

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Détermination de seuils de gestion pour la méthode q-PCR de dénombrement des *Legionella pneumophila* dans les installations de refroidissement

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Octobre 2017

Édition scientifique

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Analyse du rapport
des sociétés KOSAMTI et
CAPSIS concernant l'étude
de la détermination de seuils
de gestion pour la méthode
q-PCR de dénombrement
des *Legionella pneumophila*
dans les installations
de refroidissement couvertes
par la rubrique 2921 des ICPE

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Octobre 2017

Édition scientifique

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 24 octobre 2017

AVIS

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

relatif à l'analyse du rapport des sociétés KOSAMTI et CAPSIS concernant l'étude de la détermination de seuils de gestion pour la méthode q-PCR de dénombrement des *Legionella pneumophila* dans les installations de refroidissement couvertes par la rubrique 2921 des ICPE

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses s'est autosaisie le 16 février 2016 afin d'expertiser le rapport réalisé par les sociétés KOSAMTI et CAPSIS relatif à la détermination de seuils de gestion pour le paramètre *Legionella pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes (TAR) des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), par la méthode q-PCR *Legionella pneumophila* (quantitative polymerase chain reaction).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'Agence, dans son rapport relatif aux méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau (Anses, 2011), avait proposé, à titre expérimental, des valeurs cibles pour la surveillance de *L. pneumophila* dans les TAR par la méthode de PCR quantitative (q-PCR). L'Agence avait souligné l'importance de consolider ces valeurs par la réalisation d'une étude métrologique afin de comparer les résultats d'analyses obtenus avec la méthode par culture et ceux par q-PCR. L'Agence avait précisé dans ce rapport qu'en l'état des connaissances, et en l'absence de cette étude métrologique, les résultats obtenus à l'aide de ces deux méthodes n'étaient pas comparables.

Le Ministère en charge de l'écologie a commandité la réalisation d'une telle étude basée sur des données existantes, collectées auprès de différents acteurs (laboratoires, exploitants de TAR, ou données bibliographiques).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail « q-PCR légionelles ». Les travaux ont été présentés à plusieurs reprises au CES « Eaux » tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre juin 2016 et septembre 2017. Ils ont été adoptés par le CES « Eaux » réuni le 13 septembre 2017.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge de la santé (<https://dpi-declaration.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE DU CES « EAUX »

3.1. Rappel de la problématique de *Legionella* dans les tours aéroréfrigérantes

Les tours à voie humide ou installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air relèvent du code de l'environnement (ICPE rubrique 2921). La présence de bactéries du genre *Legionella* dans l'eau des circuits de ces TAR peut être source de danger pour la santé des riverains et des travailleurs employés dans ces installations. De fait, ces installations sont soumises à un régime de déclaration ou d'enregistrement en fonction de leur puissance. La réglementation applicable aux TAR ICPE est décrite par l'arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n°2921 de la nomenclature des ICPE. Cet arrêté précise notamment la fréquence des analyses pour la détection de *Legionella* et les actions à mener en cas de dépassement des seuils de gestion. Le seuil d'alerte est fixé à 10^3 unités formant colonies par litre (UFC/L) en *Legionella pneumophila* dans l'eau. Au-delà l'exploitant doit mettre en place l'ensemble des actions curatives nécessaires pour un retour rapide de cet indicateur sous le seuil d'alerte. La réglementation en vigueur impose un seuil d'arrêt de l'aérodispersion à 10^5 UFC/L en *Legionella pneumophila*. L'arrêté du 13 janvier 2017 portant homologation de la décision n° 2016-DC-0578 de l'Autorité de sûreté nucléaire (ASN) du 6 décembre 2016 relative à la prévention des risques résultant de la dispersion de micro-organismes pathogènes (*Legionella* et amibes) par les installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression décrit les prescriptions applicables spécifiquement aux TAR des centres nucléaires de production d'électricité (CNPE). Le seuil d'action pour ces installations a été fixé à 10^4 UFC/L et le seuil d'arrêt à 10^5 UFC/L en *Legionella pneumophila*.

3.2. Méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau des TAR

Les méthodes de dénombrement de *Legionella pneumophila* dans l'eau par culture et par q-PCR sont utilisables pour la surveillance des TAR. La méthode de dénombrement de *Legionella pneumophila* par culture est, à ce jour, la seule méthode de référence réglementairement admise pour leur surveillance.

3.2.1. Méthode par culture

En France, la norme AFNOR NF T90-431 décrit la méthode à suivre pour rechercher et dénombrer par culture *Legionella* spp et *Legionella pneumophila*. Le principe de la méthode par culture est d'ensemencer un échantillon d'eau sur un milieu de culture pour dénombrer les colonies qui se développent après une incubation à une température donnée. La sélectivité de cette méthode dépend principalement du milieu de culture utilisé et de la température d'incubation. Seules les bactéries cultivables (donc viables) sont dénombrées.

Le respect de la norme AFNOR NF T90-431 par le laboratoire qui effectue les analyses assure à l'exploitant une maîtrise de la méthode et une reproductibilité des résultats. Cependant, les

résultats dépendent notamment de la charge en matières en suspension (MES) des échantillons d'eau à traiter et de l'expertise du laboratoire.

La méthode par culture présente, par ailleurs, certaines limites : elle ne permet pas de détecter les bactéries viables non cultivables ni les bactéries internalisées dans des protozoaires ou vésicules externes de ces protozoaires (Dietersdorfer *et al.*, 2016). Par ailleurs, elle est fortement impactée par la présence de flore interférente.

La détection de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila*, peut également être réalisée en suivant la norme ISO 11731. Utilisable sur tous les types d'eaux, cette norme internationale a été déclinée en 2004 en France sous une partie plus restrictive, la norme NF EN ISO 11731-2, qui n'est applicable qu'aux eaux à faible teneur en bactéries, ce qui exclut son utilisation pour le suivi des TAR.

Ces deux normes ont été utilisées pour l'analyse et le dénombrement de *Legionella* dans le rapport expertisé par le CES « Eaux ».

3.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR)

La norme AFNOR NF T90-471 décrit la méthode de détection et de quantification des *Legionella* dans l'eau par q-PCR. La méthode par q-PCR est théoriquement applicable à tous les types d'eau. Elle consiste en l'analyse du signal de fluorescence émis qui sera proportionnel à la quantité d'ADN présent dans le tube de réaction, elle-même proportionnelle à la quantité de bactéries *Legionella*. L'apparition d'un signal mesurable dépend de la quantité d'ADN cible de *Legionella* présent initialement dans l'échantillon.

Toutefois, la variabilité entre les kits et/ou les méthodes internes, ainsi que la variabilité de l'étape d'extraction d'ADN, elle-même subordonnée à la charge en MES des échantillons d'eau à traiter ainsi qu'à l'expertise du laboratoire, sont susceptibles d'impacter la qualité des résultats et constituent les limites de cette méthode.

3.3. Analyse du rapport des sociétés KOSAMTI et CAPSIS

3.3.1. Données recueillies

Dans la suite de cet avis, le rapport expertisé par l'Agence sera nommé rapport KC.

Le rapport KC décrit une analyse comparée de données de terrain correspondant à des concentrations en *Legionella pneumophila* obtenues par la méthode de dénombrement par q-PCR et par la méthode de dénombrement par culture collectées auprès de gestionnaires de TAR utilisant ces deux méthodes conjointement pour la gestion des circuits des TAR. Le traitement des données recueillies a conduit les auteurs du rapport KC à proposer des seuils de gestion (seuil d'alerte et seuil d'action) pour la méthode q-PCR. Ces seuils ont ensuite été appliqués pour le suivi de différentes TAR alimentées par de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH) ou par de l'eau de rivière. Ils ont été considérés comme pertinents par les auteurs du rapport KC lorsque les actions correctives que leurs applications induisaient étaient identiques à celles découlant de l'application des seuils réglementaires fixés pour la méthode par culture.

Les résultats du dénombrement de *Legionella pneumophila* ont été collectés auprès :

- d'exploitants de sites industriels ou tertiaires. Les auteurs ont distingué dans leur rapport les installations alimentées par de l'EDCH de celles alimentées par de l'eau de rivière, et de celles dont « l'eau de refroidissement est directement en contact avec le process » ou non ;

- du laboratoire du Ministère de la santé du Québec. Les données étaient issues d'une étude menée en 2013 suite à des cas groupés de légionellose survenus au Québec en 2012. Tous les circuits de l'étude étaient alimentés par de l'EDCH de qualité stable ;
- de la société CLIMESPACE qui a réalisé en 2008 une étude sur un pilote dont l'objectif était d'étudier le transfert du biofilm d'un circuit de TAR vers l'eau et de comparer les résultats de différents indicateurs d'analyses selon différentes configurations : phase de colonisation, effet des chocs biocides dans la durée, effet du tensioactif selon les conditions de mise en œuvre, effet d'un arrêt hydraulique.

Au total 744 paires de données ont été collectées :

- 695 données ont été obtenues selon la norme NFT90-431 et 49 selon la norme NF EN ISO 11731 pour les résultats issus de la méthode par culture ;
- 132 données ont été obtenues avec le système d'extraction et d'analyse d'ADN Biorad, 586 avec le système d'extraction et d'analyse Pall Gensystem, 26 par une méthode interne développée par un laboratoire accrédité pour les résultats donnés par q-PCR.

