles sur des milieux spécifiques avec et sans antibiotique. Le concentrat estensemencé après chauffage ou acidification. Les conditions de culture sont particulières : atmosphère humide, étuve à 36 +/- 1°C pendant 10 jours. Les cultures sont observées fréquemment (à 3, 5, 7 et 10 jours) afin de repérer rapidement les colonies de *Legionella* avant qu'elles ne soient envahies par d'autres colonies.

La technique a un seuil de détection de 50 voire 100 UFC/L.

Ensuite, on différencie les espèces par utilisation de milieux différents. Enfin, la méthode d'agglutination sur lame permet d'identifier de sérotype de l'espèce *Legionella pneumophila* trouvée.

Cf Annexe 2 : Norme AFNOR NF-T 431 : Mesure de Legionella dans l'eau. (28)

212- Température de l'eau :

Le niveau de contamination en légionelles de l'eau peut être mis en relation avec la température de l'eau. En effet, la survie des légionelles étant très réduite à partir de 50°C, en maintenant une température de l'eau supérieure à 50°C, on minimise les risques de voir se développer ces germes. La mesure de la température de l'eau doit suivre une stratégie et doit être continue le plus souvent possible. (9)(26)

213 – Germes totaux (26)(47):

La mesure des germes totaux comme indicateur de l'état d'entretien d'une installation est très discutée. Pour certains auteurs, un taux élevé de germes totaux doit être considéré comme un signal d'alerte. D'autres se basent sur le constat que de faibles taux de ces germes ne garantissent pas un faible taux de légionelles et donc préconisent la recherche systématique des légionelles. Néanmoins, la mesure des germes totaux est préconisée pour le suivi sanitaires des TAR et climatiseurs.

22- Problèmes liés à l'analyse des légionelles dans l'eau :

221- Représentativité spatio temporelle de l'échantillonnage (26):

Lors du contrôle de la contamination de l'eau d'un réseau, le lieu d'échantillonnage est un facteur déterminant. En effet, les légionelles trouvent des niches favorables à leur prolifération dans un réseau, en particulier au niveau de zones de stagnation (bras morts, zones basses de ballons de production d'eau chaude sanitaire, ...) ou sur des portions entartrées ou corrodées. Ainsi, en fonction du lieu d'échantillonnage, le taux de légionelles mesurées peut varier dans l'espace dans de très larges proportions.

Le moment du prélèvement est également déterminant. Ainsi, après stagnation de l'eau dans les canalisations (nuit), le taux de légionelles retrouvé est maximal. Après une matinée (soutirage important) ou après une désinfection, il sera minimum.

Les caractéristiques de fonctionnement des équipements doivent également être connues.

Le choix des points de prélèvements et leur modalités relève de la stratégie d'échantillonnage, déterminée au coup par coup pour chaque installation à risque.(26)

En annexe 3 figure une fiche technique concernant les modalités de prélèvements permettant de limiter ces biais (fiche technique extraite de la circulaire de 2002).

222- Variabilité des résultats d'analyse (26):

La recherche de légionelles est habituellement réalisée sur des échantillons d'eau, en raison de la facilité de ce type de prélèvement et de l'existence d'une méthode normalisée.

Cette méthode consiste en une filtration de l'eau puis mise en culture. Mais la culture des légionelles peut être compromise par la présence dans l'échantillon d'autres micro-organismes moins exigeants.

D'autre part, les études de la mesure de viabilité et de capacité à cultiver des légionelles dans les échantillons d'eau froide ou d'eaux naturelles ont montré que près de 99% des germes sont viables mais non cultivables. Dans la plus part des cas, le nombre de légionelles mesurées serait donc très inférieur à la réalité. Notons que sur le plan clinique, la pathogénicité de légionelles viables non cultivables n'est pas connue. (26)

223- Problèmes d'interprétation des résultats (26):

Un des problèmes majeurs rencontrés dans la prévention des légionelloses est la difficulté de corrélation entre le résultat d'une analyse d'eau et l'évaluation du risque de légionellose qui en découle. En effet, on ne connaît pas la dose nécessaire pour provoquer une infection chez l'homme. seule la DL 50 chez l'animal a été évaluée à $1,4 \cdot 10^5$ bactéries viables en aérosol (26). De plus, le déclenchement d'une infection, quelle qu'elle soit, dépend fortement de la pathogénicité de la souche et de l'état immunitaire de la personne exposée. En conclusion, plusieurs facteurs interviennent dans l'acquisition d'une légionellose :

- L'état immunitaire du sujet.
- La durée d'exposition.
- La concentration en légionelles, ce qui justifie l'analyse des germes dans l'eau.
- La taille des particules de l'aérosol.
- Le pouvoir pathogène de la souche.

L'examen des données épidémiologiques est donc indispensable en complément des données analytiques pour évaluer le risque "légionelles".

23- Modalités de suivi des différents paramètres en établissements de santé :

Les circulaires de 1998 et 2002 imposent une analyse bactériologique au moins une fois par an sur l'eau des réservoirs, systèmes de production, installations hydrauliques à risques et sur deux points d'usage pour 100 lits (Au minimum 10 points pour un établissement de moins de 500 lits).

En pratique, le suivi d'une installation ne peut être efficace qu'après connaissance de cette installation et diagnostic des points critiques. Ces points sont classés par niveau de risque et le point présentant le plus fort risque sera analysé systématiquement en plus des points visés par la réglementation.

Les analyses de légionelles seront donc effectuées au niveau de l'installation de production (fond du ballon, sortie du ballon ou de l'échangeur), sur chaque portion de réseau au niveau du point le plus critique et sur un ou plusieurs points représentatifs (de risque moyen), et sur le retour de boucle.

Les mesures de température porteront sur les même points, et le plus souvent possible en continu.

Aux Etats-Unis, le CDC ne conseille pas de réaliser des analyses de légionelles en routine, les résultats pouvant être faussement considérés comme sécuritaires. Ils considèrent qu'il est plus important de mettre en oeuvre un entretien constant de bon niveau. Les analyses sont, en revanche, nécessaires dans le cas d'investigations épidémiologiques pour déterminer l'origine de la contamination.

Chaque état fixe ses règles en matière de contrôle de l'eau. Ainsi, en Pennsylvanie, le seuil fixé est de 30 % de sites de prélèvement contaminés dans l'établissement de santé contrôlé.

En Grande-Bretagne, aucune valeur repère en terme de concentration en légionelles n'est fixée. Les analyses de légionelles ne sont pas explicitement conseillées.

En Suisse, les paramètres contrôlés ainsi que les seuils fixés sont sensiblement les mêmes qu'en France.

Tableau 15 : Suivi des paramètres légionella et température dans les réseaux d'eau chaude sanitaire : (9)(26)

Point de contrôle	Mesure à effectuer	Interprétation
Fond du ballon	Legionella : 1 / an T : pas de mesure	État général du ballon
Sortie du ballon ou de l'échangeur	L : pas nécessaire si T > 55°C T : 1 fois / j ou continue	Rendement thermique
Points d'usage très critiques	L : 1 / an T : 1 / semaine ou continue	La durée d'obtention de la bonne température est un indicateur de l'équilibrage du réseau
Points d'usage représentatifs	L : 1 / an (1/ trim dans services à haut risque) T : 1 / semaine ou continue	
Retour de boucle	L : 1 / an T : 1 / j ou continue	

Légende du tableau : L : Legionella, T : Température

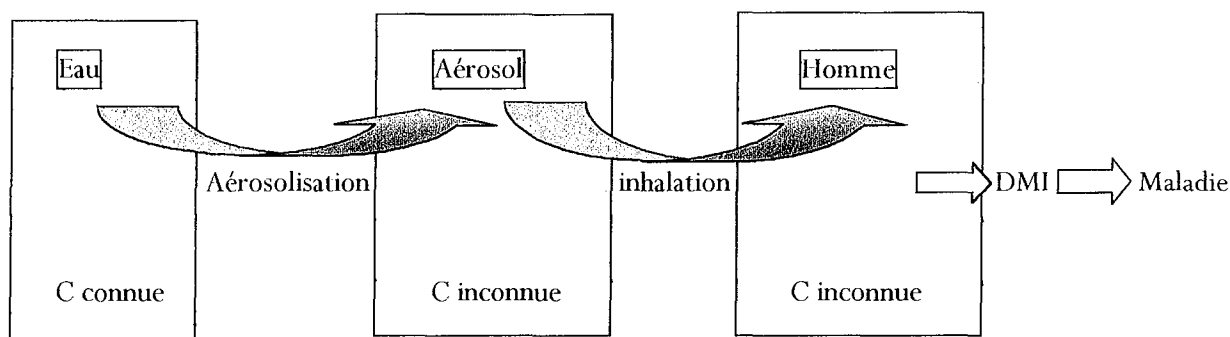
Tableau 16 : Suivi des paramètres légionella et température dans les réseaux d'eau froide : (26)

Point de contrôle	Mesure à effectuer	Interprétation
Plusieurs points représentatifs	T : 1 / semaine L : si température > 20 °C	

24- Niveaux d'intervention :

La recherche des légionelles dans l'eau, qui est rendue obligatoire par la réglementation française est très controversée. Ainsi, le CDC américain s'y est opposé, avançant l'argument qu'aucune corrélation entre le taux de légionelles dans l'eau et le risque de légionellose n'a été prouvée à ce jour. (7).

Les différents compartiments des légionelles sont :



C : Concentration en légionelles

On voit sur ce schéma qu'il est impossible, avec aussi peu de connaissances, de relier le risque de maladie avec la concentration initiale en légionelles dans l'eau. (7)

Malgré l'absence de cette relation, différents modèles ont été proposés.

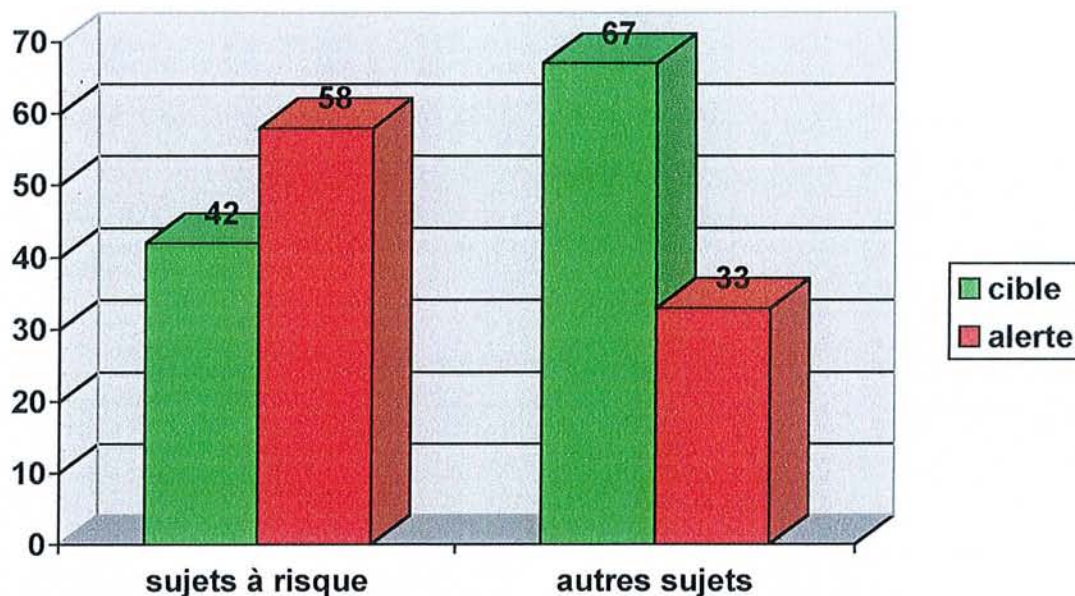
L'approche épidémiologiste de BEST consiste à relier le risque de légionelloses avec la proportion de points d'usage contaminés. La valeur de 30% serait le niveau d'alerte à ne pas dépasser.

Un deuxième point de vue est une approche microbiologique, consistant à fixer des seuils de concentration en légionelles dans l'eau pour un niveau de risque donné pour un groupe de patients. C'est sur cette définition du "patient à risque" que la circulaire de 1998 se révèle incorrecte. En effet, en choisissant ce référentiel pour la définition du groupe de patients à risques et les niveaux d'intervention proposés par l'OMS, une étude menée au CHU de Nancy a montré des résultats probants.

Les niveaux d'intervention étaient les suivants :

	Sujets à risque	Autres sujets
Niveau cible	< 50 UFC/L	< 1000 UFC/L
Niveau d'alerte	50-100	> 10000
Niveau d'action	> 100	

Les résultats obtenus sont les suivants :



A peine plus de la moitié des prélèvements satisfaisaient aux exigences des niveaux précédemment définis et 58% des prélèvements d'eau effectués dans les chambres des patients à risque étaient non conformes.

Or les recueils de déclaration de légionelloses font état de 2 cas de légionellose chez des patients à risque sur un total de 2300 lits, ce qui prouve bien que la définition du niveau de risque pour ces patients ne peut être relié à la concentration en légionelles de l'eau. Pour que la recherche des légionelles soient un indicateur fiable du risque de légionellose, les patients à risque doivent être correctement définis.

Il s'agit par conséquent des patients greffés ou aplasiques (7).

Tableau 17 : Eau chaude sanitaire : Concentrations limites autorisées en légionelles et intervention à réaliser : (26)

Niveaux d'intervention	Cas général	Etablissement de santé Tous patients	Etablissement de santé Patients à haut risque
Niveau cible → entretien et suivi régulier	< 1000 <i>Legionella</i> / l	< 1000 <i>Legionella</i> / l	< 50 <i>Legionella</i> / l
Niveau d'alerte → renforcement de l'entretien et du suivi, information des services, CLIN et services techniques, recherche des causes et de l'étendue de la contamination	≥ 1000 <i>Legionella pneumophila</i> / l	≥ 1000 <i>Legionella pneumophila</i> / l	≥ 50 <i>Legionella</i> / l
Niveau d'action → intervention technique curative et suppression de l'exposition	≥ 10000 LP / l	≥ 10000 LP / l	≥ 100 <i>Legionella</i> / l

Tableau 18 : Tours aéroréfrigérantes : Concentrations limites autorisées en légionelles et intervention a réaliser (47):

Niveau cible	< 1000 <i>Lcgionella</i> / l	Entretien et suivi régulier
Niveau d'action	>= 1000 <i>Legionella</i> / l	Mesures visant � abaisser le taux en dessous de 1000 UFC / l
Niveau d'alerte	>= 100000 <i>Lcgionella</i> / l	Arrêt, information de la DDASS et installations classées, vidange, nettoyage et désinfection avant remise en route

3- PREVENTION :

31- Installations concernées :

Les sources d'exposition aux légionelles se répartissent en trois groupes : l'exposition directe par l'eau, l'exposition par l'intermédiaire de l'air et l'exposition par des équipements de traitement respiratoire.

- Installations à risque d'exposition aux légionelles de l'eau, répartition par usages en établissement de santé (27):

Remarque : La consommation en eau d'un établissement de santé est de 200 à 2000 l / j / lit.

Eaux alimentaires et sanitaires :

Eau froide

Eau chaude sanitaire (50 l / j / lit)

Fontaines réfrigérées

Eaux à usage médical :

Eau de dialyse

Eaux pharmaceutiques

Eau bactériologiquement maîtrisée

Eaux propres et ultrapropres

Eaux techniques :

Arrosage

Piscines

Réseau incendie

Blanchisserie

Eau d'humidification de l'air (climatiseurs)

Eau de condensation des TAR

Eaux usées

- Installations à risque d'exposition par l'air :

Climatiseurs (air réfrigéré)

Ventilations d'air chaud humidifié

TAR

- Installations à risque d'exposition par le matériel de soin :

Aérosolthérapie

Oxygénothérapie

Humidificateurs

32- Carnet sanitaire :

Chaque établissement est tenu d'établir et d'entretenir un carnet sanitaire concernant tout particulièrement le risque lié aux légionelles.

