



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

■ M. BAUME, M. REYROLLE, S. JARRAUD

Centre National de Référence des Légionelles—Centre de Biologie et Pathologie Est, Groupe Hospitalier Est

Introduction

L'avis de l'ANSES et le rapport d'expertise collective d'avril 2011 (suite à la saisine "2009-SA-330") définit les caractéristiques détaillées, la pertinence et l'évaluation des méthodes de détection et de dénombrement des *Legionella* dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes. La surveillance environnementale des légionelles est encadrée par la réglementation qui impose l'utilisation de la méthode par culture décrite dans la norme NF T90-431. Il existe d'autres méthodes qui sont évaluées dans ce rapport et les points essentiels et synthétiques de ce document sont l'objet de cet article.

1) Les méthodes évaluées

► Les paramètres de l'évaluation

Les méthodes décrites dans le rapport ont été évaluées selon la norme XP T90-210 pour l'évaluation des performances.

La première étape de l'évaluation est l'examen des performances techniques : sélectivité, spécificité, sensibilité, répétabilité intra-laboratoire, reproductibilité inter-laboratoires, justesse, fidélité et rendement. D'autres critères peuvent ensuite être pris en compte pour évaluer la pertinence d'une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau pour le contrôle sanitaire et la surveillance des réseaux d'eau chaude sanitaire (ECS), des tours aéroréfrigérantes (TAR) et des décontaminations. Il s'agit de critères relatifs aux cibles (détection de l'ensemble des *Legionella spp*, des *Legionella* intra amibiennes ou intra vésiculaires, quantification des *L. pneumophila*), de critères relatifs à l'état physiologique des *Legionella* détectées (non détection des *Legionella* mortes, détection de l'ensemble des *Legionella* viables et potentiellement pathogènes), de critères relatifs au contexte pratique de mise en œuvre (rapidité des résultats, faisabilité, équipements nécessaires) et de critères relatifs à l'interprétation des résultats (interprétation technique simple, interprétation pour le risque sanitaire disponible).

Enfin chaque méthode a fait l'objet d'une évaluation selon les données bibliographiques disponibles.

► Les méthodes normatives

- La culture

Cette méthode de référence est décrite par la norme actuelle

NF T90-431 de 2003 qui est en cours de réactualisation afin d'être conforme au référentiel Cofrac pour l'évaluation des performances.

La technique, rodée et robuste comme le montrent les essais inter-laboratoires, permet de gérer les dépassements de seuil dès 3 jours et de disposer de souches pour les enquêtes épidémiologiques afin d'identifier les sources de contaminations. Mais elle a quand même des limites ; le rendement varie de 10 à 50% en fonction de l'eau analysée, des traitements réalisés sur l'échantillon (acide et thermique) et de la présence de flore interférente. Le temps nécessaire à l'analyse est long : 10 jours pour un résultat définitif. De plus cette méthode ne permet pas de détecter les cellules de *Legionella* qui ont perdu leur caractère cultivable (VBNC : *viable but non cultivable*), même si elles restent viables, et donc potentiellement pathogènes. Il existe également des incertitudes quant à la capacité à dénombrer les *Legionella* contenues dans des protozoaires. Le taux de détection des *Legionella* serait de 70% pour l'analyse d'une eau de réseau hospitalier.

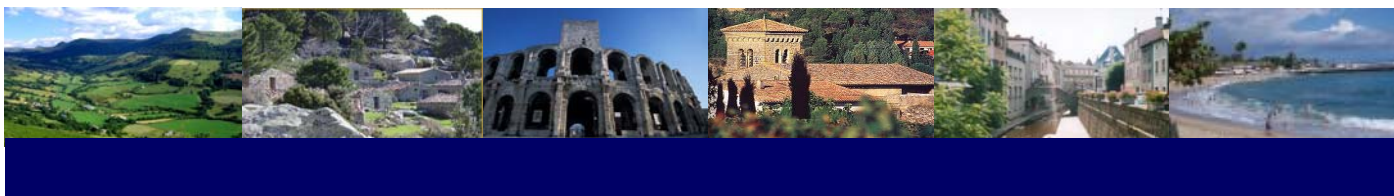
- La PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La norme actuelle NF T90-471 de 2010 laisse le choix des amorces dans la mesure où elles sont spécifiques de *Legionella* et *L. pneumophila* (des fractions des gènes *mip* et 16S sont couramment utilisées).

Le raccordement métrologique à l'ADN étalon de référence et l'étalonnage à chaque changement de lot sont préconisés pour la justesse de la quantification. L'évaluation des performances est exigée dans la norme.