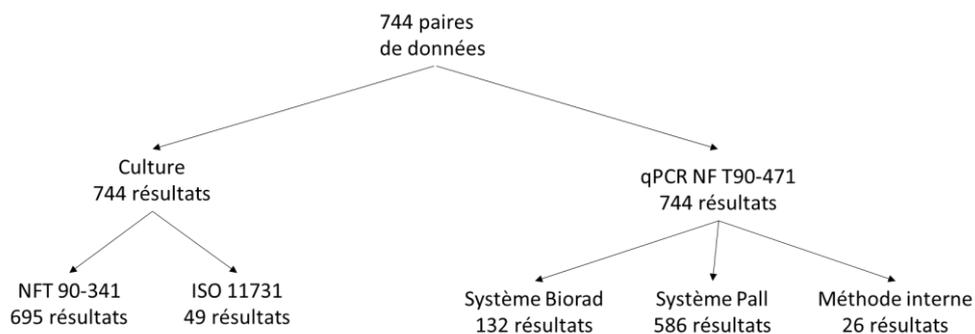


Figure 1 : Présentation des données selon les méthodes analytiques utilisées dans le rapport KC

Concernant le jeu de données présenté dans le rapport KC, le CES « Eaux » signale que : (i) le jeu de données est hétérogène et insuffisamment caractérisé ; (ii) les résultats obtenus en application de méthodes de dénombrement selon des normes différentes pour la culture ou avec des kits et méthodologies différents pour la q-PCR sont traités chacun comme un seul groupe de données ; (iii) une des méthodes utilisées n'est pas recommandée pour les eaux de TAR (ISO 11731) ; (iv) les biais relevés ne sont pas pris en compte de manière suffisante dans la présentation des données et dans les analyses qui s'ensuivent.

3.3.2. Traitement qualitatif des données

Le rapport KC présente un traitement qualitatif et un traitement quantitatif des données recueillies. Le traitement qualitatif vise à estimer les performances de la méthode q-PCR (tous kits ou méthodes internes utilisés) vis-à-vis de la culture tandis que le traitement quantitatif a permis aux auteurs de déterminer différents seuils de gestion susceptibles d'être utilisés avec la méthode par q-PCR dans la surveillance de la qualité d'eau des circuits des TAR. Pour chaque seuil déterminé, la concordance entre les deux méthodes avec les décisions de gestion a été évaluée. Les données issues du pilote ont été intégrées dans le jeu de données retenues pour l'étude qualitative uniquement.

Le CES « Eaux » considère que les données issues du pilote auraient dû être retirées de l'analyse faite dans le rapport KC car elles ont été obtenues dans des conditions spécifiques, très différentes des conditions de terrain.

L'analyse qualitative de la sensibilité et de la spécificité de la méthode q-PCR a été abordée en considérant la méthode de dénombrement par culture comme méthode de référence.

Le CES « Eaux » estime que ce choix aurait dû être étayé par une analyse critique de la méthode par culture.

Les résultats de l'analyse faite par les auteurs du rapport KC indiquent que *Legionella pneumophila* est détectée par les deux méthodes dans 37 % des cas et n'est pas détectée par les deux méthodes dans 40 % des cas (cf. tableau I). La méthode de dénombrement par q-PCR permet de détecter *Legionella pneumophila* quand la culture est négative dans 22 % des cas. Une valeur négative de la q-PCR est associée dans une grande majorité des cas (97 %) à une valeur de culture négative. Mais la réciproque n'est vraie que dans deux tiers des cas (65 %). Une valeur positive de q-PCR est en revanche difficilement prédictive d'une évolution similaire de l'indicateur par culture avec seulement 63 % de valeur prédictive positive.

Tableau I : Tableau croisé des principaux résultats obtenus par culture et q-PCR et paramètres de validité intrinsèque en référence à la méthode par culture, présentés dans le rapport KC

		Résultats par culture <i>L.p</i> (UFC/L)		Valeurs prédictives
		Cultures positives	Cultures négatives	
Résultats q-PCR <i>L.p</i> (UG/L)	q-PCR positive	37%	22%	VPP : 63%
	q-PCR négatives	1%	40%	VPN : 97%
		Sensibilité 97%	Spécificité 65%	

VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative

Le CES « Eaux » note que les deux méthodes n'ont pas bénéficié de la même analyse critique lors du traitement qualitatif des données. L'étude qualitative aboutit néanmoins aux mêmes conclusions que la littérature sur le sujet : la q-PCR possède une meilleure sensibilité que la méthode par culture et donne donc parfois des résultats positifs pour des échantillons négatifs en culture. Ceci s'explique par le mesurande de chaque méthode qui est différent, mais induit des difficultés d'interprétation des résultats par l'exploitant s'il cherche à mettre en parallèle les résultats obtenus par ces deux méthodes. En effet, celles-ci ne sont pas comparables ainsi que l'a souligné le rapport de l'Anses de 2011.

3.3.3. Traitement quantitatif des données

L'objectif du traitement quantitatif était de déterminer une concordance d'actions à préconiser, en fonction des valeurs cibles fixées pour la q-PCR et les seuils réglementaires pour la culture. Pour cette partie de l'étude, les données antérieures à 2011, date à laquelle la méthode normative a imposé un raccordement à un ADN étalon primaire, ont été écartées de l'analyse.

Le CES « Eaux » approuve le retrait de ces données du traitement quantitatif, mais signale que l'ADN étalon ne permet pas toutefois de standardiser l'étape d'extraction d'ADN précédant la q-PCR. Celle-ci reste source de variabilité importante pour des échantillons difficilement filtrables comme les eaux de TAR, en raison notamment de leur charge en matières en suspension (MES) élevée.

Sur la base d'un jeu de 499 paires de données normalisées, l'approche réalisée dans le rapport KC a consisté, dans un premier temps, à établir des courbes de distributions à partir des écarts

entre les valeurs logarithmiques des résultats obtenus par culture et par q-PCR pour chaque jeu de données ($\log_{q\text{-PCR}} - \log_{\text{culture}}$). La méthode employée est une déclinaison de celle exposée par Lee *et al.* (2011). Menée par 7 laboratoires provenant de 6 pays différents (Royaume-Uni, Allemagne (2), Espagne, France, Italie et Suisse), la méthode proposée par Lee *et al.* consistait à comparer les paires de données dont les résultats sont supérieurs à la limite de quantification pour les deux méthodes de dénombrement.

Compte tenu du faible nombre de telles données « doubles positives » à disposition des auteurs du rapport KC, et afin d'augmenter la taille de leur échantillon, les auteurs du rapport KC ont traité toutes les données dont les résultats étaient supérieurs ou égaux au seuil de quantification pour au moins une méthode de dénombrement.

Les courbes établies ont permis d'établir quatre seuils de gestion qui ont été ensuite appliqués aux suivis de plusieurs circuits de TAR :

- deux seuils estimés en considérant seulement les valeurs doubles positives ;
- deux seuils estimés en considérant toutes les valeurs simples et doubles positives.

Les 4 seuils retenus ainsi que les seuils proposés par l'Anses en 2011 ont été ensuite appliqués au jeu de données complet et aux données scindées en fonction de l'origine de l'eau d'appoint des sites concernés (EDCH ou eau de rivière). Les auteurs du rapport KC concluent que les valeurs cibles fixées pour la q-PCR (en unités génomes par litre : UG/L) à partir de l'analyse des résultats n'induisent pas une concordance d'actions de gestion des risques avec les seuils réglementaires pour la culture (en UFC/L).

Le CES « Eaux » considère que :

- les deux études diffèrent sur plusieurs points méthodologiques (intercalibration des laboratoires, méthodologie différente, etc.) et ne peuvent donc pas par conséquent permettre une analyse comparative de leurs résultats respectifs ;
- la méthodologie du rapport KC présente également une anomalie majeure dans la constitution de l'échantillon initial de l'analyse (conservation des simples positifs) ;
- l'utilisation d'un jeu de données hétérogènes pour fixer des seuils impacte négativement leur fiabilité ;
- les conclusions émises sur la base des résultats du traitement quantitatif à propos de la concordance ou non des méthodes, sont en contradiction avec celles obtenues par Lee *et al.* (2011) avec les mêmes valeurs de concordance (75 % de concordance) sans pour autant que cette prise de position soit argumentée.

3.3.4. Suivi des installations

Dans la dernière partie de l'étude, les auteurs du rapport KC ont utilisé les valeurs cibles déterminées précédemment pour simuler la gestion de plusieurs TAR : 10 TAR alimentées par de l'EDCH et 4 TAR alimentées par de l'eau de rivière.

L'observation des résultats de la surveillance des TAR alimentées par l'EDCH montre une grande variabilité dans la cohérence entre les actions induites par les valeurs cibles déterminées précédemment pour la q-PCR et celles induites par les seuils fixés réglementairement pour la culture. La même variabilité est observée lors du suivi des installations alimentées par de l'eau de rivière. Les auteurs soulignent la difficulté de piloter des actions curatives à partir des seuils q-PCR retenus.

Le CES « Eaux » signale que le suivi a été effectué sur un nombre réduit de TAR et que, par conséquent, les résultats issus de ce suivi sont à considérer avec prudence. Les résultats montrent une absence de concordance entre les méthodes sans qu'il soit possible de l'attribuer à la qualité intrinsèque de l'une d'entre elles. Les difficultés d'interprétation, en termes d'actions de gestion, sont directement liées à cette non-concordance.

4. CONCLUSIONS DU CES « EAUX »

L'étude KC ne correspond pas à une analyse métrologique rigoureuse telle que suggérée par l'Agence dans son rapport relatif aux méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, de 2011 car elle procède d'une agrégation *a posteriori* de données disparates et non d'une collecte de données issues d'un protocole précis fixé *ab initio* et maîtrisé, avec prise en compte des contrôles et précautions nécessaires.

L'approche analytique utilisée dans le rapport KC est celle d'un exploitant devant interpréter des données provenant des mesures de *L. pneumophila* par q-PCR. Elle consiste à vérifier si les décisions de gestion prises avec cette méthode sont comparables à celles prises en utilisant la méthode reconnue sur le plan réglementaire. Toutefois, la réponse à cette question dépend largement de l'homogénéité et de la fiabilité des données brutes sur lesquelles repose l'analyse. Elle implique également une prise en compte rigoureuse des défauts et qualités des deux méthodes et une maîtrise de leurs dérives respectives.