Ce carnet doit comporter quatre parties :

- une première partie sur la connaissance des installations à risque.
- une partie contenant les protocoles de maintenance et d'entretien de ces installations.
- une partie recevant les résultats des contrôles de l'eau.
- un programme d'amélioration de la qualité de l'eau.

321- Etat des lieux, description des installations (27):

Pour chaque type d'installation, une description détaillée doit être faite.

Dans le cas de la gestion du risque "légionelles", l'origine de l'eau utilisée ainsi que sa qualité de départ doivent être connues. L'eau peut être d'origine privée (ressource privée autorisée) ou publique (réseau d'adduction public). Dans les deux cas, la qualité de l'eau doit être connue et si besoin vérifiée. Une série d'analyses est alors nécessaire : analyses bactériologiques et physicochimiques. L'eau utilisée en établissement de santé, qu'elle soit d'origine publique ou privée, doit être potable selon le décret 89-

3 de 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine. Sur le plan physicochimique, la dureté, le pH, la température, la conductivité, le bilan ionique, l'équilibre calco-carbonique, les matières en suspension et le taux de matière organique doivent être connus afin d'adapter le choix des matériaux qui seront au contact de cette eau et éventuellement un traitement spécifique avant distribution.

Vient ensuite la description des installations. Dans le cas des réseaux d'eau, les tracés doivent être indiqués sur un plan, comportant en outre la nature des matériaux utilisés, les dimensions des canalisations, la situation des installations de traitement, de production, de stockage, relevés des caractéristiques de fonctionnement (température, pression, ...), organes hydrauliques (pompes, vannes, ...), organes de sécurité (disconnecteurs, antiretours, purges, ...), équipements raccordés et points d'usage.

322- Procédures de fonctionnement, d'entretien, de maintenance, et de suivi
(27)(44):

Dans cette partie doivent figurer toutes les procédures, plannifications et fiches techniques existant sur les installations à risque :

- Procédures de fonctionnement hydraulique pour les réseaux d'eau.
- Procédures d'entretien et de maintenance, procédures de traitements préventifs et curatifs.
- Fiches techniques de fonctionnement des appareils.
- Plannification des analyses, procédures d'intervention.

323- Identification des points critiques (27)(44):

Après état des lieux, chacune des deux premières parties est reprise et analysée. Chaque point est évalué en terme de risque. Les points critiques se situent à trois niveaux : Au niveau de la conception des installations, au niveau de la maintenance et pour ce qui est des réseaux d'ECS, une évaluation du niveau de contamination doit être mesuré.

Les défauts de conception pouvant entraîner la présence ou le développement des légionelles sont :

- Bras morts, zones de stagnation
- Zones de dépôts ou corrodées
- Absence de purges, dégazeurs, disconnecteurs
- Mélange d'eaux froide et chaude ou refroidissement d'ECS par conduction.
- Alternance de matériaux ou mauvais choix.

Les défauts d'entretien pouvant entrainer le développement des germes sont :

- Points d'usage peu ou non utilisés.
- Absence de traitements spécifiques
- Absence de maintenance préventive

324- Programme d'amélioration (27):

Les points critiques identifiés peuvent être classés par priorité selon plusieurs paramètres : tout d'abord le niveau du risque. Plus celui-ci sera grand et plus le point devra faire l'objet d'une correction rapide. Ensuite, la faisabilité technique de travaux ou modifications et le coût du changement seront analysés et classés selon les possibilités techniques et financières de l'établissement.

Toutes ces améliorations seront planifiées et le carnet sanitaire devra être remis à jour selon une périodicité définie et systématiquement à la suite de chaque correction.

33- Mesures générales à prendre (27):

Toutes les mesures à prendre pour gérer le risque "légionelles" seront établies par le CLIN et l'équipe opérationnelle en hygiène.

De façon générale, après information et formation des personnels concernés, un entretien régulier et une bonne maintenance des installations sera nécessaire pour prévenir le risque de légionellose. Les procédures correspondantes, ainsi que les règles d'utilisation de l'eau pour les activités de soins devront être formalisées et diffusées. La qualité de l'eau fera bien sûr l'objet d'un suivi régulier, et en l'absence de cas cliniques, ou en l'absence d'un suivi épidémiologique prospectif, une légionellose sera systématiquement recherchée devant un cas de pneumonie nosocomiale.

- conduite à tenir face à un risque de légionellose (27):

Si un prélèvement d'eau révèle un taux de légionelles supérieur au seuil d'alerte :

- Sensibilisation des médecins et incitation à la vigilance diagnostique
- Vérification de la température de l'eau en production et distribution
- Entretien des périphériques
- Contrôle immédiat pour vérifier l'efficacité des mesures
- Traitement curatif envisagé si la contamination est étendue
- Maintien des mesures jusqu'au retour au niveau cible des analyses

Si le seuil d'action est atteint :

- Intervention technique immédiate
- Suppression de l'exposition (éviction des douches ou filtration terminale)

- Conduite à tenir face à un cas de légionellose nosocomiale :

Cette démarche est codifiée de façon précise dans la circulaire de 1997.

Rq : Aucun isolement septique du malade n'est nécessaire.

Cf Annexe 4 : Fiche technique de déclaration d'un cas de légionellose- extraite de la circulaire de 1997 (20)

- Recommandations spécifiques pour les patients à haut risque :

Un patient hospitalisé est déclaré à haut risque s'il subit une immuno-dépression sévère (23). Cette définition est très précise de façon à ne pas englober dans ce groupe des patients présentant un ou plusieurs facteurs de risque de légionellose mais non à très haut risque. Cette immuno-dépression sévère est donc définie de la façon suivante :

- Patient transplanté ou greffé
- Patient sous corticothérapie prolongée (0,5 mg/kg pendant 30 jours) ou sous corticothérapie massive récente (5 mg/kg pendant 5 jours).

Il est recommandé pour ces patients par la circulaire de 2002 de les regrouper dans des services ou secteurs spécifiques équipés de points d'usage sécurisés (à filtration terminale) ou munis d'une production autonome et instantannée d'ECS.

Si ces patients ne peuvent pas être groupés, il faut impérativement sécuriser les points d'usage de leur chambre.(23)

34- Recommandations pour la prévention des légionelloses nosocomiales :

341- Oxygénothérapie et aérosolthérapie (27):

L'oxygénothérapie consiste en une administration thérapeutique d'oxygène gazeux par sonde, lunettes ou masque facial. Cet oxygène est préalablement humidifié selon deux techniques : ou bien en passant dans un barboteur à usages multiples ou dans un humidificateur jetable (système clos).

- Réservoirs de type barboteur :

Ils doivent être nettoyés, désinfectés et rincés selon un protocole validé avec une eau bactériologiquement maîtrisée puis séchés. Il s'agit d'un matériel semi-critique nécessitant une désinfection de niveau intermédiaire. S'ils le permettent, ils seront stérilisés. Les tubulures, sondes, lunettes et masques seront changés toutes les 24 heures maximum et entre chaque patient.

- Humidificateurs pré-remplis d'eau stérile à usage unique :

Lors de la mise en place, les branchements doivent être réalisés de façon aseptique. Ils doivent être jetés s'ils sont vides, après chaque patient ou lorsque le niveau d'eau minimum est atteint.

L'aérosolthérapie consiste en une administration de produits médicamenteux inhalés grâce à un aérosol (liquide dans gaz).

L'ensemble nébuliseur, tubulure et masque doit être à usage unique. Le véhicule de l'aérosol doit être de l'eau stérile ou du sérum physiologique stérile, si possible en conditionnement unidose.

Le kit doit être changé toutes les 24 heures. Entre deux séances, le nébuliseur est vidé, rincé à l'eau stérile et protégé.

342- Eau chaude sanitaire (27):

L'ECS peut sur tout son parcours s'altérer microbiologiquement. Les causes peuvent être de plusieurs types. Ou bien une pollution extérieure s'infiltrant dans le réseau au niveau de l'approvisionnement (cas rare), au niveau de matériaux défectueux (joints, ...) ou corrodés. Ou bien les légionelles présentes dans un réseau à un niveau bas vont s'y multiplier à l'occasion de conditions environnementales favorables. Ces mêmes phénomènes de corrosion et de dépôts peuvent devenir des niches écologiques favorables pour les légionelles. Une quantité trop importante de matière organique peut également renforcer le biofilm protecteur des légionelles. Des défauts de conception peuvent enfin favoriser la croissance des légionelles (bras morts, zones de faible température, retours d'eaux contaminées, ...), ainsi que tout défaut d'entretien d'un réseau d'ECS.

Afin de limiter les risques d'altération de la qualité microbiologique de l'eau, il est indispensable de respecter les règles d'hygiène au niveau de la conception, la réalisation et l'entretien des réseaux.

3421-Conception et réalisation des réseaux (27):

Les matériaux doivent être choisis en fonction de leur compatibilité avec les caractéristiques physicochimiques de l'eau distribuée.

Cf Annexe 5 : Nature des canalisations de distribution d'eau chaude sanitaire et leurs avantages et inconvénients. (extrait de la circulaire de 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé) (23).

Le rôle de certains matériaux constituant les réseaux a été étudié : fer, zinc et potassium, qui, même à de faibles doses, favorisent le développement des légionelles. À l'inverse, des surfaces en cuivre présentent moins de colonisation. Le caoutchouc et le PVC sont à éviter car la colonisation par *Legionella* y est plus importante que sur le cuivre. En effet, alors qu'à 50°C les légionelles ne survivent plus sur du cuivre, il faut atteindre 60°C pour obtenir le même effet sur du PVC. L'ajout de thiuram dans les caoutchoucs inhiberait la croissance du germe. (23)

Au niveau des périphériques, les robinets à aérateur présentent une colonisation importante.

Les matériaux les plus favorables au développement des légionelles sont par ordre du plus favorable au moins favorable (23):

Latex > acier galvanisé > PVC > PET > acier inox > polybutylène > verre > cuivre.

De même, les diamètres des canalisations doivent être déterminés de façon à permettre un écoulement rapide et turbulent de l'eau, sans zone de stagnation ou de dépôt. Les réseaux doivent être les plus simples et courts possible et séparés en fonction des usages de l'eau. Chaque portion de réseau doit être désinfectable.

De façon pratique, les différents réseaux doivent être clairement identifiés.

L'utilisation de canalisations intérieures d'eau pour mise à la terre d'appareils électriques est interdite, celle-ci pouvant favoriser des phénomènes de corrosion.

Les réservoirs doivent être dimensionnés de façon à éviter la stagnation de l'eau, c'est à dire les plus petits possible. Ils doivent être entièrement vidangeables en point bas et désinfectables.

Des dispositifs de protection contre les retours d'eau en provenance des réseaux et équipements raccordés sont indispensables. Il s'agit de disconnecteurs, clapets anti-retour, ...

Les éventuels traitements de l'eau doivent être autorisés.

3422- Entretien et maintenance (27):

Un entretien et une vérification doivent être réalisés aussi souvent que nécessaire et au minimum une fois par an sur les réservoirs, dispositifs de production, de traitement et de protection. On examine alors l'état général de l'installation, on procède au nettoyage, au réglage des organes hydrauliques et on évalue l'efficacité des traitements et des organes de sécurité. Toutes ces opérations seront consignées dans le carnet sanitaire.

Bonnes pratiques d'entretien des installations à risque :

- Production et stockage :

La production d'ECS peut être effectuée selon plusieurs procédés :

Production par accumulation : ballon

Production instantanée : chauffe-eau ou échangeur à plaques.

Production semi-instantanée : échangeur à plaques + petit ballon de stockage

Recommandations :

- ➔ Local fermé, protégé contre les pollutions extérieures
- ➔ Présence de clapets anti retour avant le ballon et sur le retour de boucle
- ➔ Purge haute et basse sur le ballon
- ➔ Vérification (ou mesure en continu) des températures de départ et du retour de boucle et de la température dans le ballon .
- ➔ Choix des matériaux des ballons, canalisations et réservoirs de qualité alimentaire
- ➔ Entretien : on effectue une fois par mois une chasse en bas du ballon et une fois par an on vérifie le fonctionnement des thermomètres, purgeurs, clapets, ...

- Circuits de distribution :

- ➔ Suppression des bras morts
- ➔ Vérification de l'absence de passage d'eau froide dans les réseaux d'ECS (au niveau des mitigeurs en particulier)
- ➔ Vérification de la température de l'ECS en différents points :
 - 60 à 65°C en sortie du ballon
 - 60°C sur les réseaux primaires (calorifugés si nécessaire)
 - 50 à 55°C aux points d'usage, afin d'éviter les risques de brûlure.

Tableau 19 : Effet de la température sur les légionelles et l'homme :

Température de l'eau	Temps d'obtention de la mort des légionelles	Temps d'obtention d'une brûlure profonde
70°C	1 seconde	1 seconde
60°C	32 minutes	7 secondes
50°C	Survivance mais absence de croissance	8 minutes

- ➔ Information des patients et du personnel sur le risque d'ingestion d'ECS.
- ➔ Désinfection des réseaux après tous les travaux
- ➔ Mitigeage de l'eau le plus près possible de l'utilisateur
- ➔ Détartrages périodiques des périphériques (joints, filtres, flexibles), au minimum une fois par an
- ➔ Réglage du débit de recirculation dans le retour de boucle pour équilibrer la température de l'eau distribuée
- ➔ Contrôles de la qualité de l'eau
- ➔ Remplissage et mise à jour du carnet sanitaire.

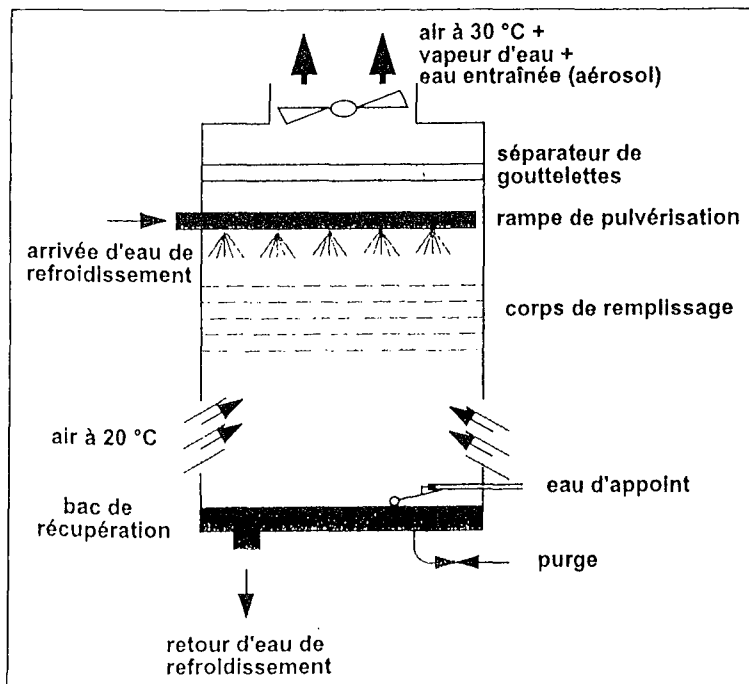
Cf Annexe 6 : Caractéristiques des installations de distribution d'eau chaude sanitaire et règles de maintenance. (extrait de la circulaire DGS n° 2002/243 du 22/04/2002) (23)

343-Tours aéroréfrigérantes et climatiseurs (14)(27)(30)(47):

Les TAR et les système de traitement d'air qui leur sont associés ont été les premiers mis en cause dans la multiplication et / ou la dissémination de ces bactéries. De nombreuses zones humides sont susceptibles d'héberger des légionelles.

Le principe de fonctionnement des TAR consiste à refroidir l'eau ayant circulé dans le condenseur de la machine frigorifique par une vaporisation partielle de celle-ci. L'eau à refroidir, qui vient du condenseur, passe dans des gicleurs dont le rôle est de pulvériser l'eau et donc d'augmenter la surface d'échange entre l'eau et l'air. L'eau restante est collectée dans un bac. Elle repart ensuite vers le

condenseur de la machine frigorifique. Un flux d'air à contre courant intensifie les échanges thermiques. Ces tours constituent malheureusement un milieu particulièrement favorable au développement des légionnelles : de l'eau entre 25 et 35°C, des sites propices tels que les dépôts de sels minéraux, la présence de nutriments (algues, végétaux, micro-organismes, ...) (14).