Les limites de détection et de quantification augmentent proportionnellement avec la réduction du volume de l'échantillon filtré et diffèrent selon le système analytique utilisé. La qPCR est sélective à 100% vis-à-vis de 15 sérogroupes de *L. pneumophila* et l'inclusivité est testée sur l'ensemble des espèces reconnues pathogènes pour l'homme. Les résultats sont obtenus en 24 à 48h. Les bactéries dénombrées sont celles contenant de l'ADN amplifiable, qu'elles soient intactes ou endommagées. Cette méthode ne permet pas de distinguer les cellules viables des cellules non viables mais détecte les VBNC et les bactéries contenues dans des protozoaires ou des vésicules. Pour l'analyse d'une eau de réseau hospitalier, le ratio de détection de *Legionella* serait de l'ordre de 99%.

Les évolutions possibles de cette méthode sont basées sur



le développement de technique vPCR qui combine la qPCR et l'utilisation d'un agent intercalant, le monoazide d'éthidium (EMA) ou le monoazide de propidium (PMA), qui pénètre sélectivement dans les cellules présentant des dommages membranaires, empêchant l'amplification de l'ADN et permettant ainsi la détection uniquement des bactéries qui sont viables.

► Les autres méthodes

- L'immuno-détection

L'immuno-détection regroupe les méthodes permettant de mettre en évidence une ou plusieurs protéines ou épitopes en utilisant des anticorps spécifiques des *Legionella* portant un fluorochrome (immunofluorescence directe ou indirecte). Plusieurs anticorps anti-*L.pneumophila* ou anti-*Legionella* spp. existent : polyclonaux ou monoclonaux, commercialisés ou "maison". Ces méthodes peuvent être mises en œuvre grâce à l'utilisation de microscopes à fluorescence ou de cytomètres en flux ou en phase solide. Il n'y a pas de distinction entre les cellules viables et non viables.

Des micro-biocapteurs pour l'immuno-détection en temps réel sont en cours de développement et d'évaluation et des kits de terrains sont commercialisés pour la détection semi quantitative de *L. pneumophila*¹.

- La fluorescence In Situ Hybridation (FISH)

La méthode FISH est une technique de biologie moléculaire utilisant une sonde nucléique spécifique de la cible, couplée à un fluorochrome, qui semble permettre de détecter et quantifier simultanément des *Legionella* spp et des *L. pneumophila*. Cette méthode détecte également les bactéries mortes intègres. La méthode nécessite un microscope à épifluorescence voire un scanner automatique.

Dans le cas d'une application non automatisée, cette technique nécessite un important temps opérateur. Une publication associe cette technique à la culture pour distinguer les *L. pneumophila* des *L. spp.*

- Le double marquage immunologique (IDS)

Cette méthode combine un marqueur de viabilité pour compter les cellules vivantes et l'immunofluorescence directe pour compter les *Legionella* sélectivement marquées par un autre fluorochrome. La proportion des cellules viables et non viables est déterminée visuellement par un cytomètre en phase solide ou en phase liquide ou via un microscope à fluorescence.

- L'évolution possible d'autres méthodes

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight), permet l'identification des micro-organismes en analysant les protéines totales ou une fraction amplifiée de l'ADN. L'identification de *Legionella* à partir d'un échantillon complexe est encore à l'étude.

La séparation immuno-magnétique (IMS) repose sur la cap-

ture sélective des bactéries par des anticorps fixés sur des billes magnétiques, à partir d'un échantillon liquide plus ou moins complexe. Couplée à une méthode de détection elle permettrait d'augmenter l'efficacité de celle-ci.

► Analyses susceptibles d'apporter une information décisionnelle complémentaire

D'autres méthodes existent qui ne sont pas des méthodes de dénombrement de *Legionella* dans l'eau cependant elles sont susceptibles d'apporter des informations complémentaires qui peuvent être utiles pour la gestion des installations d'ECS et de TAR.

La recherche de la flore aérobie à 22 et 37°C et des *Pseudomonas* est un indicateur sanitaire qui permet de suivre l'évolution des réseaux en parallèle aux analyses *Legionella*. L'ATP-métrie est également utilisée, c'est un indicateur de l'activité métabolique des cellules vivantes, il permet de détecter la présence de biomasse dans l'échantillon.

Les recherches de *Legionella* dans le biofilm peuvent permettre de confirmer leur présence latente dans une installation, alors que les analyses d'eau présentent des résultats négatifs. L'analyse nécessite la récupération du biofilm par exemple par écouvillonnage direct sur une surface particulière (bains à remous, appareils d'oxygénothérapie,...) puis la détection des *Legionella* par les méthodes précédemment présentées. La recherche des amibes peut également apporter une information supplémentaire, puisqu'elles sont un des principales hôtes de *Legionella* dans l'environnement. Mais c'est une technique relativement lourde à mettre en œuvre et coûteuse.

Enfin il est possible de détecter des *Legionella* viables dans des aérosols. Les méthodes de détection et de quantification des microorganismes dans les aérosols sont calquées sur celles utilisées dans l'eau (culture, amplification génique, méthodes immunologiques hybridation, etc.) mais elles sont très fortement impactées par le mode de prélèvement des échantillons. De plus, l'évaluation de la dangerosité des aérosols contenant des *Legionella* est délicate car elle varie selon les personnes exposées, la taille des gouttelettes et la complexité de l'échantillon.