La conclusion du rapport KC sur l'impossibilité de proposer des seuils de gestion pour la méthode de dénombrement par q-PCR est en adéquation avec les informations sur les données à disposition des auteurs. Toutefois, le CES « Eaux » signale que l'hétérogénéité des données et les incertitudes associées rendent cette conclusion discutable. En effet, il n'est pas certain que la conclusion de cette étude eut été identique si les données avaient été davantage maîtrisées en amont.

En l'absence de quantification du risque avéré (cas de légionellose), l'ensemble de ces données ne fait que confirmer le biais respectif de ces deux méthodes, qui avait déjà été identifié dans l'article de Lee *et al.* (2011) et dans le rapport de l'Anses de 2011.

Cette étude pointe néanmoins la difficulté de piloter les installations pour maîtriser le risque de développement de *Legionella*. La diversité des installations fait que leur gestion quotidienne doit être adaptée pour chacune d'elle. Ceci a été confirmé lors de l'audition des auteurs qui ont exprimé la complexité de fonctionnement des différents types de circuits. C'est, selon eux, un équilibre qui doit être recherché, entre la maîtrise du risque lié aux *Legionella* (circuit maîtrisé avec des résultats d'indicateurs conformes) et l'utilisation de biocides pour arriver à cette maîtrise. Il n'est pas question pour les auteurs du rapport KC de mettre en œuvre des mesures telles que des chocs biocides à chaque fois que l'indicateur ne serait pas conforme, mais plutôt d'inciter les exploitants à rechercher l'origine de l'apparition ou du relargage de *Legionella* dans le réseau. Le CES « Eaux » fait remarquer que c'est toutefois ce qui est préconisé jusqu'ici lorsque le seuil d'action en culture est dépassé.

Enfin, le CES « Eaux » souligne qu'à l'heure actuelle, il reste difficile de corréler les concentrations de *Legionella pneumophila* détectées dans l'eau avec un risque infectieux. Les seuils de prévention réglementaires ont été fixés de manière empirique (O'Brien et Bhopal, 1993), sur la base des données de la littérature qui présentaient des cas de légionellose liés à des TAR dont les niveaux de concentration en UFC/L de *Legionella* étaient connus. À l'époque, la maîtrise de la technique par culture n'était pas ce qu'elle est aujourd'hui. Pourtant, malgré les incertitudes associées, il est apparu nécessaire de fixer des seuils pour maîtriser le risque. Des données équivalentes pour la méthode par q-PCR ne sont actuellement pas disponibles. L'indicateur n'en

est pas moins intéressant et le CES « Eaux » recommande donc la poursuite des travaux afin de fixer des seuils de gestion pour la méthode par q-PCR.

Pour fixer des seuils avec la plus grande justesse, une étude dont les paramètres seraient maîtrisés doit être mise en place. Cette étude devra comparer les résultats des deux méthodes par type d'installation et/ou par points de prélèvements sur le circuit de la TAR sur la base d'un protocole défini *a priori*.

5. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES « Eaux ».

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Legionella pneumophila, *Legionella*, q-PCR, tours aérorefrigérantes, méthode par culture, eau
Legionella pneumophila, *Legionella*, q-PCR, cooling towers, culture method, water

BIBLIOGRAPHIE

Anses. (2011). Méthode de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. (saisine 2009-SA-330). Maisons-Alfort : Anses, 144 p.

Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement.

Arrêté du 13 janvier 2017 portant homologation de la décision n°2016-DC-0578 de l'Autorité de sûreté nucléaire du 6 décembre 2016 relative à la prévention des risques résultant de la dispersion de micro-organismes pathogènes (légionelles et amibes) par les installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression. Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, en charge des relations internationales sur le climat

DIETERSDORFER E., S. CERVERO-ARAGÓ, R. SOMMER (2016). Optimized methods for *Legionella pneumophila* release from its *Acanthamoeba* hosts. *Bio Med Central Microbiology*, vol. 16 (74) : p 1-10.

LEE J.V., S. LAI, M. EXNER *et al.* (2011). An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 110 : p. 1302-1044.

O'BRIEN S., R. BHOPAL (1993). Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *Lancet*, vol 342 : p 5–6. 10.1016/0140-6736(93)91877-O

**Analyse du rapport des sociétés KOSAMTI et CAPSIS
concernant l'étude de la détermination de seuils de gestion
pour la méthode q-PCR de dénombrement des *Legionella
pneumophila* dans les installations de refroidissement
couvertes par la rubrique 2921 des ICPE**

**Saisine 2016-SA-0035
Saisine liée 2009-SA-0330- méthodes de détection et de dénombrement de
Legionella dans l'eau**

**RAPPORT
d'expertise collective**

CES Eaux Groupe de travail q-PCR légionelles

juin 2017

Mots clés

Legionella pneumophila, *Legionella*, q-PCR, tours aéroréfrigérantes, méthode par culture, eau
Legionella pneumophila, *Legionella*, q-PCR, cooling towers, culture method, water

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Claude-Olivier SARDE – Enseignant chercheur à l'université de Technologie de Compiègne. Biologie moléculaire- Président de l'ancien groupe de travail sur les méthodes de détection et de quantification des légionelles (2011).

Membres

Mme Séverine ALLEGRA – Enseignante chercheur à l'université Jean Monnet à Saint-Étienne (MCU). Caractérisation des aérosols de légionelles, biologie moléculaire, qualité des eaux.

Mme Maud BAUME – Ingénieur aux Hospices civils de Lyon. Membre du centre national de référence des légionelles. Biologie moléculaire. Méthodologie des essais.

Mme Nathalie GARREC – Ingénieur de recherche au Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB)- microbiologiste, statistique.

M. Pierre LE CANN – Enseignant-chercheur à l'École des Hautes Études en Santé Publique. Microbiologiste, biologie moléculaire, qualité des eaux.

M. Laurent MOULIN – Responsable du département recherche et développement de biologie à Eau de Paris. Qualité des eaux, biologie moléculaire, écologie microbienne.

RAPPORTEURS

Mme Sylvie DUBROU – Retraitée, Directeur de laboratoire / Docteur en pharmacie - Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris - Microbiologie de l'eau.

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES « Eaux » :

■ Président

M. Yves LÉVI – Professeur de santé publique et environnement – Université Paris Sud – Santé publique, Santé environnement, polluants émergents, évaluation de risques sanitaires, écologie microbienne

■ Membres

Mme Claire ALBASI - Directrice de recherche / Docteur ingénieur - UMR 5503, Laboratoire de génie chimique, CNRS-INPT-UPS, Toulouse - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, assainissement, chimie de l'eau, utilisation de ressources en eau alternatives.

Mme Sophie AYRAULT - Chef d'équipe / Docteur habilité à diriger des recherches - CEA, Gif-sur-Yvette - Chimie de l'eau dont chimie minérale.

M. Jean BARON - Responsable de département / Ingénieur de recherche - Eau de Paris - Matériaux au contact de l'eau, produits et procédés de traitement de l'eau (filiales de traitement).

M. Jean-Luc BOUDENNE - Professeur - Université Aix-Marseille - Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux. Laboratoire Chimie de l'environnement.

Mme Véronique BOUVARD - Spécialiste scientifique / Docteur en sciences - CIRC / OMS, Lyon - Toxicologie dont cancérogénèse.

Mme Corinne CABASSUD - Professeure - INSA, Toulouse - Laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, UMR INSA-CNRS-INRA - Produits et procédés de traitement de l'eau dont membranes, chimie de l'eau.

M. Jean CARRÉ – Retraité, Docteur en sciences – Hydrogéologie, ressources en eau, périmètres de protection des captages et expérience terrain.

Mme Catherine CHUBILLEAU - Praticien hospitalier / Docteur en pharmacie, Docteur en sciences - Centre Hospitalier de Niort - Épidémiologie, microbiologie de l'eau.

M. Olivier CORREC - Ingénieur de recherche / Docteur en sciences - CSTB - Matériaux au contact de l'eau, réseaux intérieurs.

M. Christophe DAGOT - Directeur adjoint / Professeur - ENSIL, Limoges - Assainissement, utilisation de ressources en eau alternatives.

Mme Isabelle DUBLINEAU - Chargée de mission auprès du directeur de la radioprotection de l'Homme / Docteur habilité à diriger des recherches - IRSN, Fontenay-aux-Roses - Toxicologie.

Mme Sylvie DUBROU - Directeur de laboratoire / Docteur en pharmacie - Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris - Microbiologie de l'eau.

M. Robert DURAN - Responsable d'équipe / Professeur - Université de Pau et des Pays de l'Adour - Écotoxicologie.

M. Stéphane GARNAUD – Docteur en sciences – jusqu'au 14/06/2016 Responsable technique eau à la Mairie de Saint-Maur-des-Fossés et à partir du 15/06/2016 Ingénieur au Syndicat des eaux d'Île de France – Assainissement.

M. Jean-François HUMBERT - Directeur de recherche / Docteur habilité à diriger des recherches - UMR BIOENCO, INRA, Paris - Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

M. Michel JOYEUX - Directeur recherche développement et qualité de l'eau / Docteur en médecine, Docteur en sciences - Eau de Paris - Toxicologie, évaluation de risques sanitaires, santé publique.

Mme Colette LE BÂCLE - Retraîtée - Docteur en médecine - Santé travail, microbiologie de l'eau.

M. Benjamin LOPEZ - Chef de projet / Docteur en sciences - BRGM, Orléans - Hydrogéologie, ressources en eau, modélisation.

M. Jacques-Noël MUDRY – Retraité, Docteur en sciences – Hydrogéologie, ressources en eaux, périmètres de protection des captages, expérience terrain.

M. Daniel PERDIZ - Maître de conférences / Pharmacien toxicologue - Université Paris 11 Sud - Toxicologie, génotoxicité, perturbateurs endocriniens dans l'eau.

Mme Fabienne PETIT - Enseignant chercheur / Professeur - Université de Rouen / UMR CNRS M2C - Écologie microbienne.

M. Mohamed SARAHA - Professeur - Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal - Produits et procédés de traitement de l'eau, photochimie, oxydation avancée, chimie réactionnelle de l'eau.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT - Professeur - Université d'Auvergne / Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand - Santé publique et environnement, épidémiologie, évaluation de risques sanitaires.

Mme Michèle TREMBLAY - Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire / Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses - Institut de santé publique du Québec / Direction de santé publique de Montréal - Santé travail, microbiologie de l'eau.

Mme Michèle VIALETTE - Chef de service / Docteur habilité à diriger des recherches - Institut Pasteur de Lille - Microbiologie de l'eau dont virologie.

Mme Bénédicte WELTÉ - Directrice adjointe de recherche du développement et de la qualité de l'eau / Docteur en sciences - Eau de Paris - Produits et procédés de traitement de l'eau (tous procédés, filières de traitement).

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Carole CATASTINI – chef de projet – Anses

Contribution scientifique

Mme Pascale PANETIER- chef d'unité -Anses

Secrétariat administratif

Mme Virginie SADÉ – Anses

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement (AGLAE)

M. Philippe GUARINI – directeur

M Olivier MOLINIER – statisticien

M. Éric PIERLOT – responsable des essais de biologie

CAPSIS

M. Gilles CHAPERON – Directeur technique

Électricité de France (EDF)

Mme Marie BINET – ingénieur chercheur et expert - EDF Recherche et développement

KOSAMTI

Mme Michèle MERCHAT – Gérante

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	8
Glossaire :	9
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures	9
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	10
1.1 Contexte.....	10
1.2 Objet de la saisine.....	10
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	10
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.	11
2 Rappel de la problématique de <i>Legionella</i> dans les tours aérorefrigérantes.....	12
2.1 Définition et description des tours aérorefrigérantes.....	12
2.1.1 Tour à voie humide à circuit ouvert.....	13
2.1.2 Tour à voie humide à circuit fermé	13
2.1.3 Origine de l'eau d'appoint	15
2.2 Réglementation	15
2.2.1 Tours aérorefrigérantes relevant du régime des installations classées pour l'environnement.....	15
2.2.2 Cas des installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression.....	17
2.2.3 Traitement préventifs et curatifs autorisés.....	17
2.3 Réglementations et guides internationaux.....	18
2.4 Occurrence des cas de légionellose liés à la présence de <i>Legionella pneumophila</i> dans les tours aérorefrigérantes en France et dans le monde	20
2.4.1 En France.....	20
2.4.2 Dans le monde.....	20
3 Description des méthodes de détection et de dénombrement de <i>Legionella</i> dans l'eau de TAR	27
3.1 Méthode par culture	27
3.2 Méthodes basées sur l'amplification génique.....	30
3.2.1 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR).....	30
3.2.2 Autres méthodes d'amplification génique	32
4 Analyse du rapport KC relatif à la détermination de seuils de gestion pour la méthode q-PCR dans les tours aérorefrigérantes humides	34
4.1 Données exploitées.....	34
4.2 Traitement des données	36
4.2.1 Étude qualitative	36

4.2.2 Étude quantitative	39
4.3 Suivi des installations.....	44
5 Conclusions	46
5.1 Conclusions de l'étude Kosanti-Capsis.....	46
5.2 Avis du groupe de travail sur le rapport d'étude Kosanti et Capsis.....	46
5.3 Propositions du groupe de travail sur la détermination de seuils de gestion des TAR par q-PCR	47
6 Bibliographie.....	49
6.1 Normes.....	49
6.2 Publications.....	49
6.3 Législation et réglementation.....	56
6.4 Site internet	56
ANNEXES	57
Annexe 1 : Lettre de saisine.....	58
Annexe 2 : Avantages et inconvénients de méthodes normalisées par culture et par q-PCR pour le dénombrement de <i>Legionella</i> dans les TAR.	60
Annexe 3 : Validation des méthodes alternatives pour la détection de <i>Legionella</i> par PCR	61

Sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AFNOR : agence française de normalisation

Anses : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine tri phosphate

BCYE: buffered charcoal yeast extract; milieu tamponné charbon actif extrait de levure

BVNC : bactéries viables mais non cultivables (VBNC en anglais)

CES : comité d'experts spécialisé

Ct : threshold cycle ; cycle seuil

Cq : quantification cycle ; cycle de quantification

ECS : eau chaude sanitaire

EDCH : eau destinée à la consommation humaine

EMA : ethidium monoazide; monoazide d'éthidium

GT : groupe de travail

GVPC : glycine vancomycine polymyxine cycloheximide

ICPE : installation classée pour la protection de l'environnement

ISO : international standard organization ; organisation internationale de normalisation

LD : limite de détection

LLAP : *Legionella* like amoebal pathogen

LQ : limite de quantification

MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionization-time of flight

MES : matières en suspension

MWY : milieu de Wadowsky et Yee

PMA : propidium monoazide ; monoazide de propidium

TAR : tour aéroréfrigérante

PCR : polymerase chain reaction ; réaction de polymérisation en chaîne

q-PCR : PCR quantitative

VC : viable culturable ; viable et cultivable

v-PCR : viable PCR ; PCR de viabilité

UFC : unité formant colonie

UG : unité génome

Glossaire :

Gène *mip* (macrophage infectivity potentiator) : séquence d'ADN codant pour une protéine impliquée dans le pouvoir infectieux de *Legionella*. La variabilité des séquences du gène *mip* permet de différencier les *Legionella pneumophila* potentiellement pathogènes.

Gène *epoB*

Mesurande : terme défini dans le vocabulaire international de métrologie comme étant la grandeur devant être mesurée.

Liste des tableaux

Tableau I: actions correctives à mettre en œuvre par l'exploitant en fonction des concentrations en <i>Legionella pneumophila</i> dans l'eau de la tour aéroréfrigérante. _____	17
Tableau II : valeurs cibles de surveillance des tours aéroréfrigérantes préconisées par les réglementations ou guides internationaux _____	18
Tableau III : occurrence des cas de légionellose liés à la présence de <i>Legionella pneumophila</i> en France dans les tours aéroréfrigérantes. _____	20
Tableau IV: données internationales d'occurrence des cas de légionellose liés à la présence de <i>Legionella pneumophila</i> dans les tours aéroréfrigérantes _____	20
Tableau V : Tableau croisé des principaux résultats obtenus par culture et q-PCR et paramètres de validité intrinsèque en référence à la culture présentés dans le rapport KC _____	38

Liste des figures

Figure 1 : exemple de TAR à circuit ouvert _____	13
Figure 2 : exemple TAR à circuit fermé _____	14
Figure 3 : présentation des données selon les méthodes analytiques utilisées. _____	35
Figure 4 : présentation de la répartition des données utilisées pour déterminer des valeurs cibles de q-PCR. _____	40

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

L'Agence, dans son rapport relatif aux méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau (Anses, 2011), avait proposé, à titre expérimental, des valeurs cibles pour la surveillance de *L. pneumophila* par la méthode de q-PCR (quantitative polymerase chain reaction) dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. L'Agence avait souligné l'importance de consolider ces valeurs par la réalisation d'une étude métrologique afin de comparer les résultats d'analyses obtenus avec la méthode par culture et celle par q-PCR. L'agence avait également précisé dans ce rapport qu'en l'état des connaissances, et en l'absence de cette étude métrologique, les résultats obtenus à l'aide de ces deux méthodes n'étaient pas comparables.

Le ministère en charge de l'environnement a initié un appel d'offre en juillet 2013 afin de réaliser une étude permettant de déterminer des seuils de gestion applicables pour les résultats obtenus par la méthode q-PCR *Legionella pneumophila* qui aboutirait à des actions similaires à celles induites par la méthode par culture, dans le contexte de la gestion des tours aéroréfrigérantes (TAR) des Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE).

L'appel d'offre se basait sur la collecte de données existantes auprès de différents acteurs (laboratoires, exploitants, ou données bibliographiques). Le but de cette étude n'étant pas d'évaluer la performance de la méthode q-PCR car la méthode est considérée comme suffisamment robuste et stable pour être prise en compte dans la réglementation.

1.2 Objet de la saisine

Les conclusions de cette étude, réalisée par la société KOSAMTI et le laboratoire CAPSIS, ont été transmises à l'Anses le 12 octobre 2015. Ces conclusions seront désignées dans le présent document sous le terme de « rapport KC ».

Le GT note que la gérante de la société KOSAMTI co-rédactrice du rapport est également salariée de la société Climespace à l'origine d'une partie des résultats exploités dans le rapport.

L'Agence s'est autosaisie le 16 février 2016 afin d'expertiser l'étude transmise par le ministère de l'environnement.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au groupe de travail « q-PCR légionelles », rattaché au comité d'experts spécialisé « Eaux » (CES « Eaux »), l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail (GT) ont été soumis régulièrement au CES « Eaux » tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport produit par le GT tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES « Eaux » et a été validé lors de la séance du 4 juillet 2017. L'avis associé a été validé par le CES « Eaux » lors de la séance du 13 septembre 2017.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

Les travaux d'expertise ont été menés sur la base d'une synthèse bibliographique, établie à partir du moteur de recherche SCOPUS entre juin 2016 et juin 2017. Les mots clés principaux de la recherche furent : « *Legionella* », « *Legionella pneumophilla* », « Legionnaires' disease », « cooling water system », « q-PCR »

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge de la santé.

2 Rappel de la problématique de *Legionella* dans les tours aéroréfrigérantes

2.1 Définition et description des tours aéroréfrigérantes

Les TAR sont des équipements permettant de refroidir des eaux réchauffées par une source d'énergie. Présentes dans des installations de climatisation ou associées à des procédés industriels et énergétiques s'accompagnant de production de chaleur, elles sont utilisées pour refroidir un fluide (généralement un liquide, plus rarement un gaz) à l'aide d'un moyen de refroidissement, ce dernier étant le plus souvent l'air ambiant. Elles sont donc des échangeurs de chaleur au sein desquels le transfert thermique s'effectue par contact direct ou indirect entre des flux d'eau et d'air.

Selon le site de la direction générale de la prévention des risques du Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (<http://www.developpement-durable.gouv.fr/Principes-generaux.12091.html>)¹ « Toute exploitation industrielle ou agricole susceptible de créer des risques ou de provoquer des pollutions ou nuisances, notamment pour la sécurité et la santé des riverains est une installation classée. Les activités relevant de la législation des installations classées sont énumérées dans une nomenclature (dernière version : 37.04, mars 2016) qui les soumet à un régime d'autorisation, d'enregistrement ou de déclaration en fonction de l'importance des risques ou des inconvénients qui peuvent être engendrés ». Les installations mentionnées dans cette rubrique sont désignées sous le terme d'installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE).

Il existe différents modèles de TAR, mais seules les tours à voie humide, qu'elles soient à circuit ouvert ou fermé, relèvent des ICPE au titre de la rubrique n°2921. Elles sont définies comme des installations de « refroidissement évaporatif par dispersion d'eau dans un flux d'air généré par ventilation mécanique ou naturelle ». Dans le cadre de cette rubrique, sont soumis :

- à enregistrement, les systèmes de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air à circuits ouverts de plus de 3 MW ;
- à déclaration, les systèmes de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air à circuits ouverts de moins de 3 MW et à circuits fermés quelle que soit la puissance.

Les TAR à voie sèche et les tours adiabatiques vraies (fonctionnant sans aucune pulvérisation d'eau dans un flux d'air) ne sont pas concernées par cette réglementation et ne seront donc pas traitées dans le présent document. Les systèmes mixtes (tour fonctionnant en mode sec ou humide selon la température) sont considérés comme des tours à voie humide lorsqu'ils fonctionnent selon ce mode.

D'une manière générale, les TAR à voie humide sont des installations permettant un transfert de chaleur, par contact direct, entre de l'eau à refroidir issue d'un process et de l'air ambiant au travers de surfaces de ruissellement. Des ouvertures (trappes de visite) permettent l'accès à l'intérieur de la tour et le contrôle visuel des différentes parties constitutives.

La partie basse de la tour forme le bac récupérateur (ou bassin de rétention) qui collecte les eaux ruisselantes suite à l'échange thermique. Le niveau d'eau de ce bac est étroitement contrôlé et un

¹ Site consulté en septembre 2016.

système de remplissage alimenté en eau d'appoint permet le remplacement de l'eau évaporée au cours du processus de refroidissement. Un système de purge est également présent à ce niveau. Des résistances commandées par un thermostat antigel sont souvent incorporées dans le bac.

Au dessus du bac, un système de ventilation assure généralement un flux d'air ascendant continu au sein de la tour.

Dans la partie haute de la tour, le pare-gouttelettes (ou séparateur de gouttes) est un ensemble de chicanes conçu pour limiter l'entraînement des gouttes d'eau (ou entraînement vésiculaire) par le flux d'air et de vapeur sortant du dispositif.

2.1.1 Tour à voie humide à circuit ouvert

Dans une tour à voie humide à circuit ouvert (également appelée tour ouverte) (figure 1), l'eau provenant du condenseur ou d'un échangeur intermédiaire est directement pulvérisée en fines gouttelettes par des disperseurs, généralement constitués de buses situées au niveau de rampes de distribution. Cette eau pulvérisée emprunte alors, sous l'effet de la gravité, une voie descendante à travers une surface de ruissellement, aussi appelée « corps d'échange » « garnissage » ou encore « packing ».

Un contre-courant d'air ascendant permanent généré par le système de ventilation, passive ou mécanique grâce à un ou des ventilateurs, favorise le contact entre l'air et l'eau et donc l'échange thermique. Lors de cet échange, une quantité d'eau est évaporée et entraînée vers l'extérieur, tandis que le reste est refroidi et ruisselle sur le corps d'échange jusqu'à la partie basse de la tour. L'eau de ruissellement refroidie est recueillie dans le bac récupérateur avant d'être réinjectée dans le condenseur par l'action d'une pompe.

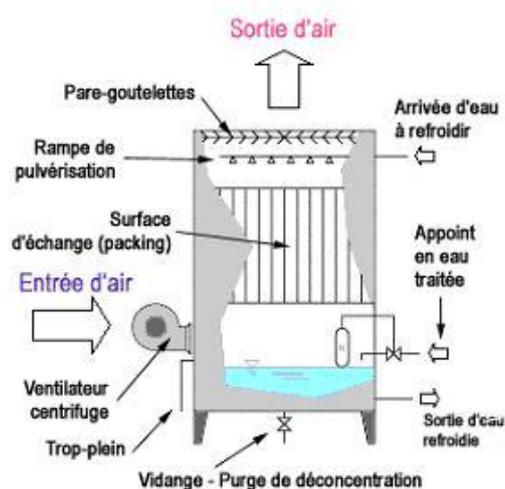


Figure 1 : exemple de TAR à circuit ouvert

(D'après la fiche pratique « TAR » proposée par la chambre de commerce et d'industrie de Limoges et de la Haute-Vienne (www.limoges.cci.fr)).

2.1.2 Tour à voie humide à circuit fermé

Dans une tour à voie humide à circuit fermé (également appelée tour fermée) (figure 2), l'eau provenant du condenseur ou d'un échangeur intermédiaire circule dans un circuit clos constituant lui-même un échangeur tubulaire étanche. Cet échangeur tubulaire se substitue ici au corps

d'échange présent dans les tours ouvertes. À la différence de la tour ouverte, ce circuit primaire clos est totalement confiné et n'a pas de contact direct avec l'air².

L'eau en provenance du bassin de récupération situé en partie basse de la tour est remontée par une pompe avant d'être pulvérisée en fines gouttelettes sur l'échangeur à l'aide des disperseurs, généralement constitués de buses situées au niveau de rampes de distribution.

Dans le même temps, un contre-courant d'air ascendant généré par le système de ventilation (passive ou mécanique grâce à un ou des ventilateurs) permet le refroidissement de l'eau pulvérisée. Une quantité de cette eau est alors évaporée lors du contact avec l'échangeur qu'elle refroidit en retour, tandis que le reste ruisselle dans le corps de la tour avant d'être collectée dans le bac récupérateur situé en partie basse.

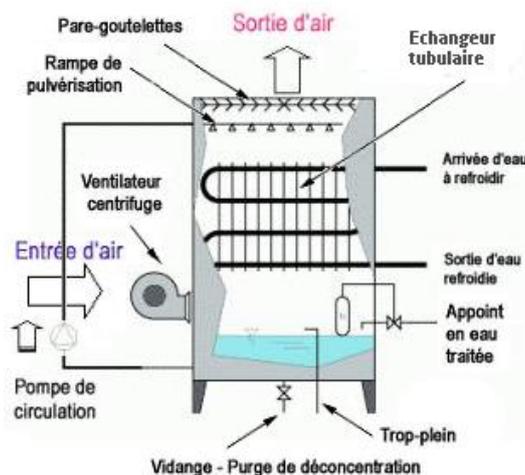


Figure 2 : exemple TAR à circuit fermé

(D'après la fiche pratique « TAR » proposée par la chambre de commerce et d'industrie de Limoges et de la Haute-Vienne (www.limoges.cci.fr))

Que la tour à voie humide soit à circuit ouvert ou fermé, l'air traversant le système de ruissellement est diffusé dans l'atmosphère par la partie supérieure de la tour. Saturé de vapeur d'eau, il crée un nuage visible à la sortie des tours aéroréfrigérantes humides. Ce nuage, appelé « panache », est constitué :

- de vapeur d'eau : c'est la quantité d'eau évaporée pour assurer le refroidissement. Elle est fonction de la chaleur éliminée ;
- de gouttelettes entraînées : ce sont de fines particules d'eau issues du circuit de refroidissement et entraînées secondairement dans l'atmosphère par la circulation de l'air dans la tour. Le rôle du pare-gouttelette situé en haut de la tour est de limiter, voire d'empêcher cet entraînement. Contrairement à l'eau évaporée, les gouttelettes entraînées sont susceptibles de véhiculer des micro-organismes, notamment des bactéries pathogènes. C'est la présence de ces micro-organismes et le risque qu'ils sont susceptibles de représenter qui justifie le classement des tours aéroréfrigérantes humides au sein des ICPE.

² Les tours à condenseurs évaporatifs sont, dans leur conception, très proches des tours à circuit fermé. En lieu et place de la surface d'échange tubulaire dans laquelle circule l'eau issue du condenseur, on trouve une batterie de condensation dans laquelle circule un fluide frigorigène. Les autres caractéristiques de la tour sont identiques et pourront donc être considérées à bon droit comme une variante des tours à circuit fermé en traitant les deux types de tour comme un même type d'installation.

2.1.3 Origine de l'eau d'appoint

Le bac de récupération qui recueille l'eau non évaporée en bas de la tour constitue un milieu au sein duquel des micro-organismes sont susceptibles de proliférer. Il accumule également des particules solides, formant les matières en suspension (MES), dont la concentration pondérale tend à augmenter au cours du temps. Afin de limiter la concentration des MES en dessous du seuil réglementaire de 30 mg/L, des purges de l'eau du bac, compensées par des appoints en eau sont régulièrement nécessaires.

La qualité de l'eau d'appoint est une caractéristique importante susceptible d'impacter en retour la qualité de l'eau pulvérisée au sein des tours humides et donc du panache émis dans l'environnement. En effet, en fonction de son origine (eau de rivière, eau de forage ou eau destinée à la consommation humaine (EDCH), la charge en MES et/ou en micro-organismes qu'elle contient est susceptible de varier assez fortement. Pour les eaux d'appoint de rivière notamment, des variations saisonnières ou simplement liées aux fluctuations de la qualité de l'eau du cours d'eau sont courantes. Les eaux d'appoint nécessitent donc parfois un pré-traitement adapté à leur niveau de qualité. Les prétraitements les plus courants sont la filtration et l'adoucissement, auxquels s'ajoute parfois un traitement biocide. Ces prétraitements se distinguent des traitements réguliers de l'eau de la tour.