Modèle de tour aéroréfrigérante de type ouvert

L'eau chaude qui arrive doit être refroidie. Elle passe dans le packing et c'est l'air l'aspiré par le ventilateur qui refroidit l'eau. L'eau en circulation est à une température favorable au développement des légionnelles. La difficulté d'accès à ces tours créent les conditions d'une importante prolifération de la bactérie

Figure n° 1 : Modèle de tour aéroréfrigérante de type ouvert.

Les règles de bonnes pratiques sanitaires sont les suivantes : (47)

- ➔ Contrôle de l'efficacité des dispositifs d'arrêt des gouttelettes
- ➔ Disconnexion des réseaux d'évacuation d'eau et des eaux usées.
- ➔ Installations des prises d'air des batiments voisins à au moins 8 mètres des TAR et au vent dominant.

dominant.

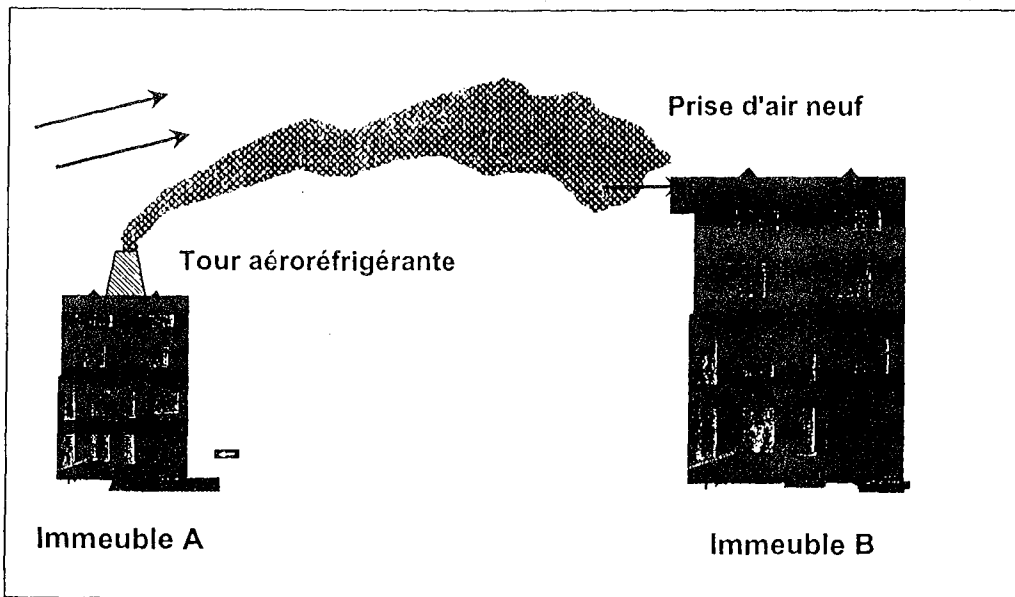


Figure n° 2 : Exposition potentielle des personnes de l'immeuble B dont la prise d'air neuf se situe sous le vent de la TAR de l'immeuble A.

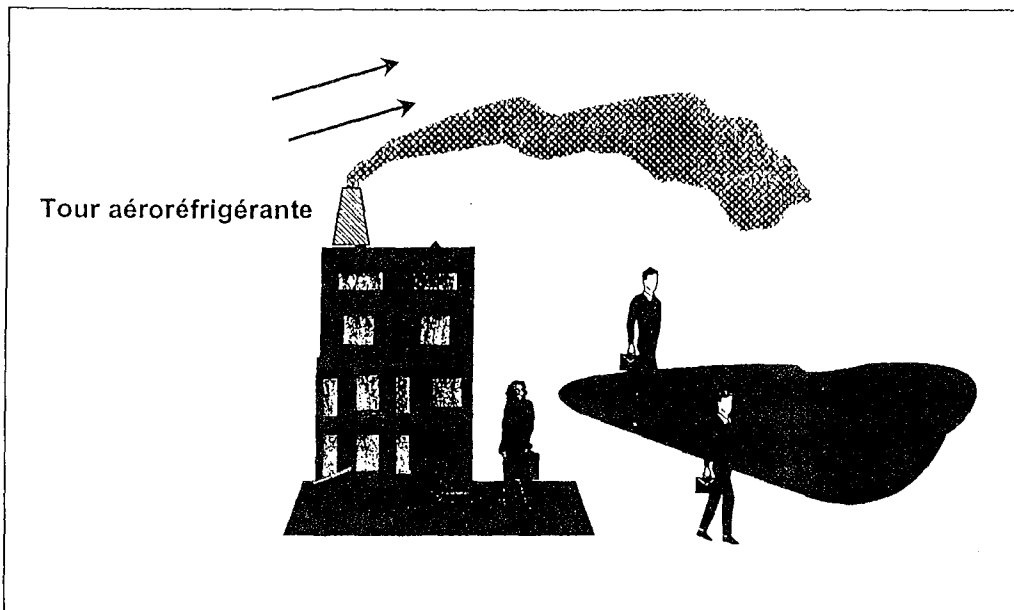


Figure n° 3 : Contamination de personnes passant à proximité d'un panache contenant des légionelles.

- Traitement des eaux pour éviter les dépôts
- Nettoyage des boues par dispersants et désinfection réguliers.
- Contrôle de la qualité des eaux

Dans le cas des climatiseurs, l'eau de condensation peut être un milieu de multiplication des légionelles qui se retrouveront ensuite dans l'air distribué.

Les règles de bonnes pratiques sanitaires sont les suivantes :

→ Les parois doivent être lisses, accessibles, facilement nettoyables et désinfectables, et traitées pour éviter les dépôts (inox par exemple)

→ L'humidification doit avoir lieu en amont de la filtration

→ L'humidification par vapeur doit être préférée aux systèmes par ruissellement ou pulvérisation

→ Le circuit d'eau d'humidification doit être muni d'un filtre à 0,4 microns.

→ Le bac de récupération des eaux de condensation doit être en pente, à évacuation continue.

→ L'eau de condensation doit être analysée au minimum une fois par an.

4- Traitements physiques et chimiques curatifs et préventifs :

41- Nettoyage des réseaux d'eau (25)(27):

Les opérations de nettoyage sont indispensables pour enlever les dépôts susceptibles d'entraîner la formation d'un biofilm.

Le nettoyage peut être réalisé par un processus physique et / ou chimique.

Une des méthodes utilisées est le nettoyage mécanique à l'air et à l'eau. il permet d'éliminer les boues, le biofilm et les particules solides de façon importante. Néanmoins, les vibrations que provoque la méthode peuvent endommager des réseaux anciens.

Il est également possible d'effectuer un nettoyage à l'eau seule. L'eau circule alors à vitesse très élevée. Cette méthode présente l'avantage de ne pas provoquer de vibration, mais la capacité d'un réseau à permettre un écoulement très rapide de l'eau est souvent impossible à obtenir techniquement.

On peut toujours nettoyer chimiquement un réseau. On effectue alors une dissolution des dépôts de carbonates de calcium ou d'hydroxydes de fer par des produits acides auxquels on ajoute un inhibiteur de corrosion et un agent réducteur.

42- Désinfection (27):

421- Réglementation, produits utilisés :

Le décret 89-3 du 3 Janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine s'applique aux réseaux d'eau internes hospitaliers pour ce qui concerne les procédés et produits chimiques utilisés pour la désinfection. Ces produits et procédés doivent être autorisés par le ministère de la santé après avis du CSHPF (Comité Supérieur d'Hygiène Publique de France) et de l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). la circulaire du 8 mars 2000 vient compléter ce texte en donnant la liste des produits et procédés utilisables.

Les méthodes de désinfection chimique font très souvent appel à des oxydants. De façon non exhaustive, les produits de désinfection de type oxydants sont :

Chlore et dérivés, hypochlorite de calcium, de sodium, chlorite de sodium, dioxyde de chlore, de soufre, bisulfite ou hydrogénosulfite de sodium, métabisulfite de sodium, sulfate ferreux, sulfite de sodium, permanganate de potassium, ozone, oxygène, peroxyde d'hydrogène. (25)

Les procédés autres que chimiques sont :

L'ultrafiltration membranaire, le choc thermique, les rayonnements Ultra-Violet, l'ionisation cuivre/argent.

Le choix d'un produit ou d'un procédé se fait en fonction de plusieurs paramètres :

- La qualité de l'eau (pH, minéraux, matière organique, turbidité)
- Matériaux constitutifs des réseaux
- Etat d'entartrage et de corrosion

422- Mise en œuvre :

- Choc thermique (27)(61):

→ S'assurer que la production d'ECS peut monter à la température voulue. Sinon, segmenter les réseaux.

→ S'assurer que tout le réseau (canalisations, joints, organes hydrauliques, périphériques) peut supporter une température élevée.

→ Désinfecter à part les réservoirs et périphériques

→ Mesurer la température à des points d'usage représentatifs (70°C pendant 30 minutes)

→ Contrôler la température avant remise en service

Les avantages du choc thermique sont la bonne capacité de la méthode à éliminer ou inactiver le biofilm. A l'inverse, une forte température peut endommager les réseaux (en acier galvanisé en particulier) et entraîne un entartrage important.

Le choc thermique est une méthode d'urgence réservée au traitement des réseaux dans des cas d'épidémies, visant à limiter l'exposition des personnes aux légionelles. Cette méthode n'ayant pas d'effet rémanent, la recolonisation des réseaux est assez rapide (quelques semaines à quelques mois) (60).

- Choc chloré :

Le chlore, en présence d'eau, s'hydrolyse et donne naissance à l'acide hypochloreux. Ce dernier génère un sel d'acide, l'hypochlorite. On utilise l'hypochlorite de Sodium (eau de Javel) ou de Calcium (forme solide plus stable). Selon le pH de l'eau, le rapport HOCl/CLO⁻ varie. Quand le pH augmente, la concentration en HOCl diminue et celle de CLO⁻ augmente. Or HOCl est

100 fois plus actif que ClO^- . Dans une eau de pH élevé, l'activité biocide du chlore est donc plus faible.

Le chlore peut être utilisé à des fins curatives à des doses allant de 10 mg/l (après un nettoyage) à 100 voire 150 mg/l. Le chlore, oxydant puissant, a une action immédiate sur les bactéries libres mais il est rapidement réduit par les polysaccharides des couches extérieures du biofilm et ne pénètre donc pas à l'intérieur de celui-ci. De ce fait, son action paraît très efficace durant 1 ou 2 jours et la situation se dégrade ensuite très rapidement car le biofilm n'a pas été totalement éliminé.

Recommandations pratiques :

- Vérifier que le réseau peut supporter des doses élevées de chlore (corrosion inévitable).
- L'injection de chlore se fait par une pompe doseuse munie en aval de l'injection d'un clapet anti-retour.
- Les concentrations de chlore libre et le temps de contact sont définis par le tableau suivant :

15 mg/l	24h
50 mg/l	12h
150 mg/l	1h30

- Ces doses doivent être effectivement mesurées aux niveau de points d'usage représentatifs.
- Rincer et vérifier l'efficacité du rinçage par mesure du taux de chlore libre aux même points d'usage : On considère qu'un réseau est rincé si le taux de chlore libre est inférieur à 0,2 mg/l .

Dans les méthodes de traitement choc, il est indispensable de contrôler l'efficacité du traitement 24 à 72 heures après, à 8 jours de la désinfection, et à un mois.

- Dioxyde de chlore (60)(61):

Il s'agit d'un gaz instable produit in situ (du fait de son instabilité qui le rend explosif), soluble et stable dans l'eau. Il subit une hydrolyse à pH alcalin, qui est totale si le pH est supérieur à 11. Elle conduit alors à la formation de chlorite et de chlorate toxiques. C'est un oxydant très puissant, bactéricide à une dose faible (0,5 mg/l).

Avantages : Activité rémanente importante, pas d'activité corrosive, pas de gout à l'eau, bon pouvoir pénétrant dans les biofilms, pas de formation d'organo-chlorés, agréée par le CSHPF.

Inconvénients : Process difficile, couteux, générateur de chlorites et de chlorates potentiellement toxiques.

- Chloration continue (6)(60):

La chloration continue consiste à obtenir un titre constant de chlore libre de 1 à 2 mg/l au robinet à l'aide de pompes à chlore. Des études ont montré qu'il y a une corrélation inverse entre la concentration en chlore libre et la proportion de sites de prélèvements positifs pour *Legionella*. Une chloration continue de 4 à 6 mg/l de chlore libre induit une diminution de 5 à 6 logs de *Legionella* pendant 6 heures. Mais la concentration en chlore libre est difficile à maintenir constante sur un réseau d'eau complexe, notamment dans les portions distales de celui-ci. Il est donc essentiel de mesurer la concentration en chlore libre au niveau des points d'usage.

À des doses de 1 à 4 mg/l, des inconvénients apparaissent. Le chlore libre a un effet potentiellement tératogène du fait des produits de dégradation qu'il induit (Trihalométhanes et Organo-Chlorés). En outre, la chloration entraîne une dégradation des réseaux par corrosion.

L'utilisation d'hypochlorite reste néanmoins un procédé peu couteux, très efficace pour prévenir la prolifération bactérienne et rémanent quand la demande en chlore est suffisante.

- Ozone :

Ce gaz instable est produit in situ à partir d'air et/ou d'oxygène. L'ozone agit sur les molécules présentes dans l'eau selon deux modes d'action : Une réaction directe par oxydation et une réaction indirecte ou radicalaire (l'ozone donne en milieu alcalin le radical hydroxyl très réactif). L'eau oxygénée ou les ultra-violetts ont un effet activateur et peuvent donc être associés à l'ozone. La présence de matière organique diminue l'efficacité de l'ozone.

Une concentration de 0,79 mg/l suffit à éliminer *Legionella pneumophila* d'un circuit d'eau.

L'ozone est un désinfectant très puissant mais son prix, sa production complexe et l'absence d'effet rémanent le désavantagent par rapport au chlore.

- Monochloramine :

Une alternative intéressante à la chloration continue est l'utilisation de la monochloramine comme moyen de désinfection résiduelle. La monochloramine est obtenue en mélangeant ammonium et chlore libre. L'action désinfectante de la monochloramine est plus lente que celle du chlore libre mais elle est plus stable. De plus, la monochloramine pénètre mieux à l'intérieur du biofilm (6).

- Rayonnement ultra-violet (60):

Les rayonnements UV peuvent être utilisés comme moyen de désinfection unique seulement dans un réseau de faible volume. Ce moyen trouve essentiellement sa place dans une portion de réseau de distribution de l'eau où la prévention doit être impérativement renforcée comme les unités de transplantation. Le système est d'autant plus efficace qu'il y a recirculation en boucle de l'eau sur laquelle est appliqué le rayonnement UV. La maintenance du système doit être effectuée rigoureusement afin d'éviter une perte de puissance des lampes à UV. Des capteurs de rayonnement permettent de s'assurer de l'efficacité du système.

- Ionisation Cuivre / Argent :

Le système génère par hydrolyse des ions Cuivre et argent qui se fixent à la paroi bactérienne et induisent une lyse de cette paroi. L'activité de ces ions est favorisée par l'élévation de la température de l'eau. Cette méthode est efficace avec les concentrations faibles en ions (0,02 à 0,08 mg/l en Argent et 0,2 à 0,8 mg/l en Cuivre) (61) et n'altère pas la potabilité de l'eau. La maintenance nécessaire au bon fonctionnement du système est importante (nettoyage des électrodes encrassées) et doit comporter des mesures des concentrations en Cuivre et en Argent. Les concentrations en ions sont contrôlées par spectrophotométrie d'absorption atomique. Il existe un effet rémanent d'environ deux mois tout à fait intéressant. Il semblerait que cette méthode donne des résultats prometteurs dans la désinfection des réseaux d'eau. Une étude a montré que l'ionisation Cuivre/Argent était plus efficace sur les légionelles que le choc thermique (61). Cependant, cette méthode n'est pas autorisée à ce jour en France.