► Comparaison de la culture et de la qPCR

Les unités dans lesquelles les résultats de dénombrement de *Legionella* sont exprimés sont liées au type de méthode mise en œuvre. Ainsi, les résultats peuvent être exprimés en UG/L (Unités Génomiques par Litre) pour la qPCR ou en UFC/L (Unité Formant Colonie par Litre) pour la culture, avec pour conséquence des difficultés de comparaison.

La concentration bactérienne d'un même échantillon évaluée par qPCR est le plus souvent supérieure à celle évaluée par culture (en UFC/L).

Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons : l'échantillon peut contenir beaucoup de VBNC, une part importante des *Legionella* de l'échantillon peut être composée de cellules



mortes, les *Legionella* détectées sur un milieu de culture peuvent être inhibées par la présence d'autres microorganismes ou par des prétraitements (acide ou thermique) appliqués à l'échantillon avant l'ensemencement.

Les limites de détection et de quantification de la culture et de la PCR sont différentes également. Pour la culture la limite de détection théorique est de 50 UFC/L et sa limite de quantification est de 250 UFC/L, sans tenir compte du rendement. Pour la qPCR ces limites dépendent des systèmes utilisés mais sont généralement de l'ordre de 100 UG/L et 1000 UG/L respectivement.

Concernant les résultats d'analyse des eaux chaudes sanitaires, la corrélation entre culture et PCR a été démontrée. Pour l'eau des tours aéroréfrigérantes, il ne semble pas y avoir de corrélation ou très peu. Dans tous les cas, les corrélations observées sont meilleures dans le cas de dénombrement de *L. pneumophila* comparé à celui de *Legionella* spp.

2) Seuils de gestion et mesures préconisées

Selon le rapport de l'ANSES seules les recherches de *Legionella* par culture (selon la norme NF T90-431) et par qPCR (selon la norme NF T90-471) sont des méthodes pertinentes pour une utilisation en routine car elles sont précisément décrites et validées par un grand nombre de laboratoire.

Dans le cadre de la surveillance de routine, il est préconisé de laisser la possibilité d'utiliser la culture ou qPCR. Si des cas groupés ou un cas nosocomial de légionellose sont avérés, il est préconisé de privilégier la qPCR pour l'obtention d'un résultat rapide, suivie d'une mise en culture des points positifs pour une comparaison des souches environnementales et cliniques.

D'un point de vue sanitaire, concernant les points d'usage à risque utilisés par des patients à haut risque, il est recommandé de procéder en plus à des analyses de quantification des *Legionella* spp dont les résultats doivent être inférieurs à la limite de détection quelque soit la méthode utilisée : culture ou qPCR.

D'un point de vue technique, le suivi de *Legionella* spp. peut également présenter un intérêt pour les gestionnaires d'installation, notamment pour détecter des dysfonctionnements ou limiter les dérives. Il peut être considéré en qPCR qu'une augmentation relative significative (2 log ou plus) de la concentration d'ADN de *Legionella* constitue un indicateur de dysfonctionnement.

Conclusion

L'ANSES ayant été saisie par les pouvoirs publics pour donner un avis sur les méthodes, il est autorisé de penser que le législateur tiendra compte de cet avis pour introduire par exemple la méthode qPCR avec les valeurs cibles proposées dans des textes pour améliorer la gestion du risque

Tableau 1. Synthèse des valeurs cibles en *L. pneumophila* la proposées pour la culture et la qPCR

Les seuils de culture sont inchangés par rapport aux préconisations actuelles (circulaire de 2010). Les seuils de qPCR en *L.pneumophila* ont été définis de manière à ce que, sur une même série de prélèvements, le taux de résultats supérieurs à ces valeurs cibles obtenu avec la culture soit équivalent à celui obtenu avec la qPCR.

	Culture	qPCR
établissements recevant du public :		
eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage	10 ³ UFC/L	5.10 ³ UG/L
établissements de santé :		
eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points d'usage utilisés par des patients à haut risque	< Limite de détection	< Limite de détection
TAR : eau d'appoint	< Limite de quantification	< Limite de quantification
TAR : eau de l'installation		
valeur cible d'action	10 ³ UFC/L	5.10 ³ UG/L
valeur cible d'arrêt	10 ⁵ UFC/L	5.10 ⁵ UG/L

pour les établissements de santé. ■

Références

. Avis et rapport du 07 avril 2011 - Saisine "2009-SA-0330" - Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau : Caractéristiques détaillées et pertinence de leur mise en œuvre dans les eaux chaudes sanitaires et les tours aéroréfrigérantes.

<http://www.anses.fr/Documents/EAUX2009sa0330Ra.pdf>

. Norme NF T90-210 Mai 2009 "Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire"

. Norme NF T90-431 Septembre 2003 "Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation"

. Norme NF T90-471 Avril 2010 "Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila*