



Ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille

Direction générale de la Santé

Sous-Direction de la gestion des risques des milieux

Bureau des eaux

DGS/SD7A N°

Personnes chargées du dossier :

Philippe HARMANT / Cécile FERRAGU

tél. : 01 40 56 74 43 / 62 20

Le Directeur général de la Santé

à

Madame et Messieurs les Préfets de Région
Directions Régionales des Affaires Sanitaires
et Sociales
(Pour attribution)

Mesdames et Messieurs les Préfets
Directions Départementales des Affaires Sanitaires
et Sociales
(Pour attribution)

NOTE D'INFORMATION DGS/SD7A n°2005/315 du 03 mars 2005

relative aux évolutions en matière de méthodes d'analyses de légionelles dans des échantillons d'eau et à l'interprétation de leurs résultats.

L'objet de la présente note est de présenter les évolutions récentes en matière de méthodes d'analyse de légionelles dans des prélèvements d'eau environnementaux et de préciser l'interprétation qui doit être faite de leurs résultats.

Vous trouverez, en annexe, une description des techniques de recherche et de dénombrement de légionelles actuellement employées par les laboratoires :

- la première, concerne la technique de recherche et de dénombrement de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* par culture sur milieux gélosés. Elle fait l'objet de la norme française NF T90-431, publiée en septembre 2003 (cf. annexe I.1).
- la seconde (cf. annexe II) est une méthode de recherche et de quantification de l'ADN microbien par amplification en chaîne par polymérase (plus connue sous l'acronyme PCR, polymerase chain reaction).

En l'absence à ce jour, de validation de la méthode PCR par les instances d'expertise, je vous demande de mettre systématiquement en œuvre la méthode normalisée NF T90-431 au titre du contrôle sanitaire ou lors d'investigation épidémiologique de cas de légionellose. En revanche, il ne peut être fait obstacle au recours à la méthode PCR par les exploitants d'installations de production ou de distribution d'eau, dans le cadre de la surveillance de la qualité de l'eau de leurs installations. Toutefois, les résultats obtenus par cette méthode ne pourront dans l'état actuel des connaissances être comparés à ceux fournis par la norme NF T90-431.

Dr Yves COQUIN
Chef de Service

ANNEXE : Techniques de recherches et de dénombrement de légionelles

I. Recherche et dénombrement de Legionella spp et de Legionella pneumophila par culture sur milieux gélosés

La méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation, fait l'objet de la norme NF T90-431 publiée en septembre 2003. Cette version de la norme remet à jour la précédente qui datait de novembre 1993.

Les différences notables entre les versions précitées ainsi que les modalités d'interprétation des résultats d'analyse, notamment par les directions départementales des affaires sanitaires et sociales, sont respectivement présentées aux paragraphes I.1. et I.2 ci-après.

I.1 – Principales évolutions de la norme NF T90-431

La version de 1993 de la norme était fondée sur une méthode préparative uniquement basée sur la filtration. La version de 2003 inclut en complément, une préparation d'échantillon par centrifugation (avec récupération des culots et remise en suspension desdits culots dans 5 ml d'eau, appelés le concentrat) pour permettre l'analyse d'eaux dites "sales", à savoir peu ou difficilement filtrables. A noter que le volume mis en analyse n'est dans ce dernier cas que de 500 ml contre 1000 ml pour la technique par filtration ; ceci double les seuils de détection et de quantification de la technique. La méthode préparative par filtration est réservée aux eaux dites « propres », à savoir les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux minérales naturelles par exemple.

Par ailleurs, afin de caractériser le fait que les colonies repiquées et confirmées sont de l'espèce *pneumophila*, la norme dans sa version de 2003 offre la possibilité d'utiliser un test d'agglutination au latex en tant que méthode alternative à un test en immunofluorescence.

Dans sa version de 2003, la norme n'apporte pas d'autres changements majeurs à la technique, en termes de milieux, de volumes « étalés » sur membranes, de durée d'incubation, de nombre de lectures à effectuer durant la période d'incubation.

La principale modification de la nouvelle version porte sur l'expression des résultats. Le seuil de détection reste le même. Il correspond à 1 colonie sur une boîte ensemencée après concentration, soit à 50 Unités Formant Colonie par litre (UFC/l), ou 100 UFC/l si on a opté pour la centrifugation d'un volume de 500 mL. Pour une détection d'un nombre de colonies compris entre 1 et 5 (non inclus) par boîte, la présence de *Legionella pneumophila* ou de *Legionella* est prouvée sans qu'une quantification de la concentration en légionelles ne soit possible avec suffisamment de précision. C'est pourquoi, la version 2003 de la norme introduit un seuil de quantification de 250 UFC/l (ou de 500 UFC/l si on a opté pour l'ultracentrifugation d'un volume de 500 ml).