- Peroxyde d'hydrogène :

L'efficacité du peroxyde d'hydrogène est plus faible que celle du chlore. Il doit donc être utilisé à des doses importantes (250 mg/l à 2,5 g/l). L'ajout de catalyseurs (Fer, Argent, Cuivre) augmente son efficacité et sa stabilité en solution.

➔ Si on procède par utilisation de peroxyde d'hydrogène additionné de Cuivre ou d'Argent, une durée de contact de 20 à 30 minutes est suffisante pour une concentration de 2 mg/l en H₂O₂. (60)

➔ Rincer et vérifier l'efficacité du rinçage par mesure du taux peroxydes aux points d'usage : On considère qu'un réseau est rincé si le taux de peroxyde est inférieur à 0,5 mg/l.

Tableau 20 : Récapitulatif des méthodes de désinfection chimique des réseaux d'eau : (42)(60)

	Effacité sur les bactéries libres	Pouvoir rémanent	Effacité sur le biofilm	Praticité d'utilisation	Limites
Choc chloré	+++	+++	++	+	Corrosion Sous-produits toxiques
Péroxyde d'hydrogène	+/-	+++	+++	-	Biocide faible Rinçage
Chloration continue	++++	++++	++	+	pH
Chloramines	+	++	++	-	Toxicité
Dioxyde de chlore	++++	++++	++	+	
Ozone	++++	-	++	-	
Cuivre-argent	++	+++	+	-	Toxicité

La composition physico-chimique de l'eau et la nature des réseaux importe dans le choix de la méthode de désinfection mais c'est en pratique surtout l'activité bactéricide des procédés qui est retenue et la balance cout/efficacité/praticité d'utilisation. Ainsi, le chlore par son cout faible pour une activité correcte reste largement utilisé. Les autres oxydants sont moins utilisés. Le dioxyde de chlore semble par son efficacité de plus en plus utilisé, en particulier en milieu hospitalier. Les nouvelles techniques comme l'ionisation Cuivre/Argent, pour le moment non autorisée en France, semblent avoir un avenir dans la prévention des légionelloses grace à son efficacité démontrée.

CONCLUSION :

La légionellose est une pneumopathie aigüe causée par la bactérie *Legionella*. Cette bactérie, dont le réservoir est exclusivement hydrique peut contaminer les patients hospitalisés par l'intermédiaire de l'eau chaude sanitaire, par le panache contaminé d'une tour aérorefrigérante, par les systèmes de climatisation ou par les appareils de traitement respiratoire.

Les formes épidémiologiques sont de type sporadique ou épidémique. Dans le cas d'une épidémie de légionelloses nosocomiales, les enquêtes épidémiologiques et environnementales permettent de connaître les sources d'infection. Une fois que les mesures curatives visant à stopper l'épidémie sont prises, des mesures préventives doivent être envisagées, dans le but d'éviter l'apparition de nouveaux cas.

Parmi ces mesures, la recherche systématique des légionelles dans l'eau chaude sanitaire et dans les tours aérorefrigérantes a été imposée en France dans les établissements de santé. En complément, ces établissements sont guidés par différentes recommandations de bonnes pratiques sanitaires revues régulièrement en fonction des avancées de la recherche.

Depuis sa découverte en 1976, les connaissances sur cette maladie se sont beaucoup enrichies grâce à l'étude des différentes épidémies. Il s'avère aujourd'hui que la majorité des légionelloses survient chez des cas isolés pour lesquels la prévention est difficile à mettre en place.

Dans l'avenir, la réglementation devra continuer de traiter spécifiquement le risque lié aux légionelles dans les établissements de santé en fonction de leur spécificité de fonctionnement (le risque lié aux légionelles n'est pas identique dans tous les types d'établissements). Ainsi, et en complément de nouvelles études épidémiologiques et bactériologiques, des valeurs limites de concentration en légionelles dans l'eau pourront être proposées afin d'aider les établissements à gérer le risque "Légionellose nosocomiale".

BIBLIOGRAPHIE :

1. JARRAUD S., REYROLLE M., ETIENNE J. *Legionella* et légionelloses. Chapitre 80. Précis de bactériologie clinique. 2000. 1389-1405
2. EUZEBY JP. *Legionella*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire
3. CUSSENOT M. Surveillance épidémiologique et environnementale en vue d'une prévention de la maladie du légionnaire. Th.D.: Pharm.: Nancy I: 1998; 41
4. JARRAUD S., REYROLLE M., ETIENNE J. Importance des nouvelles méthodes de diagnostic biologique dans la surveillance : L'exemple des légionelloses. Lett. Infectiol. Microbiol.Clin.,1997,12(7):328-331
5. ECRIR Groupe. Le point sur la légionellose. Rev. Pneumol. Clin.,2001,57(4):253-256
6. FIEVRE C. Evaluation de la concentration en *Legionella pneumophila* de l'eau des douches de bâtiments accueillant du public au sein d'une collectivité locale. Th.: Pharm.: Anger: 2000; 141
7. SIMON L., DI MAJO P., PICHON M., HARTEMANN P. Proposition de niveaux de concentration en légionelles dans l'eau chaude sanitaire à l'hôpital. Hygiènes,2001,9(1):25-30
8. JACQUERIOZ F., FRANCIOLI P., RUEFF C. Prévention des infections nosocomiales à légionelles. Swiss-noso,1997 juin,4(2)
9. RUEFF C., PAGANO E., RAEBER PA. Légionelles à l'hôpital. Directions pratiques pour le dépistage. Swiss-noso,1998 juin,5(2)
10. JARRAUD S., REYROLLE M., MOLMERET M., LINA G., VANDENESCH F., ETIENNE J. Légionelles : Modalités d'application de la circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998 concernant la présence de Legionella dans l'eau. Lett. Infectiol. Microbiol.Clin.,2000,15(2)
11. WHO. Legionnaires' disease en Europe, 1999. Weekl. Epidemiol. Rec.,2000,Oct 27,75(43):347-352
12. DEPARDIEU C. Les légionelloses. Th.: Med.: Nancy: 1986;132
13. ROUSEE JM. Surveillance de la contamination des réseaux d'eau chaude sanitaire par *Legionella pneumophila*. Th.: Med.: Stras I.: 2000; 38
14. MOLINA C. Maladies des climatiseurs et humidificateurs. Clermont-Ferrand, 5-6, Septembre 1985, Paris: Ed. INSERM, 1986
15. FRENEY Y. *Legionella* et légionelloses, bactéries intracellulaires d'amibes. Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA. 2000, Paris, 2000, 1391-1410
16. LARPENT D. Memento technique de microbiologie, 2^{ème} Ed., Collection Tech et Doc, France, 1990: 417p

17. BORNSTEIN N., FLEURETTE J. *Legionella*. Manuel de bactériologie, 2^{ème} Ed., Ed. Scientifiques Elsevier, Paris, 1994: 1327-54
18. BERCHE P., GAILLARD J.L., SIMONET M. *Legionella*. Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Ed. Medecine-Sciences, Flammarion, Niort, Sep 1988: 244-8. 250p
19. AVRIL. *Legionella*. Bactériologie clinique, 2^{ème} Ed., Ed. ELLIPSE, France, 1992: 304-313
20. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionelloses. Circulaire DGS n° 97/311 du 24 Avril 1997 relative à la prévention de la légionellose. Bull. Epidemiol. Hebd., 1997,20-22:83-104
21. Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine
22. Circulaire DGS n° 98/771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en oeuvre des 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 batiments recevant du public. Bull. Epidemiol. Hebd., 1999, 6(23)
23. Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22/04/2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé
24. Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 oct 1937 modifié relatif au controle des sources d'eaux minérales naturelles
25. Circulaire DGS/VS4 n° 2000/366 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux
26. CSHPF. Gestion du risque lié aux légionelles. Dec 2001
27. CCLIN Sud-Ouest. Recommandations pour la prévention de la légionellose nosocomiale. Jan 2001
28. Norme AFNOR NF T 90-431 de nov 1993: Essai des eaux. Recherche et dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Méthode générale par ensemencement direct et filtration sur membrane.
29. CAMPESE C., DECLUDT B. Les légionelloses déclarées en France en 1998. Bull. Epidemiol. Hebd., 2000, 12:49-51
30. CSTB. Actes de colloques. Légionelles, état des lieux, 2000
31. RRH de Basse-Normandie. Journée d'étude. Légionellose: Mythe ou réalité. Quelle gestion des risques pour les établissements de santé? 18 Juin 2001
32. BARBOTTE E., CHEMARDIN J., BLECH M.F., PAQUIN J.L., LANCE P., HARTEMANN Ph. Deux ans et demi de surveillance environnementale de *Legionella* en Lorraine: premiers constats, premières solutions. Bull. Epidemiol. Hebd., 2000, 37:179-80
33. DECLUDT B., GUILLOTIN L., DUBROU S. JARRAUD S., Foyer épidémiologique de légionelloses à Paris en juin 1998. Bull. Epidemiol. Hebd., 1999, 21

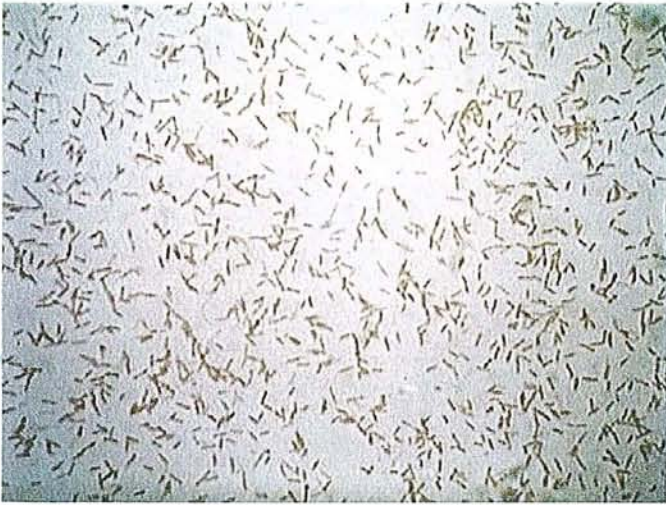
34. BAFFOY N., BRUCKER G. Prise en charge du risque "légionelles" dans les établissements de santé. Un état des lieux dans l'interrégion Nord. Bull. Epidemiol. Hebd., 2001, 30
35. DECLUDT B., PERROCHEAU A., CERASE-FEURRA V. Les légionelloses déclarées en France en 1997. Bull. Epidemiol. Hebd., 1999, 6:21-23
36. CAMPESE C., DECLUDT B. Les légionelloses déclarées en France en 1999. Bull. Epidemiol. Hebd., 2000, 12: 49-51
37. INFUSO A., HUBERT B., ETIENNE J. La sous-déclaration de la légionelloses en France : pour une surveillance plus active. Bull. Epidemiol. Hebd., 1998, 38: 165-167
38. CAMPESE C., DECLUDT B. Les légionelloses déclarées en France en 2000. Bull. Epidemiol. Hebd., 2001, 42: 199-201
39. CAMPESE C., DECLUDT B. Les légionelloses déclarées en France en 2001. Bull. Epidemiol. Hebd., 2002, 30-31: 149-155
40. CAMPESE C., DECLUDT B. Les légionelloses déclarées en France en 2001. Eurosurveillance, 7(9):121-126
41. DECLUDT B., GUILLOTIN L., DUBROU S. JARRAUD S., Foyer épidémiologique de légionelloses à Paris en juin 1998. Eurosurveillance, 4(11):111-126
42. SFHH. Liste positive désinfectants 2000. Hygiènes, 2000, 8(2):73-89
43. CSTB. Légionelles: risques dans les batiments. CSTB Magazine, 2000 Mars-avril, 128
44. LE GOUHIR C., FOURRIER P. Prévention de la prolifération des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire, DRASS/DDASS des pays de la Loire, 1999
45. CCLIN Paris-Nord, Ministère de l'emploi et de la solidarité. La légionellose, vous connaissez?. Dec 1999
46. KOOL J., CARPENTER J., FIELDS B. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water en risk of nosocomial Legionnaires' disease. The Lancet, 1999 Jan 23, 353: 272-77
47. Ministère de la santé et des affaires sociales. Guide des bonnes pratiques: *Legionella* et tours aéroréfrigérantes. 23/02/01. 62p
48. BORNSTEIN N. Activité comparée des antibiotiques sur les *Legionella*. Lett. Infectiol. Microbiol. Clin., 1995, 10: 321-26
49. LONGUET P., DUVAL X., LE MOING V. Antibiotic prophylaxis in patients at high risk of nosocomial outbreak of legionellosis. Press. Med., 1999, 28(32): 1755
50. MARSAL L. Légionellose nosocomiale. Rev. Pneumol. Clin., 2001 apr, 57(2):145-55
51. SOLLET M. Légionelloses: bientôt un outil diagnostique en ville?. Rev. Prat. Med. Gener., 2001, 15(535):857-858
52. YU V.L. Nosocomial legionellosis. Curr. Opin. Infect. Dis., 2000 aug, 13(4):385-88

53. THOMAL L. Legionellose et VIH. MEM.:Med.:Min.:2001
54. MALLET J.P., DEQUIN P.F., LEGRAS A., GINIES G., PERROTIN D. Légionelloses avec insuffisance respiratoire aigue. Particularités cliniques et biologiques, comparaison avec les pneumopathies à pneumocoque. Press. Med., 1996, 15:702-6
55. MEGARBANE B., SCHORTGEN F., MEMAIN N., DE BROUCKER T. Légionelloses grave chez l'immunodéprimé. Med. Therap., 1999, 5(5):411
56. JARRAUD S., LAWRENCE C., REYROLLE M. Les infections nosocomiales à légionelles. Med. Therap., 2000, 6(HS1):108
57. NARDONE C. Evaluation épidémiologique du système de surveillance de la légionelloses en France en 1998. Rapport de l'institut de veille sanitaire.
58. SIMON L., RABAUD Ch., DI MAJO P., BLECH MF., HARTEMANN Ph. Les procédés de désinfection d'un circuit d'eau à l'hôpital : Avantages et inconvénients. Hygienes, 1998, 6(6) : 406-411
59. LIN YE., STOUT JE., YU VL., VIDIC RD. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. Semin. Resp. Infect., 1998, 13(2) : 147-159
60. LIU Z., STOUT JE., BOLDIN M., RUGH J., DIVEN WF., YU VL. Intermittent use of Copper-Silver ionization for *Legionella* control in water distribution systems : A potential option in buildings housing individuals at low risk of infection. Clin. Infect. Dis., 1998, 26 : 138-40
61. STOUT JE., LIN YE., GOETZ A., MUDER R. Controlling *Legionella* in hospital water systems : Experience with the superheat-and-flush method and Copper-Silver ionization. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 1998, 19(12) : 911-914
62. PANKHURST CL., PHILPOTT-HOWARD JN., HEWITT J., CASEWELL M. The efficacy of chlorination and filtration in the control and eradication of *Legionella* from dental chair water systems. J. Hosp. Infect. 1990, 16 : 9-18
63. HAYES J. Control of *Legionella* in drinking water. The Lancet. 2000, 356(9238) : 1360
64. RUEF C. Nosocomial Legionnaires' disease – Strategies for prevention. J. Microbiol. Method., 1998, 33 : 81-91
65. Révision de la 4^{ème} Conférence de consensus en thérapeutique anti infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Med. Mal. Infetc., 2000, 30 : 566-580
66. ANAES. Evaluation des pratiques professionnelles dans les établissements de santé. Les pneumonies aiguës communautaires. Decembre 2001.