2.2 Réglementation

2.2.1 Tours aéroréfrigérantes relevant du régime des installations classées pour l'environnement.

La réglementation applicable aux TAR ICPE a été révisée par le décret et les arrêtés du 14 décembre 2013 relatifs aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement et du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des ICPE³. Ces textes fixent les prescriptions applicables qui ont pour principaux objectifs de :

- veiller au bon entretien des circuits d'eau de refroidissement pour éviter la prolifération de *Legionella pneumophila* ;
- éviter la propagation dans l'environnement d'aérosols pouvant présenter un risque pour la santé.

Elles imposent notamment :

- la réalisation d'une analyse de risques de développement de *Legionella pneumophila* ;
- la mise en place d'un pare-gouttelettes ;
- l'élaboration d'un plan d'entretien préventif de l'installation ;

³ Décret n° 2013-1205 du 14 décembre 2013 modifiant la nomenclature des installations classées (concerne la rubrique 2921 – Refroidissement évaporatif par dispersion d'eau dans un flux d'air généré par ventilation mécanique ou naturelle) (JORF n°298 du 24/12/2013)

Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement (JORF n°298 du 24/12/2013).

Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement (JORF n°298 du 24/12/2013).

- la formation des personnels susceptibles d'intervenir sur les TAR.

Elles précisent la fréquence des analyses pour la détection de *Legionella pneumophila* et les actions à mener en cas de dépassement de seuils. Des analyses complémentaires peuvent être demandées à tout moment par l'inspection des installations classées.

La fréquence des analyses en *Legionella pneumophila* dépend de la puissance de l'installation :

Pour les sites dont la puissance cumulée des TAR est > 3 MW :

- eaux du circuit de refroidissement : mensuelle ;
- pour les eaux d'appoint : annuelle.

Pour les sites dont la puissance cumulée des TAR est < 3 MW :

- eaux du circuit de refroidissement : bimestrielle ;
- pour les eaux d'appoint : annuelle.

Cette fréquence d'analyse s'applique dès lors que l'installation de refroidissement est en fonctionnement, que le fonctionnement soit continu ou intermittent.

Les prélèvements et analyses doivent être effectués selon la norme NF T90-431⁴. L'ensemble des seuils de gestion mentionnés dans les présents arrêtés est spécifique à cette méthode d'analyse et exprimés en unité formant colonies par litre d'eau (UFC/L). Bien que d'autres méthodes alternatives soient théoriquement utilisables, l'absence de seuils de gestion les concernant rend cette utilisation impossible en pratique.

Le seuil d'alerte est fixé à 10^3 UFC/L en *Legionella pneumophila* dans l'eau : au-delà l'exploitant doit mettre en place l'ensemble des actions curatives nécessaires pour un retour rapide de cet indicateur sous le seuil d'alerte. Le seuil d'arrêt de l'aérodispersion pour les installations est de 10^5 UFC/L en *Legionella pneumophila*. L'exploitant n'est pas tenu d'arrêter l'intégralité de la TAR, mais seulement la ventilation.

Le paramètre *Legionella* spp n'a plus de seuil réglementaire associé mais son suivi constitue un indicateur du risque de développement de *Legionella pneumophila* dans la TAR.

⁴ NF T90-431(novembre 2014) 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.

Tableau I: actions correctives à mettre en œuvre par l'exploitant en fonction des concentrations en *Legionella pneumophila* dans l'eau de la tour aéroréfrigérante.

Seuils d'action – Concentration en <i>Legionella pneumophila</i> (UFC/L)	Actions correctives à mettre en oeuvre par l'exploitant
> 10 ³ UFC/L	<ul style="list-style-type: none"> • mettre en oeuvre des actions correctives pour abaisser la concentration en <i>Legionella pneumophila</i> ; • vérifier sous deux semaines que la concentration est revenue sous le seuil d'action.
> 10 ⁵ UFC/L (arrêt immédiat du fonctionnement du système de ventilation de refroidissement)	<ul style="list-style-type: none"> • vidanger, nettoyer et désinfecter l'ensemble du circuit ; • informer l'inspection des installations classées ; • effectuer des contrôles tous les quinze jours pendant 3 mois (en cas de dépassement du seuil de 10⁵ UFC/L, nouvel arrêt de la ventilation de l'installation).

(Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement)

2.2.2 Cas des installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression

Une réglementation particulière a été rédigée pour les TAR des Centres Nucléaires de Production d'Électricité (CNPE). Ces systèmes de refroidissement sont soumis à la réglementation des installations nucléaires de base (INB). Selon ces recommandations, Électricité de France (EDF) doit mettre en place toutes mesures de prévention adaptées afin de maintenir la concentration en *Legionella pneumophila* en dessous du seuil réglementaire. L'arrêté du 13 janvier 2017 (portant homologation de la décision n°2016-DC-0578 de l'Autorité de sûreté nucléaire du 6 décembre 2016 relative à la prévention des risques résultant de la dispersion de micro-organismes pathogènes par les installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression) prévoit de fixer comme seuil d'action corrective la valeur de 10⁴ UFC/L et le seuil d'action curative à 10⁵ UFC/L en L.p. La fréquence des analyses est au minimum bimensuelle pendant la période de fonctionnement de l'installation.

2.2.3 Traitement préventifs et curatifs autorisés

Les traitements des eaux d'un circuit de refroidissement ont pour objectif essentiel de maintenir les surfaces d'échange aussi propres que possible et de préserver l'installation contre la corrosion, l'entartrage, l'encrassement et les risques microbiologiques (guide des bonnes pratiques. *Legionella* et tours aéroréfrigérantes, 2001). Il peut être nécessaire de réaliser :

- des traitements physiques comme notamment la filtration ou l'utilisation de rayonnements ultra-violet ;
- des traitements chimiques avec l'utilisation d'inhibiteurs d'entartrage ou de corrosion, des biodispersants ou des biocides en traitement de choc ou en continu.

Il existe deux grandes familles de biocides : les biocides oxydants et les biocides non oxydants. L'efficacité du traitement est dépendante de la dose et du temps de contact entre les micro-organismes et le produit actif. Une attention particulière doit être portée au pH et à la présence de substances inhibitrices qui peuvent influencer l'efficacité du produit. Si les conditions de mise en

œuvre ne sont pas conformes aux recommandations ou si la qualité de l'eau change brutalement, le produit risque d'être inefficace, même injecté en quantité importante.

Généralement, l'exploitant met en œuvre un traitement préventif permanent de l'eau pendant toute la durée de fonctionnement de l'installation, dont l'objectif est à la fois de réduire le biofilm et de limiter la concentration bactérienne (y compris en *Legionella* libres) dans l'eau du circuit.

Les biocides oxydants sont souvent appliqués en continu et à faibles concentrations, avec un contrôle permanent pour prévenir la corrosion engendré par leur emploi.

Les biocides non oxydants sont injectés de manière intermittente, à périodicité courte. Deux produits biocides sont régulièrement utilisés en alternance afin d'éviter que les bactéries ne deviennent résistantes.

2.3 Réglementations et guides internationaux

Le tableau II présente les valeurs cibles préconisées dans les réglementations et guides nationaux mis en place par certains pays pour la surveillance de *Legionella (pneumophila* ou spp) dans les circuits de TAR. Cette liste est non exhaustive.

Tableau II : valeurs cibles de surveillance des tours aéroréfrigérantes préconisées par les réglementations ou guides internationaux

Pays	Réglementation/guide	Cible du dénombrement	Valeurs seuils
Allemagne	VDMA 24649 ; Instructions and recommandations for the reduction and prevention of Legionella in cooling circuits (VDI 4250 part 2, 2015)	<i>Legionella</i> spp	< 10 ⁴ UFC/ L dans l'eau du circuit
Australie	NSW Public Health Regulation de 2012 basée sur la Norme « Air-handling and water systems of buildings, microbial control, performance Based- maintenance AS/NZS 3666.4 /2011 »	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action : 10 ⁴ UFC/L dans le circuit la flore totale < 10 ⁸ UFC/L.
Belgique	Arrêté du Gouvernement flamand du 9 février 2007 publié le 24 mai 2007 relatif à la prévention de la maladie du légionnaire dans des espaces accessibles au public	<i>Legionella pneumophila</i>	Seuil d'action ≥10 ³ UFC/L ET < 10 ⁵ UFC/L Seuil d'arrêt ≥10 ⁵ UFC/L
Espagne	Décret royal 865/2003 du 4 juillet établissant les critères de santé et d'hygiène pour la prévention et le contrôle de la légionellose, modifié le 14 juillet 2010	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action 1 : > 100 et < 10 ³ UFC/L Seuil d'action 2 : > 10 ³ et < 10 ⁴ UFC/L Seuil d'arrêt : > 10 ⁴ UFC/L
Etat de New York	Rules governing cooling towers and health care facilities designed to reduce legionella infection (juin 2016) New York State Department of Health (site consulté le 23 mars 2017)	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action 1 : > 2 10 ⁴ UFC/L et <10 ⁵ UFC/L Seuil d'action 2 : ≥10 ⁵ UFC/L