Les résultats sont dorénavant exprimés ainsi :

- Absence de colonie confirmée en *Legionella* et *L. pneumophila* (ou *L. pneumophila* seules) : le bulletin d'analyse portera la mention « <250 UFC/l » (ou « <500 UFC/l » si on a opté pour une centrifugation d'un volume de 500 ml) et « *Legionella* et *L. pneumophila* non détectées » (respectivement « *Legionella pneumophila* non détectées »)
- De 1 à 5 (non inclus) colonies confirmées en *Legionella* (ou *L. pneumophila*) sur les boîtes sur lesquelles l'échantillon avec ou sans concentration a été ensemencé : le bulletin d'analyse portera la mention « <250 UFC/l » (ou « <500 UFC/l » si on a opté pour une centrifugation d'un volume de 500 ml) et « Présence de *Legionella* non quantifiables » (respectivement « Présence de *L. pneumophila* non quantifiables »)
- 5 colonies ou plus sur une boîte : mention d'un résultat quantifié.

La présence de flore interférente sur une boîte ou sur la totalité des boîtes doit conduire le laboratoire à apposer sur le bulletin d'analyse des commentaires différents sur les bulletins d'analyse selon les dispositions de la norme précitée.

I.2 – Prise en compte des résultats d'analyse par les DDASS

1 - Cas des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques dans des établissements thermaux.

L'arrêté du 14 octobre 1937 modifié par l'arrêté du 19 juin 2000 requiert l'absence de *Legionella* et de *Legionella pneumophila* (dans 1 L) aux émergences et à tous les points d'usage de l'eau, absence signifiant une teneur inférieure au seuil de détection de la méthode normalisée en vigueur comme mentionné dans l'arrêté.

En conséquence :

- Si le bulletin d'analyse fait état d'un résultat quantifié ou porte la mention « Présence de *Legionella* et/ou *L. pneumophila* non quantifiables » ou la mention « Présence de *Legionella* et/ou *L. pneumophila* non quantifiables en raison de la présence d'une flore interférente », le résultat doit être considéré comme non conforme. Il convient de mettre en œuvre les mesures indiquées dans la circulaire DGS/SD7A/2001/575 du 29 novembre 2001, relative à l'enquête sur le bilan de la mise en œuvre de l'arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales.
- Si le bulletin d'analyse porte la mention « ininterprétable » ou « Présence de flore interférente empêchant la détection des *Legionella* et/ou *L. pneumophila* » (quel que soit le résultat exprimé < 2 500 UFC/l ou < 25 000 UFC/l, etc.), la conformité du résultat d'analyse ne peut être estimée et un prélèvement de contrôle doit être reprogrammé. Les modalités de gestion du risque devront être appréciées au cas par cas en fonction des éléments de contexte. Des recommandations vous seront fournies ultérieurement dans ce but par la Direction générale de santé après consultation des instances d'expertise compétentes.

2 - Cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points de puisage à risque utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé.

La fiche VII de la 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 recommande de délivrer aux points d'usage utilisés par les patients à haut risque (par référence à la définition donnée dans la même fiche) une eau présentant en permanence une concentration en *Legionella pneumophila* inférieure au seuil de détection de la méthode normalisée.

En conséquence :

- Si le bulletin d'analyse mentionne un résultat chiffré ou porte la mention « Présence de *Legionella pneumophila* non quantifiables » ou la mention « Présence de *Legionella pneumophila* non quantifiables en raison de la présence d'une flore interférente », les mesures curatives indiquées dans la circulaire du 22 avril 2002 doivent être mises en œuvre par l'établissement de santé.
- Si le bulletin d'analyse porte la mention « ininterprétable » ou « Présence d'une flore interférente empêchant la détection des *L. pneumophila* » (quel que soit le résultat exprimé < 25 000 UFC/l ou < 2 500 UFC/l, etc.), la conformité du résultat d'analyse ne peut être estimée et un prélèvement de contrôle doit être reprogrammé. Les modalités de gestion du risque devront être appréciées au cas par cas en fonction des éléments de contexte. Des recommandations vous seront fournies ultérieurement dans ce but par la Direction générale de santé après consultation des instances d'expertise compétentes.