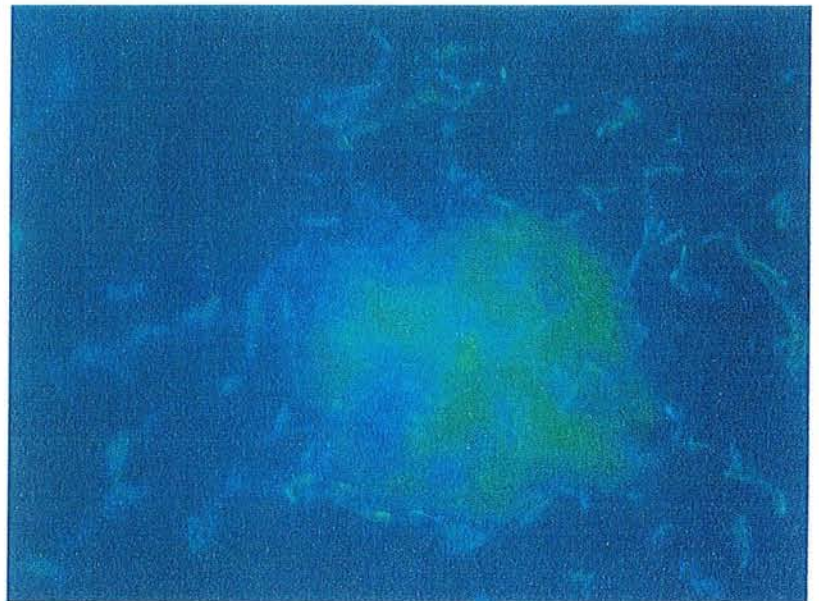
ANNEXES :

- Annexe 1 : Images et Photographies de Legionelles.
- Annexe 2 : Norme AFNOR NF-T 431 : Mesure de Legionella dans l'eau.
- Annexe 3 : fiche technique concernant les modalités de prélèvements (fiche technique extraite de la circulaire de 2002).
- Annexe 4 : : Fiche technique de déclaration d'un cas de légionellose- extraite de la circulaire de 1997
- Annexe 5 : Nature des canalisations de distribution d'eau chaude sanitaire et leurs avantages et inconvénients. (extrait de la circulaire de 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé) .
- Annexe 6 : Caractéristiques des installations de distribution d'eau chaude sanitaire et règles de maintenance. (extrait de la circulaire DGS n° 2002/243 du 22/04/2002)

Annexe 1 : Photographies de Légionelles :



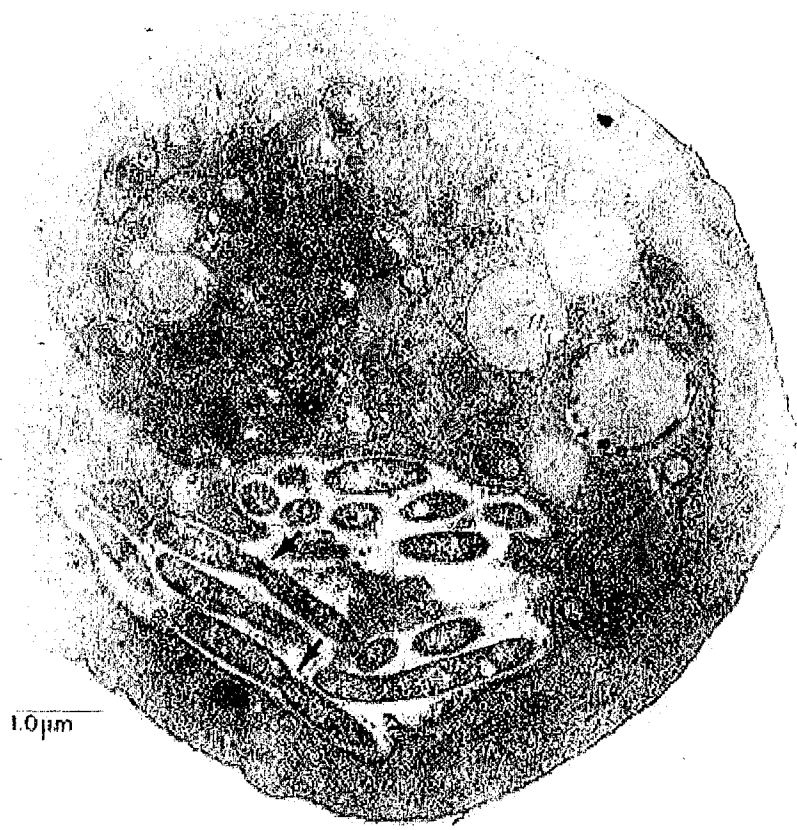
Légionelles vues au microscope classique. Bacilles Gram négatif.



Légionelles vues au microscope à fluorescence



Légionelles vues au microscope électronique



Amibe infectée par *Legionella*

Annexe 2 : Norme AFNOR NF-T 431 : Mesure de *Legionella* dans l'eau.

Essais des eaux

Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*

Méthode générale par ensemencement direct
et filtration sur membrane

- E: Testing water — Detection and enumeration of *Legionella* and *Legionella pneumophila* — General method by direct culture and membrane filtration
- D: Wasseruntersuchungen — Nachweis und Bestimmung von *Legionella* und *Legionella pneumophila* — Allgemeine Verfahren für das direkt Ansetzen und Membranfilter

Norme expérimentale publiée par l'afnor en novembre 1993.

Les observations relatives à la présente norme expérimentale doivent être adressées à l'AFNOR, avant le 31 décembre 1995.

correspondance À la date de publication du présent document, il existe un projet de norme internationale traitant du même sujet.

analyse Le présent document décrit une méthode générale pour la recherche et le dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Il a été conçu pour servir de référence dans certaines normes françaises pour l'analyse microbiologique de types d'eaux particuliers (eaux potables, eaux de baignade, eaux de surface, etc.) actuellement en cours d'élaboration à l'AFNOR. En conséquence son application directe, en dehors de ses usages prévus, implique de vérifier qu'il est adapté au type d'eau analysé et à la précision recherchée, et d'indiquer quelles options ou modifications sont adoptées dans ce but.

descripteurs Thésaurus International Technique : pollution de l'eau, essai des eaux, analyse microbiologique, recherche, comptage des bactéries, bactérie, bactérie aérobie, filtration, milieu de culture.

modifications

corrections

Membres de la commission de normalisation

Président : M DELATTRE

Secrétariat : MME THOMAS — AFNOR

M	CABRIDENC	INERIS
M	CHAMPSAUR	LABORATOIRE DE NICE
MME	de BUCHY	VITTEL
M	de SEVIN	BIOKAR DIAGNOSTICS
M	DELATTRE	INSTITUT PASTEUR DE LILLE
M	DUCASSE	BSN
MME	DUMOUTIER	LYONNAISE DES EAUX — DUMEZ
M	DUPONT	IFREMER
M	EMERAUD	SANOFI CHIMIE
M	FLEURETTE	LABORATOIRE NATIONAL DE LA SANTE DE LYON
M	HUYGHE	LABORATOIRE NATIONAL DE LA SANTE DE PARIS
M	JAUFFRET	VOLVIC
M	JORET	CGE
MME	LE GUYADER	CRECEP
MLLE	LAGNEAUX	LABORATOIRE D'HYGIENE DE LA VILLE DE PARIS
M	LARBAIGT	AGENCE DE BASSIN RMC
M	LEPAREUR	LABORATOIRE REGIONAL HYDROBIOLOGIE DE LA ROCHELLE
M	LESNE	ENSP DE RENNES
M	MÉDAIL	LABORATOIRE DE TOULON
MLLE	NAKACHE	SAUR
MME	NOUYRIGAT	QUALHYN SA
MME	OGER	INSTITUT PASTEUR DE LILLE
M	PAQUIN	LABORATOIRE D'HYGIENE ET DE RECHERCHE EN SANTE PUBLIQUE
MLLE	PEPIN	INSTITUT D'HYDROLOGIE DE CLERMONT-FERRAND
M	PERROLLET	INSTITUT PASTEUR DE LYON
MME	SARETTE	CRECEP
M	SEDALLIAN	CENTRE HOSPITALIER D'ANNECY
MLLE	SERCEAU	INSTITUT EUROPEEN DE L'ENVIRONNEMENT DE BORDEAUX
MME	SINEGRE	INSTITUT BOUISSON BERTRAND
M	TRICARD	MINISTERE DE LA SANTE — DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

Sommaire

	Pag.
Avant-propos	4
1 Domaine d'application	4
2 Références normatives	4
3 Définitions	4
3.1 Définitions générales	4
3.2 Définitions répondant aux besoins de la présente norme	4
4 Principe	5
5 Échantillonnage	5
6 Appareillage et verrerie	5
6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)	5
6.2 Loupe binoculaire	5
6.3 Étuve ou enceinte thermostatée	5
6.4 Boîtes de Pétri	5
6.5 Appareils de filtration	5
6.6 Membranes filtrantes	5
6.7 Pincés	5
6.8 pH-mètre	5
6.9 Appareils de filtration	5
6.10 Lames de verre	5
6.11 Microscope équipé pour la fluorescence	5
6.12 Générateur d'ultrasons	5
7 Milieux de culture, diluant, sérums et souches	6
7.1 Prescriptions générales	6
7.2 Diluant	6
7.3 Milieux de culture	6
7.4 Pool de sérums anti- <i>Legionella pneumophila</i>	10
7.5 Souches	10
8 Mode opératoire	11
8.1 Ensemencement	11
8.2 Incubation	11
8.3 Dénombrement des <i>Legionella</i>	11
8.4 Dénombrement des <i>Legionella pneumophila</i>	11
9 Expression des résultats	11
10 Procès-verbal d'essai	11

La présente norme a été élaborée par la commission de normalisation de l'AFNOR «Essais des eaux — Microbiologie». Elle est proche des travaux actuellement en cours à l'ISO/TC 147 «Qualité de l'eau», mais présente néanmoins quelques écarts techniques.

Avertissement

Les *Legionella* étant susceptibles de causer des infections humaines par inhalation, les manipulations suivantes doivent être effectuées par du personnel averti, avec toutes les précautions d'usage : travailler stérilement, éviter la formation d'aérosols, stériliser les déchets, etc.

1 Domaine d'application

La présente norme a pour objet la description d'une méthode d'isolement et de dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila* dans les eaux.

Cette méthode, faisant appel à un milieu sélectif, peut être appliquée à tous les types d'eaux (eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux industrielles, eaux naturelles, eaux thermales, etc.)

L'emploi de milieux de culture de conditions moins sélectives peut pour certaines eaux conduire à des résultats différents.

2 Références normatives

Cette norme française comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à cette norme expérimentale que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique.

NF T 90-420 Essais des eaux — Examens bactériologiques des eaux destinées à la consommation humaine.

3 Définitions

3.1 Définitions générales

3.1.1 *Legionella* : Bactéries en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatives, aérobies, flagellées ou non, exigeantes en L-cystéine, caractérisées par leur richesse en acides gras ramifiés, propriété très inhabituelle pour des germes à Gram négatif. Certaines souches de cette bactérie pathogène opportuniste peuvent causer des infections chez l'homme (légielloses).

3.1.2 *Legionella pneumophila* : *Legionella* répondant à la définition ci-dessus, donnant une réaction positive en présence d'un sérum anti-*L.pneumophila*, et responsables de la plupart des cas de légionellose.

3.2 Définitions répondant aux besoins de la présente norme

3.2.1 *Legionella* : Bactéries Gram négatives en bâtonnets incapables de croître sans L-cystéine sur gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure en 72 h à 37 °C.

3.2.2 *Legionella pneumophila* : Microorganismes répondant à la définition ci-dessus et donnant une réponse positive en immunofluorescence en présence d'un sérum anti-*L.pneumophila*.

Ensemencement direct de l'échantillon sur milieu sélectif, et en parallèle, filtration sur membrane polycarbonate, de diamètre nominal de pore 0,45 µm ou 0,22 mm, 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 évidence des *Legionella*.

Essai sérologique des colonies de *Legionella* pour la recherche des *Legionella pneumophila* à l'aide d'immunosérums spécifiques.

5 Échantillonnage

Les échantillons (1 l) doivent être prélevés dans des récipients stériles avec toutes les précautions nécessaires. (Flamber et éliminer le premier jet si l'on cherche à analyser la qualité du réseau en amont du point de prélèvement. Ne pas flamber ni éliminer le premier jet si l'on cherche à connaître la qualité au point d'usage.)

Les échantillons prélevés doivent être transportés en glacière. Ils doivent être remis le jour même au laboratoire chargé des analyses, et l'ensemencement doit être réalisé le plus rapidement possible.

Dans le cas d'échantillons provenant d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, le récipient collecteur doit de plus contenir du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants, introduits stérilement après stérilisation du flacon, ou préalablement à celle-ci, mais en tenant compte des pertes par oxydation (voir NF T 90-420).

0,5 % (m/v) de thiosulfate de sodium n'altère pas la survie des *Legionella*.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

À l'exclusion du matériel livré stérile, particulièrement celui en plastique, la verrerie doit être stérilisée

— soit au four, en la maintenant à une température comprise de 172,5 °C ± 2,5 °C pendant au moins 1 h

— soit à l'autoclave, en la maintenant à une température de 121 °C ± 1 °C pendant au moins 20 min

6.2 Loupe binoculaire

6.3 Étuve ou enceinte thermostatée réglée à 37 °C ± 1 °C, assurant une bonne répartition thermique et une humidité suffisante.

6.4 Boîtes de Pétri en verre ou en plastique, de capacité suffisante.

6.5 Appareils de filtration montés soit sur rampe spéciale, soit sur fioles à vide.

6.6 Membranes filtrantes en polycarbonate, de diamètre moyen de pores 0,22 µm ou 0,45 µm et d'environ 47 mm de diamètre.

6.8 pH-mètre.

6.9 Appareils de filtration à usage unique, de diamètre moyen de pores 0,22 µm, soit complets, soit à monter sur seringue, pour fabrication du milieu de culture.

6.10 Lames de verre téflonisées pour immunofluorescence.

6.11 Microscope équipé pour la fluorescence

Lampe à vapeur de Hg de 100 W ou 200 W.

Filtres d'excitation 430 nm et 490 nm.

Filtre d'arrêt à 515 nm.

Miroirs diviseurs dichroïques : filtres de coupure 510 nm.

Grossissement × 1 000.

6.12 Générateur d'ultrasons

7 Milieux de culture, diluant, sérums et souches

7.1 Prescriptions générales

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

Préparer les milieux à l'aide d'eau distillée, ou à défaut à l'aide d'eau déminéralisée exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

Les sérums doivent être spécifiques et avoir été testés avec un grand nombre de souches médicales et de l'environnement. Dans les échantillons d'eaux, la possibilité de réactions croisées avec d'autres microorganismes est fréquente.

7.2 Diluant

7.2.1 Eau distillée

Eau distillée exempte de substances inhibant la croissance dans les conditions de l'essai.

7.2.2 Eau distillée formolée à 1 % (V/V)

Composition :

Solution aqueuse de formol à 37 % (V/V) 10 ml

Eau distillée (7.2.1) 1 litre

7.2.3 Tampon phosphaté salé (PBS) 0,01 mol/l, pH 7,2

Composition :

Hydrogénophosphate disodique 1,233 g

Dihydrogénophosphate de potassium 0,180 g

Chlorure de sodium 8,5 g

Eau distillée (7.2.1) 1 litre

Solution A : dissoudre 1,420 g d'hydrogénophosphate disodique dans 1 litre d'eau distillée.

Solution B : dissoudre 1,361 g de dihydrogénophosphate de potassium dans 1 litre d'eau distillée

Mélanger 868 ml de la solution A avec 132 ml de la solution B. Dissoudre 8,5 g de chlorure de sodium dans le mélange.

7.2.4 Tampon pH 2,0

HCl 0,2 mol/l 3,9 ml

KCl 0,2 mol/l 25 ml

Ajuster à pH 2,0 avec KOH 1 mol/l.