Italie	Gazzetta ufficiale della repubblica italiana. Serie generale n°28 4-2-2005	Legionella spp	Seuil d'action >1000 et ≤ 10000 UFC/L Seuil d'action 2 : > 10000 UFC/L
Occupational Safety and Health Administration (site consulté le 3/01/2017)	D'après G.K.. Morris et B.G. Shelton, Pathcon Technical Bulletin 1.3, <i>Legionella</i> in Environmental Samples: Hazard Analysis and Suggested Remedial Actions, June 1991, Pathogen Control Associates, 270 Scientific Dr., Suite 3, Norcross, GA 30092	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action 1 : 10^5 UFC/L Seuil d'action 2 : 10^6 UFC/L
OMS	Légionelle et prévention de la légionellose. Seuils adaptés de HSE 2004 (2007)	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action 1 : $>10^4$ et $< 10^5$ UFC/L Seuil d'action 2 : $> 10^5$ UFC/L
Pays-Bas	ISSO 55.3 : « Legionella : Prévention dans les installations climatiques » (2014) Fiche professionnelle d'information 32 (AI-32) « Legionella ». (2013)	<i>Legionella</i> spp	<u>Pour les TAR se situant à proximité d'hôpitaux, d'hôtels ou d'établissements recevant du public :</u> Seuil d'action 1 : $> 10^2$ UFC/L et $< 10^3$ UFC/L Seuil d'action 2 : $> 10^3$ UFC/L et $< 10^4$ UFC/L Seuil d'action 3 : $> 10^4$ UFC/L et $< 10^5$ UFC/L Seuil d'arrêt : $> 10^5$ UFC/L <u>Pour les TAR se situant dans des zones résidentielles :</u> Seuil d'action 1 : $> 10^3$ UFC/L et $< 10^4$ UFC/L Seuil d'action 2 : $> 10^4$ UFC/L et $< 10^5$ UFC/L Seuil d'action 3 : $> 10^5$ UFC/L et $< 10^6$ UFC/L Seuil d'arrêt : $> 10^6$ UFC/L
Québec	Décret 451-2014 du 21 mai 2014 loi sur le bâtiment chapitre B-1.1	<i>Legionella pneumophila</i>	Seuil d'action 1 $\geq 10^4$ UFC/L et $< 10^6$ UFC/L Seuil d'action 2 $> 10^6$ UFC/L
Royaume-Uni	Guide technique : « Legionnaires'disease: Technical guidance. Part1: The control of <i>Legionella</i> bacteria in evaporative cooling systems » (HSE, 2013)	<i>Legionella</i> spp	Objectif : $< 10^2$ UFC/L Seuil d'action 1 : $> 10^2$ UFC/L et $< 10^3$ UFC/L Seuil d'action 2 : $> 10^3$ UFC/L
Singapour	Code of practice for the control of <i>Legionella</i> bacteria in cooling towers (third edition 2001)	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action : $> 10^4$ UFC/L et $< 10^6$ UFC/L Seuil d'arrêt : $\geq 10^6$ UFC/L

Suisse	« <i>Legionella</i> et légionellose », Office fédéral de la santé publique (2009)	<i>Legionella</i> spp	Seuil d'action : > 10 ³ UFC/L et ≤ 10 ⁴ UFC/mL Seuil d'arrêt > 10 ⁴ UFC/L
--------	---	-----------------------	---

2.4 Occurrence des cas de légionellose liés à la présence de *Legionella pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes en France et dans le monde

2.4.1 En France

Tableau III : occurrence des cas de légionellose liés à la présence de *Legionella pneumophila* en France dans les tours aéroréfrigérantes.

Localisation	Méthode de détection	Résultats des contrôles	Nombre de cas	Typage des souches	Références
Harnes, Nord. (2003)	Culture	44/610 (7,2%) TARs positives (10 ⁶ - 10 ¹⁰ UFC/L) et 5/165 systèmes industriels de réfrigération.	104 cas suspectés, 86 confirmés, 18 décès.	<i>L. pneumophila</i> sg1 Lens et sg2-15	Nguyen <i>et al.</i> , 2006
Meudon, Ile de France (2012)	Culture	TAR humide à circuit fermé < 500 UFC/L (contrôles mensuels de l'exploitant) * 7.10 ⁶ UFC/L (contrôle inopiné diligent par la DRIEE)		<i>L. pneumophila</i> séro-groupe 1 Les 3 souches cliniques et les souches environnementales de la tour appartenaient au sous-groupe Philadelphia et présentaient le même <i>Sequence Type</i> (ST = 440) et le même profil génomique.	Taouqi et Massi, 2013

*un choc biocide était systématiquement réalisé 48 heures avant le prélèvement

Seuls ces deux épisodes ont fait l'objet d'une publication. D'autres épisodes ont été investigués avec une suspicion de source de contamination par une TAR, mais dans la majorité des cas les données disponibles pour les enquêtes épidémiologiques n'ont pas permis d'identifier la source de contamination (site du CNR des Légionelles consulté le 21 mars 2017).

2.4.2 Dans le monde

Tableau IV: données internationales d'occurrence des cas de légionellose liés à la présence de *Legionella pneumophila* dans les tours aéroréfrigérantes

Localisation	Méthode de détection	TAR contaminée	Nombre de cas	Typage des souches	Références
Philadelphie (PA), USA	Culture enquête épidémiologique.	Système d'air conditionné alimenté par des	72 cas détectés	<i>L. pneumophila</i>	Fraser <i>et al.</i> , 1977

1976	aucun échantillon environnemental (validation <i>a posteriori</i>)	refroidisseurs à eau dans le soubassement			
Bloomington (IN), USA. 1978	Immunofluorescence (FA) + Tests d'inoculation à partir de l'eau de la TAR sur cobaye + culture (Charcoal Yeast Extract et F-G agar)	Système d'air conditionné alimenté par TAR à voie humide 24 échantillons dont 5 provenant de 3 TARs de l'Indiana Memorial Union (positifs en FA)	25 cas détectés	<i>L. pneumophila</i> sg 1 (Knoxville 1), sg3 (Bloomington 2) et sg2 (Togus 1)	Morris <i>et al.</i> , 1979, Politi <i>et al.</i> , 1979
Memphis (TN), USA. 1978	Tests d'inoculation à partir de l'eau de la TAR sur cobaye + culture (Charcoal Yeast Extract et F-G agar)	Système d'air conditionné contaminé par une TAR à voie humide	47 cas (23 confirmés, 18 présomptifs, 6 évocateurs).	<i>L. pneumophila</i> sg 1	Dondero <i>et al.</i> , 1980
Atlanta (GA), USA, 1978	non précisé	Condenseur évaporatif	8 cas, dont 3 confirmés	<i>L. pneumophila</i> sg1	Cordes <i>et al.</i> , 1980a
New York (NY), USA. 1978	non précisé	TAR à voie humide 2/21 TARs (soit 9,5 %)	38 cas détectés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Cordes <i>et al.</i> , 1980b
Västerås, Suède, 1979	Culture	TAR à voie humide	68 cas détectés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Nordström <i>et al.</i> , 1983
Burlington (VT), USA. 1980	3 laboratoires : inoculation intrapéritonéale de cochon d'Inde + culture (protocoles différents)	étude environnementale complète incluant 7 TAR, eau municipale et un bâtiment hospitalier. TAR à voie humide 1/7 (14%).	85 cas avérés sur deux épidémies	<i>L. pneumophila</i> sg1	Klaucke <i>et al.</i> , 1984
Lancaster. UK 1981	Culture (Dennis <i>et al.</i> , 1983)	4 TAR à voie humide (100%) positives	6 cas dans une centrale électrique.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Morton <i>et al.</i> , 1986
Providence (RI), USA. 1983	Concentration par filtration et culture (Gorman <i>et al.</i> , 1983)	4 TAR et eau chaude sanitaire (ECS) testés. 1/4 TAR (>6. 10 ⁶ UFC/L) située « au vent » des cas répertoriés).	15 cas dans une unité hospitalière	<i>L. pneumophila</i> sg1, sous-groupe 1, 2, 4,5.	Garbe <i>et al.</i> , 1985
New York (NE), USA. 1984	Culture	Système d'air conditionné alimenté par une TAR	86 cas détectés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Friedman <i>et al.</i> , 1987
Glasgow, UK. 1984	Culture (4 à 5 L filtrés sur 0,45 µm ou écouvillonnage)	1 TAR à voie humide (100 %) située 1700 m au	33 cas détectés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Ad Hoc Committee, 1986

		vent.			
Lincoln, UK. 1985	Culture	Système d'air conditionné contaminé par une TAR	4 cas dans un quartier général de police + 2 cas suspectés + 2 cas de proximité d'une TAR	<i>L. pneumophila</i> sg1	O Mahony <i>et al.</i> , 1987
Glasgow, UK. 1985	Culture (2 L filtrés 0,2 µm)	Système d'air conditionné contaminé par une TAR à voie humide	16 cas dans un hôpital.	<i>L. pneumophila</i> sg1, sous-groupe Pontiac 1a	Timbury <i>et al.</i> 1987
Stafford, UK. 1985	Culture	Système d'air conditionné de l'hôpital alimenté par une TAR à voie humide	68 cas hospitalisés (dont 22 décès) + 35 ambulatoires (dont 6 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1, sous-groupe Pontiac 1a	O Mahony <i>et al.</i> , 1990
Cudahy (WI), USA. 1986	Méthode de Gorman and Feeley Si nécessaire, concentration par filtration 0,2 µm,	Une TAR à voie humide 1/2 TAR (50%)	2 cas détectés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Addiss <i>et al.</i> 1986 (a et b)
Gloucester, UK. 1987	Culture	. 9/22 (41 %) TAR à voie humide	14 cas (dont 3 décès) + 3 Pontiac	<i>L. pneumophila</i> sg1	Hunt <i>et al.</i> , 1991
Bolton, UK. 1988	Culture	1/15 (6,6 %) TAR à voie humide du site de l'atelier (1,8 10 ⁷ UFC/L)	37 cas+ 23 Pontiac. 25 cas associés à un atelier de construction mécanique.	<i>L. pneumophila</i> sg1 sous-groupe Philadelphia RFLP type 5	Mitchell <i>et al.</i> , 1990
Londres, UK, 1989	Culture	5/76 (6,5 %) TAR échantillonnées 5 TAR à voie humide	33 cas (6 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1 (sous-groupe Benidorm, Philadelphia, OLDA, Oxford, Bellingham, Camperdown), sg6, sg8/14	Watson <i>et al.</i> , 1994
Sidney, Australie. 1993	Culture	2 TAR à voie humide (2,8. 10 ⁷ et 3,4. 10 ⁶ UFC/L respectivement) de l'hotel et 1 TAR à voie humide proche (4.5. 10 ⁵ UFC/L)	4 cas avérés + 33 avec titre IFA supérieur à 128 (28 légionelloses suspectées d'après symptômes)	<i>L. pneumophila</i> sg 1	Bell <i>et al.</i> , 1995
Wilmington (DE), USA. 1994	Culture	2/10 (20 %) TAR à voie humide toute 2 appartenant à l'hôpital	29 cas (0 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg 1	Brown <i>et al.</i> , 1999
Sestri Ponente, Italie. 1995	Culture (eau filtrée 0,2 µm)	8 TAR à voie humides	98 cas (66 hospitalisations) dont 5 décès.	<i>L. pneumophila</i> sg 1 (Sous-groupe Pontiac et OLDA), sg 8 et sg 10	Castellani Pastoris <i>et al.</i> , 1997