3 - Cas des eaux destinées à la consommation humaine fournies au niveau de points de puisage à risque dans des établissements recevant du public, à l'exclusion de ceux utilisés par des patients à haut risque dans les établissements de santé.

Le guide « gestion du risque lié aux légionelles » du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (novembre 2001) fixe un objectif cible de 10^3 UFC/l en *Legionella pneumophila* dans les eaux chaudes sanitaires.

En conséquence :

- Si le bulletin d'analyse porte un résultat chiffré inférieur ou égal à 10^3 UFC/l en *Legionella pneumophila* ou indique le résultat « < 250 UFC/l » quelle que soit la mention complémentaire apportée, le prélèvement respecte l'objectif cible de qualité.
- Si le bulletin d'analyse porte la mention « ininterprétable » ou « Présence d'une flore interférente empêchant la détection des *L. pneumophila* ou « Présence de *Legionella pneumophila* non quantifiables en raison de la présence d'une flore interférente », la conformité du résultat d'analyse par rapport à l'objectif cible ne peut être estimée et un prélèvement de contrôle doit être reprogrammé.

II Détection et quantification de *Legionella* et *Legionella pneumophila* par Polymerase Chain Reaction (PCR)

La méthode PCR en temps réel est une technique basée sur l'amplification de l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien présent dans les échantillons d'eau couplée à une quantification du génome. Cette technique fait actuellement l'objet d'une expertise par le groupe de travail T90E de l'AFNOR.

Le mode opératoire de la technique de détection et de quantification se décompose en quatre étapes successives :

- Concentration des échantillons :
A partir d'un échantillon d'eau, les bactéries sont récoltées soit par filtration soit par centrifugation.
- Lyse des bactéries, extraction et purification des acides nucléiques :
L'extraction du matériel génétique de la bactérie est obtenue en lysant les micro-organismes soit par des procédés physiques, chimiques ou encore biologiques. La purification des acides nucléiques, qui peut se faire selon différents procédés, permet d'éliminer autant que possible les autres composants cellulaires, en particulier ceux pouvant inhiber la PCR.
- Détection et amplification de l'ADN par PCR :
La PCR permet de répliquer un très grand nombre de fois, de l'ordre du million de copies (amplicons) en quelques heures, une séquence ciblée de l'ADN de *Legionella*, spécifique de *Legionella spp* ou de *Legionella pneumophila*. Les étapes préalables de développement du test PCR passent par l'optimisation des paramètres d'amplification (nombre de cycle, température d'hybridation,...) et de la composition du mélange réactionnel (choix des amorces et des sondes associées...).
- Identification et quantification des amplicons :
La quantification fait appel à une sonde d'ADN marquée qui s'hybride aux séquences d'ADN cibles. L'intensité de la fluorescence issue du processus mise en œuvre dans cette technique étant proportionnelle au nombre de copies formées, il est possible, à l'aide d'une courbe étalon, de définir la quantité d'ADN présente dans l'échantillon de départ. Cependant, les étalons d'acides nucléiques certifiés ne sont pas disponibles actuellement, chaque laboratoire doit donc calibrer ses propres gammes d'étalonnages.

Un contrôle rigoureux de la qualité (spécificité des amorces et des sondes utilisées, contrôle de l'absence d'inhibiteurs à la PCR, fiabilité de la gamme étalon,...) et une évaluation préalable des performances de chacune de ces étapes (extraction, amplification et quantification) sont indispensables pour valider et interpréter les résultats obtenus.

L'unité de mesure de la PCR s'exprime en unité génome par litre (UG/L) et reflète la présence du génome bactérien dans l'échantillon d'eau, sans faire de distinction entre le génome d'une bactérie « viable » ou celui « non viable » dans l'échantillon. Il n'existe donc pas de corrélation directe entre les résultats exprimés en UG/L et ceux obtenus par la méthode par culture (exprimés en UFC/l) qui détecte et quantifie des bactéries ayant la capacité de se multiplier sur un milieu de culture.

En outre, les laboratoires proposant ce type d'analyse n'ont pas encore fait l'objet d'inter-calibration entre eux. Par conséquent, les analyses effectuées à ce jour par cette dernière méthode, ne permettent pas, d'une part de garantir la qualité et la fiabilité des résultats fournis et d'autre part, de comparer des résultats issus de laboratoires différents. De plus, les niveaux cibles de qualité des eaux dans les différents milieux n'ont pas été définis selon la technique PCR. C'est pourquoi, à ce jour, les résultats analytiques obtenus par PCR ne permettent pas de conclure sur la conformité aux arrêtés et circulaires susmentionnés.