7.2.5 Bouillon au glycérol

Composition :

Bouillon nutritif 5 g

Eau distillée (7.2.1) 170 ml

Glycérol 30 ml

Préparation :

Répartir en fioles de 2 ml et autoclaver à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

7.3 Milieux de culture

7.3.1 Milieux GVPC

7.3.1.1 Milieu de base pour BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract α-ketoglutarate)

Composition :

Extrait de levure 10 à 12 g

Charbon activé Norit A (ou SG) 1,5 à 2 g

Tampon ACES (2-[(2-Amino-oxoéthyl)-amino]éthanesulfonique) 5 à 10 g

α-cétoglutarate (sel de monopotassium) 1 g

KOH 1 mol/l 40 ml

Agar 12 à 17 g

Eau distillée (7.2.1) 950 ml

Préparation :

Mélanger l'extrait de levure, le charbon activé et l'agar. Dissoudre ces produits dans 450 ml d'eau distillée additionnée de 40 ml de KOH. Dissoudre le tampon ACES dans 500 ml d'eau distillée. Mélanger les deux portions de 500 ml et ajouter l'α-cétoglutarate. Ajuster si nécessaire le pH à 6,9 ± 0,2 avec KOH, 1 mol/l ou HCl, 1 mol/l.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

L-cystéine, HCl	0,40 g
Eau distillée (7.2.1)	5 ml

Préparation :

Dissoudre la L-cystéine dans l'eau distillée et stériliser sur filtre à 0,22 µm (6.9).

7.3.1.3 Solution de pyrophosphate ferrique

Composition :

Pyrophosphate ferrique	0,25 g
Eau distillée (7.2.1)	5 ml

Préparation :

Dissoudre le pyrophosphate ferrique dans l'eau distillée et stériliser sur filtre à 0,22 µm (6.9).

7.3.1.4 Solution d'antibiotiques et glycine

Polymyxine B (sulfate)	100 000 ui
Vancomycine hydrochloride	1 mg
Cycloheximide	80 mg
Eau distillée	10 ml
Glycine (sans ammonium)	3 g

7.3.1.5 Milieu complet (GVPC) avec antibiotiques

Composition :

Milieu de base (7.3.1.1)	990 ml
Solution de L-cystéine (7.3.1.2)	5 ml
Solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3)	5 ml
Solution d'antibiotiques et glycine (7.3.1.4)	10 ml

NOTE : Le cycloheximide est hépatotoxique. Des gants et un masque sont nécessaires lors de sa manipulation sous forme de poudre.

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, ajouter les autres composants dans l'ordre ci-dessus, en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Pétri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à 4 °C à l'obscurité pendant une période maximale de 15 jours ou selon les prescriptions du fabricant. Vérifier que le pH est à 6,9 ± 0,2.

Composition :

Milieu de base (7.3.1.1)	990 ml
Solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3)	5 ml

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, ajouter la solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3) en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Pétri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à 4 °C à l'obscurité pendant une période maximale de 15 jours ou selon les instructions du fabricant.

7.3.3 Milieu BCYE α sans antibiotique

Composition :

Milieu de base (7.3.1.1)	990 ml
Solution de L-cystéine (7.3.1.2)	5 ml
Solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3)	5 ml

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, ajouter les autres composants dans l'ordre ci-dessus, en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Pétri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à 4 °C à l'obscurité pendant une période maximale de 15 jours ou selon les instructions du fabricant.

7.3.4 Gélose au sang

7.3.4.1 Milieu de base

Composition :

Peptone tryptique de caséine	15 g
Peptone papainique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée (7.2.1)	1 000 ml

Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau à ébullition. Ajuster le pH à 7,3 ± 0,2 avec KOH, 1 mol/l ou HCl, 1 mol/l à 20 °C. Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 20 min.

7.3.4.2 Sang

On choisira indifféremment du sang défibriné stérile de cheval ou de mouton, vendu en ampoules scellées.

7.3.4 Milieu complet

Composition :

Milieu de base (7.3.4.1)	1 000 ml
Sang défibriné (7.3.4.2)	5 ampoules de 10 ml

Préparation :

Au milieu de base (7.3.4.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, incorporer le sang et homogénéiser d'un mouvement ample et régulier du poignet entraînant un mélange par rotation en évitant la formation de bulles. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Pétri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 3 mm environ. Laisser se solidifier. Ce milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à 4 °C à l'obscurité pendant une période maximale de huit jours ou selon les instructions du fabricant.

7.3.5 Contrôle de qualité du milieu de culture

Le chauffage prolongé ou à trop haute température durant la stérilisation peut affecter les qualités du milieu BCYE α . Des variations au niveau des ingrédients (particulièrement l' α -cétoglutarate) peuvent aussi diminuer ses performances. C'est pourquoi il est essentiel de tester chaque nouveau lot de milieu fraîchement préparé avec une souche de *L.pneumophila*.

Dans le cas des *Legionella*, il n'est pas recommandé d'utiliser pour les contrôles, des cultures de collection ou des souches maintenues en culture au laboratoire, car les *Legionella* peuvent s'adapter à des milieux de culture qui ne permettent pas l'isolement des souches sauvages. La méthode suivante doit être respectée.

Pour une ou, de préférence, plusieurs souches de *Legionella* fraîchement isolées à partir d'échantillons d'eaux (méthode décrite à l'article 8), préparer des suspensions comme suit :

- isoler les souches sur BCYE α et incubé à 37 °C ;
- à partir de la subculture, faire une suspension dense dans du bouillon au glycérol (7.2.5). Répartir en fractions de 1 ml pour stocker à -20 °C ou faire la suspension dans 1 ml d'eau distillée (7.2.1) pour stocker à -70 °C ;
- garder un tube pour l'identification biochimique et sérologique complète de chaque *Legionella*.

Pour un contrôle, sortir un ou plusieurs tubes du congélateur, les laisser décongeler à température ambiante puis agiter vigoureusement et ensemercer divers volumes de suspension sur une boîte de milieu GVPC, à tester, ainsi qu'une boîte témoin du lot de GVPC précédent.

Dénombrer les *Legionella*.

Le milieu préparé est considéré comme acceptable lorsque les intervalles de confiance des deux mesures (voir tableau 1) se chevauchent.

7.4 Pool de sérums anti-*Legionella pneumophila*

Utiliser un sérum polyclonal, ou mieux, un anticorps monoclonal capable de réagir avec tous les sérogroupes connus de *Legionella pneumophila*.

7.5 Souches

7.5.1 *Legionella pneumophila* sérotype 1 (NCTC 11192 ou ATCC 33152)

7.5.2 *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 15453)

8 Mode opératoire

8.1 Ensemencement

8.1.1 Ensemencer 0,2 ml d'eau à analyser et 0,2 ml de la dilution au 1/10 en tampon phosphaté (7.2.3), chacun sur une boîte de Pétri (6.4) contenant le milieu GVPC (7.3.1.5).

8.1.2 Filtrer 1 l d'eau sur membrane(s) en polycarbonate (6.6) puis,

— soit gratter la membrane dans 5 ml d'eau à analyser ; ensemercer 0,1 ml de ce concentré sur boîte de milieu (7.3.1.5),

— soit placer au milieu d'une cuve à ultrasons un récipient contenant la membrane en polycarbonate immergée dans 5 ml d'eau à analyser pendant un temps compris entre 2 min et 10 min ; ensemercer 0,1 ml de ce concentré sur une boîte de milieu (7.3.1.5).

NOTE : Il est recommandé d'étalonner la cuve à ultrasons avec une souche de *L.pneumophila* p pour déterminer le meilleur temps de traitement.

Le récipient doit être seul dans la cuve à ultrasons et le niveau d'eau à l'intérieur du récipient se doit être au même niveau que le niveau d'eau de la cuve.

Traiter une partie de l'échantillon concentré restant par traitement thermique, et une autre partie par traitement acide :

7.1.1 Traitement thermique

Porter 2 ml d'échantillon concentré dans un tube stérile et placer ce tube dans un bain thermostaté à 50 °C \pm 1 °C pendant 30 min \pm 1 min.

Ensemencer immédiatement une boîte de milieu sélectif (7.3.1.5) avec 0,1 ml d'échantillon traité par chaleur.

— Traitement acide

Porter 2 ml d'échantillon concentré dans un tube et centrifuger à 60 000 m.s⁻² pendant 10 min \pm 1 min.

Enlever 1 ml de surnageant avec une pipette stérile et agiter vigoureusement. Ajouter 1 ml de tampon acide (7.2.4) et agiter doucement. Laisser en contact 5 min \pm 0,5 min.

Ensemencer immédiatement une boîte de milieu sélectif (7.3.1.5) avec 0,1 ml d'échantillon traité par l'acide.

NOTE : Il est possible de ne pas centrifuger. Dans ce cas, ajouter à 2 ml d'échantillon, 2 ml de tampon acide. Après un temps de contact de 5 min \pm 0,5 min, ensemercer immédiatement 0,2 ml sur une boîte de milieu sélectif ou ensemercer deux boîtes avec 0,1 ml par boîte de milieu sélectif.

8.2 Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve ou l'enceinte thermostatée (6.3) à 37 °C \pm 1 °C pendant 10 jours. Examiner les boîtes après 3,5 et 10 jours d'incubation.

8.3 Dénombrement des *Legionella*

Sont considérées comme caractéristiques, les colonies qui présentent, après incubation à 37 °C ± 1 °C, une coloration générale gris-bleu pouvant devenir blanchâtre en vieillissant, un bord bien net et rosé, et un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire.

Conserver les boîtes présentant de 1 à 50 colonies caractéristiques. N étant le nombre de colonies caractéristiques, repiquer en vue d'identification biochimique et sérologique :

- toutes ces colonies si 1 < N ≤ 5
- 5 à 7 colonies si 5 < N ≤ 50.

Confirmation :

Repiquer les colonies suspectes dans l'ordre suivant, sur :

- gélose BCYE α sans L-cystéine (7.3.2),
- gélose au sang (7.3.4.3),
- gélose BCYE α avec L-cystéine (7.3.3).

Incuber à 37 °C ± 1 °C durant 3 jours.

Examiner les boîtes dès la fin de la période d'incubation prescrite.

La présence de culture sur gélose au sang (7.3.4.3) et/ou gélose BCYE α sans L-cystéine (7.3.2) infirme la présence de *Legionella*.

Compter comme *Legionella* toutes les colonies, à Gram négatif, ne se développant que sur milieu BCYE α (7.3.3) et présentant un aspect granuleux, et une coloration générale gris-bleu pouvant devenir blanchâtre en vieillissant.

8.4 Dénombrement des *Legionella pneumophila*

Sont considérées comme *L.pneumophila* les colonies précédentes qui présentent une réaction positive en immunofluorescence en présence d'un sérum anti-*L.pneumophila*.

Se conformer aux indications du fabricant ou suivre l'exemple indiqué ci-dessous :

Immunofluorescence directe :

- Émulsionner la colonie suspecte dans un tube de 5 ml contenant l'eau distillée formolée à 1 % (7.2.2) afin d'avoir une suspension légère.
- Déposer cette suspension bactérienne dans un puits (n° 4) d'une lame de verre (6.10) à raison de 10 µl par puits.
- Déposer 10 µl d'eau distillée stérile (7.2.1) comme blanc dans le puits n° 1.
- Déposer 10 µl d'une suspension de *L.pneumophila* séro-groupe 1 (7.5.1) qui servira de témoin positif dans le puits n° 3.
- Déposer 10 µl de *Pseudomonas fluorescens* (7.5.2) comme témoin négatif dans le puits n° 2.

Eau	<i>P.fluorescens</i>	<i>L.pneumophila</i> séro-groupe 1	Souche X	
1	2	3	4	Sérum anti- <i>L.pneumophila</i>

- Sécher la lame à l'étuve à 37 °C ± 1 °C.
- Rincer éventuellement à l'eau distillée.

(sérum anti-*L.pneumophila*) dans les puits 1 à 4.

- Laisser en contact pendant 20 min en chambre humide (6.3) à 30 °C ± 1 °C.
- Rincer rapidement avec le tampon phosphaté salé (7.2.3).
- Immerger 5 min dans le tampon phosphaté salé (7.2.3).
- Rincer éventuellement à l'eau distillée (7.2.1).
- Sécher à l'air.
- Monter la lame sous huile à immersion non fluorescente et examiner au microscope équipé pour fluorescence (6.11).

Sont considérées comme *L.pneumophila*, les colonies qui par immunofluorescence montrent la présence de bacilles fluorescents en présence du sérum. L'essai n'est valable que si la réaction est négative à l'eau distillée et *P.fluorescens* et positive avec *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 de référence.

9 Expression des résultats

Par convention, chaque colonie est considérée comme ayant été engendrée par un microorganisme.

Considérer d'abord les boîtes ensemencées en direct (8.1.1).

Si l'une de ces boîtes fournit un nombre exploitable (n > 4) de colonies confirmées, calculer le résultat en divisant le nombre de colonies confirmées par le volume ensemencé de la boîte exploitable exprimé en litres. Exprimer les résultats de la façon suivante :

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

Si les deux boîtes (8.1.1) donnent des nombres exploitables (4 < n < 100) de colonies confirmées, faire la somme des colonies apparues sur les boîtes lisibles et diviser par le volume total ensemencé dans les mêmes boîtes et ramener à 1 l. Par exemple : 39 colonies dans 0,2 ml et 5 colonies dans 0,02 ml, soit 44 colonies dans 0,22 ml conduisent à un résultat de 20 × 10⁵/litre.

Si les deux boîtes (8.1.1) sont inexploitables, examiner les boîtes ensemencées après concentration (8.1.2). Parmi les trois séries (sans traitement, après traitement thermique, après traitement acide), retenir celle qui conduit au résultat le plus élevé. Exprimer ce résultat comme ci-dessus :

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

NOTE : Il n'est pas correct de faire la moyenne des résultats obtenus sur les trois séries de boîtes puisque ce ne sont pas des répétitions.

Si les boîtes ensemencées à partir du concentré (8.1.2) ne fournissent pas de colonies confirmées, qu'il en existe un petit nombre (n < 5) sur l'une des boîtes ensemencées en direct (8.1.1) exprimer le résultat sous la forme suivante :

Nombre de *Legionella* < 50/litre
dont *L.pneumophila* < 50/litre

avec le commentaire suivant : « présence de quelques colonies de *Legionella* (ou *L.pneumophila*) en nombre non significatif ».

Le tableau 2 donne, à titre indicatif, les valeurs approchées des limites de confiance à 95 % attachées à un nombre de *Legionella* confirmées.

REMARQUES :

- En dehors des colonies caractéristiques, on peut trouver sur les boîtes un grand nombre de colonies d'autres espèces qui peuvent gêner la croissance des *Legionella*. On peut risquer dans ce cas une erreur par défaut.
- Quant aux *Legionella* présumées ne réagissant pas avec le sérum anti-*L.pneumophila*, elles doivent être recherchées pour identification plus complète à un laboratoire spécialisé.

Le procès-verbal d'essai doit contenir les indications suivantes :

- toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon ;
- les résultats exprimés sous la forme indiquée à l'article 9 ;
- tout détail opératoire non prévu dans la présente norme, ainsi que les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats ;
- la référence à la présente norme.

Tableau 1 : Limites de confiance à 95 % attachées au nombre de colonies dénombrées par boîte

Nombre n de colonies par boîte	Limite de confiance à 95 %	
	Inférieure	Supérieure
1	—	4
2	—	6
3	—	8
4	0	9
5	0	11
6	1	12
7	1	14
8	2	15
9	3	16
10	3	18
11	4	19
12	5	20
13	5	21
14	6	23
15	7	24
16	8	25
17	8	27
18	9	28
19	10	29
20	11	30
25	15	36
30	19	42
35	23	48
40	27	54
45	31	60
50	36	65
55	40	71
60	44	77
65	49	82
70	53	88
75	58	93
80	62	99
85	66	105
90	71	110
95	75	116
100	80	121

NOTE : Les limites de confiance données dans le tableau 1 ne sont destinées qu'à fournir quelques notions de l'influence des variations statistiques sur les résultats (distribution de Poisson). Il y a toujours d'autres sources de variations dues à la manipulation elle-même.

Limites de confiance à 95 % attachées au nombre de *Legionella* confirmées

Colonies confirmées dans 0,2 ml d'eau			Colonies confirmées dans 0,02 ml d'eau			Colonies confirmées dans 0,1 ml du concentré		
Direct	<i>Legionella</i> par litre	LC95 *)	Direct	<i>Legionella</i> par litre	LC95 *)	Direct	<i>Legionella</i> par litre	LC95 *)
						0	< 50	0-150
						1	50	1-150
						2	100	1-240
						3	150	1-320
						4	200	1-400
						5	250	30-480
						6	300	50-550
						7	350	80-620
						8	400	120-680
						9	450	150-750
						10	500	200-800
						18	900	470-1 300
						19	950	500-1 400
						20	1 000	550-1 450
						30	1 500	950-2 050
						31	1 550	990-2 100
1	5 000	1-15 000				32	1 600	1 050-2 150
						40	2 000	1 350-2 650
						100	5 000	4 000-6 000
2	10 ⁴	1-24 000						
4	2.10 ⁴	1-40 000						
5	2,5.10 ⁴	3 000-47 000						
10	5.10 ⁴	2.10 ⁴ -8.10 ⁴	1	5.10 ⁴	1-1,5.10 ⁵			
20	10 ⁵	5.10 ⁴ -1,5.10 ⁵	2	10 ⁵	1-2,4.10 ⁵			
40	2.10 ⁵	1,5.10 ⁵ -2,6.10 ⁵	4	2.10 ⁵	3.10 ⁴ -4,9.10 ⁵			
10	5.10 ⁵	4.10 ⁵ -6.10 ⁵	5	2,5.10 ⁵	2.10 ⁵ -8.10 ⁵			
			10	5.10 ⁵	5,5.10 ⁵ -1,4.10 ⁶			
			20	10 ⁶	1,5.10 ⁶ -2,6.10 ⁶			
			40	2.10 ⁶	4.10 ⁶ -6.10 ⁶			
			100	5.10 ⁶				

NOTE : Ces limites ne sont valables que si 100 % des colonies caractéristiques ont été repiquées. Si moins de 100 % des colonies caractéristiques sont repiquées, intervient en plus l'incertitude due à ces sondages.

*) LC95 = Limites de confiance à 95 % dues à la distribution de poisson des *Legionella* dans l'eau (valeur approchées).

**) Par exemple, le chiffre de 900 *Legionella* par litre peut provenir de 18 colonies caractéristiques toutes confirmées, ou de 36 colonies caractéristiques repiquées, mais avec seulement 18 colonies confirmées.

**Annexe 3 : fiche technique concernant les modalités de prélèvements (fiche
technique extraite de la circulaire de 2002).**

FICHE VI

**MODALITES DE PRELEVEMENTS POUR LA RECHERCHE DE LEGIONELLES ET
LABORATOIRES COMPETENTS POUR LES ANALYSES DE LEGIONELLES DANS L'EAU**

D) PRELEVEMENT⁸

Rappels : Les légionelles prolifèrent sur les surfaces en contact avec l'eau et sont émises dans la veine liquide en fonction notamment des mouvements hydrauliques. Les caractéristiques de fonctionnement des équipements et les modalités de recueil de l'eau interviennent sur les dénombrements et doivent donc être connues pour permettre d'interpréter les résultats.

Le choix des points de prélèvement et les modalités de prélèvement relèvent de la stratégie d'échantillonnage.

La recherche de légionelles est habituellement réalisée à partir d'échantillons d'eau (volume 1 litre) en respectant la norme NF T 90 - 431. L'analyse d'échantillons d'éléments solides présente un intérêt écologique mais les prélèvements s'avèrent parfois délicats et sont peu pratiqués en France (norme ISO 11731). Quant aux échantillons d'air, les difficultés liées aux conditions de prélèvement en réservent l'analyse à des situations bien ciblées où un émetteur d'aérosols est identifié. Seules les analyses de légionelles dans l'eau sont traitées dans cette fiche.

I-1 – Matériel

- ◆ Flaconnage : récipients stériles d'un volume de 1 litre, si possible en plastique pour éviter la casse du verre.
 - Les flacons destinés à être introduits dans l'eau sont conditionnés en emballage stérile.
 - Les échantillons provenant de réseaux d'eau traités par un oxydant sont recueillis dans des flacons contenant du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser l'oxydant.
 - Dans le cas des fluides techniques de tours aéroréfrigérantes traitées avec d'autres classes de produits, la composition des mélanges neutralisants n'est pas définie⁹. Canne, entonnoir et raclette flambables, dispositif stérile pour aspiration d'eau
- ◆ Chalumeau
- ◆ Thermomètre
- ◆ Trousse de dosage du chlore
- ◆ Enceinte réfrigérée
- ◆ Gants stériles
- ◆ Une trousse d'analyse pour le dosage de la concentration en désinfectants si le réseau est traité.

⁸ Quelques références :

- ◆ NF - EN 25667 - 2 et 3. Qualité de l'eau. Echantillonnage
 - 2 - Guide général sur les techniques d'échantillonnage
 - 3 - Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.
- ◆ NF T 90 - 421. Examen bactériologique des eaux de piscine.
- ◆ NT T 90 - 431. Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Méthode générale par ensemencement et filtration sur membrane. 1993
- ◆ Norme internationale ISO 11731. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella*. 1998
- ◆ British standard ; BS 7592. Methods for sampling for *Legionella* organisms in water and related materials. 1992

⁹ Cet élément est à prendre en considération, dans la stratégie d'échantillonnage, lors de traitements continus.

.../...

I-2 - Réseaux d'eau intérieurs des bâtiments

I-2 - 1 - Points techniques sur réseau d'eau chaude

- ◆ Vannes de sortie d'eau du générateur, du retour de boucle, de pied de colonne,... : flamber et faire préalablement couler l'eau 2 à 3 minutes de façon à réduire la contamination périphérique.
- ◆ Partie basse de ballon : faire couler l'eau abondamment pour chasser les dépôts de la canalisation d'évacuation (faire en sorte de ne pas prélever l'eau froide d'alimentation).

I- 2 -2 -Points d'usage sur réseau d'eau chaude : robinets et pommes de douche

- ◆ Contrôle de l'exposition : le prélèvement d'eau est réalisé sur le premier jet d'eau de façon à recueillir la contamination périphérique, supposée être la plus importante. Mousseur et pomme de douche ne sont pas démontés.

Relever le temps nécessaire à l'obtention de la température de consigne. Indiquer les conditions d'usage du poste avant le recueil¹⁰.

- ◆ Contrôle des conditions de maîtrise du réseau : le prélèvement d'eau est effectué après écoulement de 2 à 3 minutes de façon à recueillir l'eau de l'amont.
Pour éviter toute détérioration de la robinetterie, le flambage n'est pas préconisé.

I- 2 - 3 - Postes sur réseau d'eau froide

- ◆ Points techniques, aval compteur... : recueillir l'eau après flambage et écoulement.
- ◆ Points d'usage périphériques : prélever l'eau après écoulement, au niveau d'un robinet simple bec, si possible. En effet, un prélèvement effectué sur un mélangeur ou mitigeur risque d'entraîner la flore périphérique liée à l'eau chaude.

I- 3 - Tours aéroréfrigérantes et condenseurs à évaporation forcée

I- 3 -1 - Prélèvements d'eau

Ils sont réalisés sur des équipements en fonctionnement, c'est à dire en eau circulante et ce à distance des opérations de traitement « choc » (au moins 48 heures après le traitement de choc ou juste avant).

- ◆ Caissons de réception des fluides de ruissellement : après arrêt du ventilateur et ouverture de la trappe d'accès par l'agent d'exploitation, introduire le flacon dans l'eau en s'écartant du point d'arrivée de l'eau d'appoint (prendre la précaution de revêtir un gant ou utiliser une canne à prélèvement préalablement décontaminée par flambage). A défaut, l'échantillon peut-être recueilli au niveau de la vanne de purge, après avoir procédé à un écoulement abondant.
- ◆ Circuit d'eau
 - amont de la pulvérisation: après ouverture de la vanne, laisser l'eau s'écouler environ 1 minute et la recueillir dans le flacon en évitant tout contact avec le robinet.
 - aval du caisson de ruissellement : après ouverture de la vanne, laisser l'eau s'écouler environ 1 minute et la recueillir dans le flacon en évitant tout contact avec le robinet.
 - bache : remplir le flacon selon les modalités décrites pour le caisson.

A proximité immédiate de la tour, l'agent préleveur doit porter un masque de type P3, destiné à le protéger des aérosols biologiques.

¹⁰ - Les échantillons recueillis sur des points d'eau non utilisés depuis plusieurs jours conduisent à des dénombrements de 1 à 2 log plus élevés que si l'usage en est quotidien.

- L'incorporation de produits d'écouvillonnage dans un échantillon d'eau doit être réservée à une étude écologique qualitative.

.../...

I- 3 - 2 - Prélèvements de boues ou de biofilms.

Ils sont réalisés au niveau du caisson, de la partie supérieure de la tour de refroidissement ou de toute autre localisation pour identifier des niches contaminantes. Le support est gratté à l'aide d'une raclette préalablement décontaminée par flambage et le dépôt est introduit dans un récipient stérile.

I- 4 - Installations de conditionnement d'air

- ◆ Batterie froide : si le fond du bac est recouvert d'eau, aspirer celle-ci à l'aide d'une seringue stérile.
- ◆ Laveur d'air : l'eau du bac est introduite dans le flacon fixé à une canne de prélèvement préalablement décontaminée par flambage,
- ◆ Générateur d'aérosols : l'eau est prélevée dans le réservoir selon un mode de soutirage approprié à chaque système. Le dispositif de traitement d'eau situé en amont peut faire l'objet également d'un prélèvement.

I- 5 - fontaines décoratives, etc.

- ◆ Sortie immédiate du bassin, au niveau d'une vanne sur la canalisation de recirculation de l'eau : après flambage et écoulement.
- ◆ Dans le bassin : l'eau est recueillie dans un flacon fixé à une canne préalablement décontaminée par flambage.

I-6 - Fiche de prélèvement

Seront notamment mentionnés :

- les coordonnées du bâtiment
- la date, l'heure du prélèvement, le nom du préleveur
- le type d'installation et la nature des traitements correcteurs
- les références et localisations des points de prélèvement
- les modalités d'usage des postes de puisage avant les prélèvements
- la température relevée sitôt le recueil effectué et, pour les réseaux d'eau chaude, le temps nécessaire pour atteindre la température de consigne
- la nature et la concentration en désinfectant si le réseau est traité.

I- 7 - Conditions d'acheminement

Les prélèvements sont programmés en accord avec le laboratoire qui effectue les analyses.

Les échantillons sont remis le jour même au laboratoire pour analyses. Si leur réception est prévue pour le lendemain, ils sont placés dans un emballage réfrigéré. Ne pas congeler les échantillons.

II) LABORATOIRES COMPETENTS POUR LES ANALYSES DE LEGIONELLES

Dans le cadre de l'autosurveillance des installations demandée par les circulaires de 1997 et 1998, il est vivement recommandé de s'adresser aux trois catégories de laboratoires qualifiés ci-après :

- Laboratoires agréés par le ministre chargé de la santé pour les eaux minérales ;
- Laboratoires agréés par le ministre chargé de la santé pour le contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine qui réalisent les analyses de légionelles ;
- Laboratoires accrédités par le COFRAC pour le paramètre légionelles ;

.../...

Dans tous les cas, si l'établissement ne s'adresse pas à l'une des catégories de laboratoires décrite ci-dessus, il est fortement conseillé de s'assurer à minima que le laboratoire utilise la norme AFNOR T 90-431, participe à des réseaux d'intercalibration conformes à la norme ISO 43 et dispose d'une expérience significative dans le domaine des analyses d'eau.

**Annexe 4 : : Fiche technique de déclaration d'un cas de légionellose-
extraite de la circulaire de 1997**

Questionnaire à retourner à la
DASS de :

LEGIONELLOSE

- Maladie à déclaration obligatoire (décret du 10-06-1986, modifié en 1987)
- Droit d'accès et de rectification par l'intermédiaire du médecin déclarant (loi du 06-01-1978)
- Centralisation des informations au Réseau National de Santé Publique

CRITERES DE DECLARATION : Pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants :

- cas confirmé :*
1. isolement de *Legionella spp.* dans un prélèvement clinique
 2. augmentation du titre d'anticorps (x4) avec un 2ème titre minimum de 128
 3. immunofluorescence directe positive
 4. présence d'antigène soluble urinaire
- cas possible :*
5. titre d'anticorps élevé (≥ 256)

CARACTERISTIQUES DU PATIENT Initiale du nom _____ Prénom _____

Date de naissance |__|_|_|_| Sexe M F Code postal du domicile _____

Profession : _____

CLINIQUE Date des premiers signes |__|_|_|_| Pneumopathie confirmée radiologiquement : oui non

Évolution : Guérison Encore malade Décès si oui, date décès |__|_|_|_|

CONFIRMATION DU DIAGNOSTIC

	Pos	Nég	Non effectué
Culture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immunofluorescence directe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antigène soluble urinaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sérologie

1er prélèvement	2ème prélèvement
Date __ _ _ _	Date __ _ _ _
Titre 1 : _____	Titre 2 : _____
<input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> En cours
<input type="checkbox"/> Non effectué	<input type="checkbox"/> Non effectué

Espèce/sérogroupe *L. pneumophila* sérogroupe 1 Autre espèce (préc) : _____
 L. pneumophila autre sérogroupe (préc) : _____ En cours

FACTEURS FAVORISANTS

Hémopathie ou cancer Corticothérapie Autres immunosuppresseurs
 Tabagisme Diabète Autres préciser : _____

EXPOSITIONS A RISQUE (dans les 10 jours précédant les premiers signes de légionellose)

	Oui	Non	Période	Hôpital :
Hôpital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du __ _ _ _ au __ _ _ _	_____
Station thermale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	du __ _ _ _ au __ _ _ _	Service : _____ Lieu : _____

Indiquer précisément les lieux (ville, pays) et types d'hébergement (adresse)
(si besoin, détails sur une feuille jointe)

Voyage, hôtel, camping,... du |__|_|_|_| au |__|_|_|_| _____
du |__|_|_|_| au |__|_|_|_| _____
du |__|_|_|_| au |__|_|_|_| _____

Piscine, jacuzzi.. préciser _____
Autre exposition préciser _____

NOTION DE CAS GROUPES (cas liés aux mêmes lieux d'exposition dans les 6 derniers mois)

Oui Non Si oui, préciser : _____

MEDECIN DECLARANT

Date de déclaration |__|_|_|_|

Nom : _____ Adresse : _____

Tél : _____ Signature et tampon

N. B. Si une enquête environnementale a eu lieu, merci de joindre une copie du rapport à cette fiche de déclaration

Annexe 5 : Nature des canalisations de distribution d'eau chaude sanitaire et leurs avantages et inconvénients. (extrait de la circulaire de 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé) .

Tableau n°2 : Nature des canalisations de distribution d'eau chaude sanitaire

Matériau	Avantages	Inconvénients	Recommandations
<p>Pour éviter les problèmes d'incompatibilité de matériaux entre eux, il faut vérifier la nature des différents matériaux en contact avec l'eau chaude sanitaire dans l'établissement. Pour les installations neuves ou lors d'une restructuration des réseaux d'eau chaude sanitaire, il est déconseillé d'utiliser de l'acier galvanisé.</p> <p>Remarque : Pour les matériaux plastiques à fort pouvoir de dilatation, adapter le montage si prévision d'éventuels chocs thermiques.</p>			
Cuivre NF A 51 120	<p>Mise en œuvre facile / pertes de charges faibles.</p> <p>Désinfection thermique et chimique (chlore ou peroxydes après nettoyage) possibles.</p> <p>Limite la formation du bio-film par action bactéricide de contact.</p>	<p>Aucun fabricant n'a demandé la marque NF pour des tubes de diamètre nominal supérieur à 54 mm.</p> <p>Sensibilité à la corrosion par « érosion/cavitation » pour les tubes recuits ou surchauffés.</p>	Recommandé jusqu'au diamètre 54 mm.
Acier inoxydable 316L selon la norme AISI ou qualité équivalente	<p>Adapté aux eaux corrosives et agressives.</p> <p>Supporte la désinfection thermique ou chimique (peroxydes).</p>	Coût de fourniture élevé. La mise en œuvre doit être réalisée par un personnel qualifié.	<p>Utilisation recommandée pour les eaux agressives et corrosives.</p> <p>Prendre de préférence des tubes passivés sans soudure. A défaut, réaliser les raccordements tube à tube et tube à raccords par soudure autogène. Passivation de l'installation indispensable.</p>
Acier galvanisé	Désinfection thermique possible mais sans dépasser 60°C.	<p>Dégradation accélérée à une température supérieure à 60°C.</p> <p>Pertes de charges importantes si corrosion ou entartrage.</p> <p>Incompatible avec la présence de cuivre en amont ou dans la boucle ainsi qu'avec tout traitement libérant des ions cuivre dans l'eau.</p> <p>Désinfection chimique au chlore peu efficace dans les canalisations corrodées même après détartrage ;</p> <p>Risque de corrosion accru après détartrage et désoxydation.</p> <p>Les produits de corrosion favorisent le développement bactérien.</p>	<p>Fortement déconseillé pour l'eau chaude sanitaire et notamment lorsqu'elle est traitée au chlore.</p> <p>Présence d'importantes quantités de tubes en acier galvanisé de mauvaise qualité actuellement sur le marché.</p> <p>Nécessité de traiter contre la corrosion certaines eaux (cf. domaine d'application de ce matériau, DTU 60-1 additif n°4 chapitre 3).</p>

.../...

Matériau	Avantages	Inconvénients	Recommandations
Polybutylène et polypropylène	Adaptés aux eaux corrosives. Supportent la désinfection thermique ou chimique (chlore ou peroxydes).	Matériaux pouvant être favorable à la prolifération du bio-film. Coût élevé	Adapté aux tronçons dont le diamètre est supérieur à 50/60. Montage par brides
PE R Polyéthylène réticulé	Adapté aux eaux corrosives. Supporte la désinfection thermique et chimique (chlore ou peroxydes).	Matériau favorable à la prolifération du bio-film.	Adapté pour les tronçons dont le diamètre est supérieur à 50/60. Montage par brides.
PVC C Polychlorure-vinyle surchloré	Adapté aux eaux corrosives. Supporte la désinfection thermique ou chimique (chlore ou peroxydes).	Matériau pouvant être favorable à la prolifération du bio-film. Coût supérieur au PVC. Peut relarguer du chloroforme par action du chlore sur les méthylcétones contenues dans le solvant des assemblages par collage et également du tétrahydrofurane.	Adapté pour les tronçons dont le diamètre est supérieur à 50/60. Montage par brides. Surveiller la teneur en tétrahydrofurane et chloroforme de l'eau transportée par ce genre de matériau.
PVDF Polyvinylidène fluoré	Adapté aux eaux corrosives. Supporte la désinfection thermique ou chimique (chlore ou peroxydes).	Coût supérieur à l'inox	Produit peu intéressant eu égard aux coûts
Acier Inoxydable 304L	Non adapté si les chlorures sont \geq à 50 mg/l ou s'il y a un traitement au chlore.		
PE Polyéthylène	Matériau incompatible avec l'eau chaude		
Polyéthylène basse et haute densité	Matériau incompatible avec l'eau chaude		
PVC Polychlorure-vinyle	Matériau incompatible avec l'eau chaude		
Acier noir	Interdit pour les usages alimentaires et sanitaires (voir annexe I de l'arrêté du 29 mai 1997).		
Plomb	Interdit à la mise en œuvre depuis le 5 avril 1995 (décret n°95-363).		

.../...

**Annexe 6 : Caractéristiques des installations de distribution d'eau chaude
sanitaire et règles de maintenance. (extrait de la circulaire DGS n° 2002/243
du 22/04/2002)**

Tableau n°1 : Caractéristiques des installations de distribution d'eau chaude sanitaire

Dispositif technique concerné	Conception/ Ajout /suppression d'équipement	Entretien / Fréquence	Actions spécifiques relatives à la température de l'eau
<p>Système de production d'eau chaude sanitaire</p> <p>Pour les installations neuves, la production instantanée d'eau chaude sanitaire est la plus appropriée.</p>			
<p><i>Mode de production d'eau chaude sanitaire à partir d'un échangeur à plaques</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Il est préférable, pour les nouvelles installations, de ne pas installer de ballons de stockage de l'eau chaude produite. Dans ce cas, l'installation devra être dimensionnée afin d'assurer le débit maximum requis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle annuel du disconnecteur sur l'alimentation en eau du réseau primaire. - Vérification périodique de l'étanchéité des joints de l'échangeur. - Lutte contre le tartre et la corrosion. La lutte contre l'entartrage nécessitera, dans bien des cas, le recours à des adoucisseurs qui, mal entretenus, peuvent favoriser la prolifération bactérienne. Les conditions d'emploi des résines échangeuses d'ions sont précisées dans les circulaires DGS/PGE/1.D n°1136 du 23 juillet 1985 et n°862 du 27 mai 1987. 	<ul style="list-style-type: none"> - Réglage de l'échangeur à plaques de manière à délivrer en permanence une eau à une température supérieure à 50°C en tout point du réseau de distribution. - Il est nécessaire de connaître la qualité de l'eau afin de prendre en compte les risques liés à l'entartrage ou à la corrosion du dispositif de production d'eau chaude sanitaire.
<p><i>Mode de production d'eau chaude sanitaire à partir d'un ballon d'eau chaude (électrique, gaz ou autre)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ajouter, en cas d'absence d'une vanne, une vanne de purge ¼ de tour au point bas du ballon. - Mettre en place sur l'évacuation des eaux de vidange une rupture de charge par surverse avant le raccordement au réseau d'eaux usées. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nettoyage, détartrage, et désinfection au moins une fois par an. (la conception du ballon doit prévoir ces opérations : présence de trou d'homme d'au moins 50 cm de diamètre pour les ballons supérieurs à 1000 litres) - Ouverture complète de la vanne de vidange toutes les semaines. 	<ul style="list-style-type: none"> - La température de l'eau à la sortie du ballon doit être en permanence supérieure à 55°C. - Élévation quotidienne de la température du ballon au-delà de 60°C.
<p><i>Réservoir de stockage d'eau chaude (peut être préchauffée à partir d'un système de récupération d'énergie)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Le concept de récupération d'énergie doit être réétudié pour prendre en compte le risque lié aux légionelles. - Préférer les dispositifs par échanges thermiques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Entretien périodique : nettoyage, détartrage, et désinfection au moins une fois par an 	<ul style="list-style-type: none"> - Suppression de tous les réservoirs de stockage d'eau préchauffés ou non à une température inférieure à 55°C. Ils favorisent le développement bactérien.

.../...

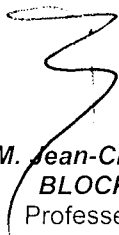
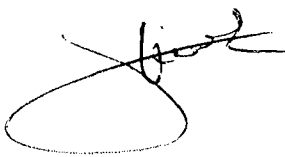


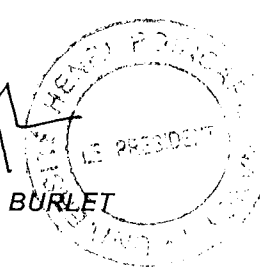
Dispositif technique concerné	Conception/ Ajout /suppression d'équipement	Entretien / Fréquence	Température de l'eau
<p>Réseau de distribution d'eau chaude sanitaire</p> <p>Pour les installations neuves ou faisant l'objet d'une restructuration, un retour de boucle pour l'eau chaude sanitaire doit être prévu. Le mitigeage de l'eau doit être réalisé le plus près possible du point d'usage.</p>			
<p><i>Le réseau de distribution d'eau chaude sanitaire</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Repérer et identifier les réseaux par un plan de récolement. Les actualiser à chaque modification du réseau. - Remplacer les canalisations en mauvais état. - Les opérations de rénovation devront avoir pour but la simplification du réseau et la réduction du maillage (boucles courtes). - Identifier et supprimer tous les bras morts. - Assurer une bonne circulation de l'eau. - Calorifuger séparément le réseau d'eau chaude sanitaire et le réseau d'eau froide. - Mettre en place un système de suivi de la température pour contrôler l'évolution de la température de l'eau en différents points de l'établissement. - Le diamètre des canalisations doit prendre en considération les besoins d'écoulement permettant d'assurer une température suffisante en tout point du réseau. 	<ul style="list-style-type: none"> - Suivi de l'évolution de la corrosion ou de l'entartrage des canalisations d'eau chaude (fréquence annuelle). Il est recommandé de mettre en place des manchettes démontables de contrôle de même nature que le réseau. - Analyse et interprétation périodique des courbes de température afin d'appréhender et de corriger plus rapidement les dysfonctionnements éventuels du réseau d'eau chaude sanitaire. Comparaison des résultats des données acquises par rapport aux valeurs seuils hautes et basses préalablement définies. - Tenir à jour et archiver l'information. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pour prévenir le risque de prolifération des légionelles il est souhaitable de maintenir l'eau chaude sanitaire à une température supérieure à 50°C en permanence en tous points du réseau. - Le réseau d'eau mitigée ne doit plus distribuer de l'eau à une température inférieure à 50°C.
<p><i>Si le réseau est bouclé :</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Il est fortement recommandé de prévoir dès la conception un retour de boucle pour l'eau chaude sanitaire. - La distance entre les points de puisage et le réseau bouclé doit être réduite au maximum. - Attention : le redimensionnement des pompes de recirculation peut se traduire, selon l'état des réseaux, par un décrochage de biofilm et d'éléments de corrosion. 	<ul style="list-style-type: none"> - Vérification périodique du débit des pompes de recirculation. 	<ul style="list-style-type: none"> - La température en retour de boucle doit être en permanence supérieure à 50°C. - L'interprétation périodique des courbes de température permet d'ajuster manuellement ou automatiquement le débit des pompes de recirculation.
<p><i>Si le réseau n'est pas bouclé :</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Étudier la faisabilité de la mise en œuvre d'un bouclage de l'eau chaude sanitaire. - En l'attente de la réalisation de ces travaux, il convient de prendre des mesures provisoires pour assurer le maintien de la température de l'eau par un cordon chauffant électrique placé autour de la canalisation d'eau chaude. Il est indispensable d'être très vigilant sur la qualité et les performances du cordon chauffant électrique, en cas de réseau non bouclé 	<ul style="list-style-type: none"> - Ouverture régulière des robinets de puisage d'eau chaude recommandée pour compenser la chute de température liée à l'absence de bouclage. 	

.../...

Dispositif technique concerné	Conception/ Ajout /suppression d'équipement	Entretien / Fréquence	Température de l'eau
Les points d'usage de l'eau			
<i>Points d'usage de l'eau</i>	<p>Il est préférable de supprimer les points d'eau très peu ou jamais utilisés.</p> <p>Le mitigeage de l'eau doit se faire au plus près possible du point d'usage.</p> <p>Il est recommandé d'installer des flexibles de douche à la place des pommeaux fixes afin de limiter les aérosols.</p> <p>Il est conseillé de remplacer les mousseurs et de les remplacer par des brise-jet, moins sujets à l'entartrage.</p> <p>Pour prévenir le risque de brûlures tous les points d'usage, en particulier les douches doivent être équipées de mélangeurs avec limiteur de température ou de mitigeurs thermostatiques.</p> <p>Pour les mitigeurs, prévoir des clapets anti-retour au plus près du point d'usage.</p>	<p>Contrôle annuel du bon fonctionnement des vannes, clapets, mitigeurs...</p> <p>Entretien des appareils de robinetterie (têtes de robinets, flexibles et pommeaux de douches) : détartrage, désinfection, etc.</p> <p>Remplacement des accessoires de robinetterie usagés ou en mauvais état (y compris tous les joints) .</p> <p>Si l'établissement est équipé de mitigeur, des procédures de nettoyage doivent être mises en œuvre.</p> <p>Purges régulières des points d'eau, après leur nettoyage et désinfection, des chambres inoccupées (par exemple, tous les jours pendant 5 minutes pour une chambre située entre 2 chambres occupées) et tout particulièrement avant l'arrivée d'un nouvel occupant.</p> <p>Purges particulières des canalisations situées au dernier étage des bâtiments, dans le cas où elles ne bénéficient pas de bouclage.</p> <p>Entretien des mitigeurs : démontage et détartrage de la chambre de mélange et remplacement de la cartouche de réglage.</p>	<p>La température de l'eau délivrée au point de puisage doit être inférieure à 50°C pour éviter le risque de brûlure.</p> <p>Il est recommandé de préciser, avec un pictogramme à proximité du point d'usage de l'eau, la température réelle de l'eau chaude.</p> <p>Avant la prise de douches, il est recommandé de faire couler au sol l'eau jusqu'à stabilisation de la température (15 secondes minimum).</p>
<i>Equipements spécifiques</i>	Microfiltration (utilisation d'un filtre terminal à 0,2µm) (cf. fiche 7)	<p>Selon les recommandations du fabricant et la qualité de l'eau :</p> <ul style="list-style-type: none"> - pour les filtres stérilisables et réutilisables un certain nombre de fois : entretien des filtres - pour les filtres à usage unique : renouvellement (souvent au bout de quelques jours). 	



DEMANDE D'IMPRIMATUR

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>Présenté par Sabine GAMERRE</p> <p><u>Sujet :</u> LES LEGIONELLOSES NOSOCOMIALES</p> <p><u>Jury :</u> Président : M. Jean-Claude BLOCK, Professeur Juges : M. Loic SIMON, Pharmacien M. Christian RABAUD, Professeur, Praticien Hospitalier</p>	<p>Vu, Nancy, le 4/12/02</p> <p>Le Président du jury Le Directeur de Thèse</p> <p> M. Jean-Claude BLOCK, Professeur</p> <p> M. Loic SIMON, Pharmacien</p>
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 9/12/02</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1,</p> <p> Chantal FINANCE</p>	<p>n° 1536 Vu, Nancy, le 18 décembre 2002</p> <p>Le Président de l'Université Henri Poincaré-Nancy 1</p> <p> Claude BURLET</p> <p></p>

N° d'identification : PH Nancy 2003 n°1

TITRE :

LES LEGIONELLOSES NOSOCOMIALES

Thèse soutenue le 8 Janvier 2003

Par Sabine GAMERRE

RESUME :

La légionellose, maladie découverte en 1976 aux Etats-Unis, est due à *Legionella*. Cette bactérie a été très étudiée depuis 25 ans, ainsi que la pathologie dont elle est responsable. Ainsi, le réservoir uniquement hydrique de *Legionella* caractérise un mode de contamination par l'eau lors de bains ou de douches ou par la vapeur d'eau contenue dans le panache d'une tour aérorefrigérante, d'un climatiseur ou d'un humidificateur médical. Les symptômes cliniques de la légionellose, peu spécifiques, surtout en médecine communautaire, rendent le diagnostic de la maladie difficile. Ainsi, de nombreux cas échappent aux statistiques de la déclaration obligatoire et les caractéristiques épidémiologiques de la légionellose sont donc en évolution permanente. La surveillance épidémiologique de la maladie est donc couplée avec la surveillance et la prévention de la contamination microbiologique par *Legionella* des installations à risques, en particulier dans les établissements de santé. La prévention des légionelloses nosocomiales est basée sur le contrôle microbiologique de l'eau et par des recommandations concernant la conception et l'entretien des installations à risque. Enfin, en cas d'épidémie de légionellose, des investigations épidémiologiques et environnementales, ainsi que des traitements curatifs sont nécessaires.

MOTS CLES :

Legionellose, Eau, Hôpital, Infection nosocomiale

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M ^r Loïc SINON	CHU Brabois Vandœuvre-les-Nancy	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input checked="" type="checkbox"/> 2

Thèmes : 1- Sciences fondamentales 2- Hygiène / Environnement
3- Médicament 4- Alimentation / Nutrition
5- Biologie 6- Pratique professionnelle