Franklin (PA), USA. 1995	Culture (étalement direct des échantillons collectés)	3/9 (30 %) TAR à voie humide testées ($2,8. 10^5$, $1,7. 10^5$ et $5. 10^3$ UFC/L respectivement)	22 cas	<i>L. pneumophila</i> sg 1 (sous-type 1, 2, 5, 6 [Philadelphia-1])	Fiore <i>et al.</i> , 1998
Providence (NE), USA. 1997	Culture (étalement direct ou concentration par filtration)	4/24 TAR à voie humide positives, dont 1 TAR correspondant aux patients	17 cas (dont 2 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg 1 (sous-type 1, 2, 5, 6)	Whitney <i>et al.</i> , 1997
Los Angeles (CA), USA. 1997	Culture	17/38 (44,7 %) TAR à voie humide positives	8 cas	<i>L. pneumophila</i> sg 1 : sous-types (1, 6, 7), (1, 6), (1, 2, 5, 6), (1, 4, 7) ; sg 4, sg 10.	Kool <i>et al.</i> , 2000
Thomastown, Australie. 1998	Culture	Analyse environnementale 5/65 (7,7 %) TAR à voie humide	18 cas	<i>L. pneumophila</i> sg 1	Formica <i>et al.</i> , 2000
Nottingham, UK. 1980-1999	Non précisé	Analyse environnementale impliquant les TAR sur la période 1997-2000. 4 cas liés avec certitude à une TAR à voie humide industrielle.	1677 cas communautaires sur 19 ans. 373 (22 %) liés à 67 épisodes épidémiques.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Lim <i>et al.</i> , 2003
Barcelone, Espagne. 2000	Culture (Pelaz <i>et al.</i> , 1992)	7 TAR à voie humide	54 cas dont 3 décès (5,5 %)	<i>L. pneumophila</i> sg1 (Pontiac, Philadelphia, Allentown.) et sg9	Jansa <i>et al.</i> , 2002
Melbourne, Australie. 2000	Culture (AS/NZS 3896 : 1998)	2 TAR à voie humide de climatisation	125 cas confirmés (dont 3 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1 (3.10^6 – $6,9. 10^6$ UFC/L) <i>L. pneumophila</i> sg1 sg3 sg5, sg6 et sg9 ($1,2. 10^7$ – $1,5. 10^7$ UFC/L) <i>L. pneumophila</i> autres espèces ($1,5. 10^6$ – 10^7 UFC/L)	Greig <i>et al.</i> , 2004
Murcia, Espagne. 2001	Culture (ISO 11731/1998)	339 installations (TARs, réservoirs de stockages, fontaines décoratives). 22 installations positives (TARs et réservoirs) dont 11/12 (91,6 %) TAR à voie humide	Plus de 800 cas suspectés, 449 confirmés.	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Pontiac (MAb 2+)	Garcia Fulgeiras <i>et al.</i> , 2003
Stavanger, Norvege. 2001	non précisé	1 TAR à voie humide	26 cas confirmés + 2 suspectés. (7 décès). 1 TAR impliquée	<i>L. pneumophila</i> sg1	Blystad <i>et al.</i> , 2001

Mataro, Espagne. 2002	Culture (1L concentré par filtration)	Analyse environnementale sur 30 installations (13 TAR, 4 fontaines, 5 sprinklers, etc.) 2 TAR humides	113 cas répertoriés.	<i>L. pneumophila</i> sg1 (2. 10 ⁵ UFC/L) et <i>L. pneumophila</i> sgs 2-14 (10 ² UFC/L)	Sabria <i>et al.</i> , 2006
Rome, Italie. 2003	Culture (ISO 11731/1998)	1 TAR à voie humide impliquée (1,4. 10 ⁶ UFC/L)	15 cas répertoriés.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Rota <i>et al.</i> , 2005
Hereford, UK. 2003	Culture	111 échantillons de 50 TAR testées (dont 2 TAR à voie humide positives)	28 cas répertoriés (dont 2 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1	Kirrage <i>et al.</i> , 2007
Zaragoza, Espagne. 2004	non précisé	2 TAR à voie humide	27 cas confirmés (+ 3 probables). 7 décès	<i>L. pneumophila</i> sg1 Pontiac	Alonso <i>et al.</i> , 2004
Lidköping, Suède. 2004	non précisé	1 TAR à voie humide impliquée	30 cas sur 2 épidémies consécutives (2 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1 (Benidorm, Bellingham)	Hugosson <i>et al.</i> , 2007
Barcelone, Espagne. 2004	Culture après filtration sur 0,22 µ	4 TAR à voie humide	33 cas (2 décès)	<i>L. pneumophila</i> sg1 Pontiac	Garcia <i>et al.</i> , 2008
Torre Vieja, Espagne. 2005	PCR + Culture	4 TAR à voie humide	28 cas	<i>L. pneumophila</i>	Luna <i>et al.</i> , 2005
Sarpsborg, Norvège. 2005	non précisé	19 TARs suspectées	39 cas (5 décès)	<i>L. pneumophila</i>	Blystad <i>et al.</i> , 2005
Toronto, Canada. 2005	Culture (échec PCR)	Analyse environnementale (TARs, systèmes de filtration d'air et ECS) 10 TAR	135 cas, dont 23 décès.	<i>L. pneumophila</i> sg1	Gilmour <i>et al.</i> , 2007, Henry <i>et al.</i> , 2005
Vic, Espagne. 2005	Culture	5/30 TAR à voie humide testées sur 2 sites A et B (10 ⁴ -10 ⁵ UFC/L et 10 ² -10 ⁴ UFC/L respectivement)	55 cas (3 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg1	Sala <i>et al.</i> , 2007
Pampelona, Espagne. 2006	Binaxnow (Alere) sur échantillons d'eau (non validé mais assumé en raison de l'urgence) Confirmé par culture dans 3 TAR+ une TAR négative en Binaxnow	Analyse environnementale sur 31 tours (+7 fontaines ornementales). 4/31 (13 %) TAR à voie humide positives (10 ³ -10 ⁴ UFC/L)	146 cas avérés	3 TAR avec <i>L. pneumophila</i> sg 1 OLDA, une TAR avec <i>L. pneumophila</i> sg 1 Pontiac (Allentown/France).	Castilla <i>et al.</i> , 2008
Amsterdam, Pays Bas, 2006	Culture	1 TAR positive (5. 10 ⁶ UFC/L)	31 cas répertoriés (3 décès).	<i>L. pneumophila</i> sg 1	Sonder <i>et al.</i> , 2008

Dublin, Irlande. 2008	Culture et PCR	Analyse sur deux TAR : TAR 1 : positive en PCR et négative en culture (sous la LD) en <i>L. spp.</i> , TAR 2 : positive en PCR en <i>L. spp.</i> positive en culture en <i>L. pneumophila</i> (100 UFC)	54 cas suspects (2 Légionelloses détectées et 37 fièvres de Pontiac suspectées).	<i>L. spp</i> et <i>L. pneumophila</i>	Ward <i>et al.</i> , 2010
Ulm et New-Ulm, Allemagne. 2010	Prélèvements de 30 TARs (cooling tower ponds, water inomes, water system of buildings) ISO 11731/1998	Présence de <i>L. pneumophila</i> dans 9/30 TAR A des concentrations de 1 à 92.10 ³ UFC/100 mL	65 cas (dont 5 décès).	Sous-type Knoxville incriminé dans l'épidémie présent dans la TAR la plus contaminée	Von Baum <i>et al.</i> , 2015. Essig <i>et al.</i> 2016
Séoul, Corée du Sud. 2010-2012	Culture et q-PCR (mip et rpoB ⁵)	239 TAR Suivi annuel sur 3 ans (2010 à 2012) 21 % des TAR contaminées	7 à 8 cas par an entre 2006 et 2012. (1 décès en 2011, 3 décès en 2012)	<i>L. pneumophila</i>	Kim C. <i>et al.</i> 2015
Québec, Canada. 2012	Culture	32 TAR	182 cas, 13 décès	<i>L. pneumophila</i> sg1	Lévesque S. <i>et al.</i> 2014
Columbus (OH), USA. 2013	Culture Prélèvement d'une TAR avec un système de désinfection automatique. Eau et biofilms par écouvillonnage prélevés sur le fond et le disperseur au dessus dans une TAR récemment installée. Culture selon recommandations standard. CDC's Legionella recovery procedures (CDC, 2005)	TAR mixte Présence de <i>L. pneumophila</i> dans tous les prélèvements de la TAR	39 cas confirmés dans un établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (6 décès), 2 suspects, et 19 possibles.	<i>L. pneumophila</i> sg1 (MAb-2) ST222 et sg3 ST995. <i>L. dumofii</i>	Quinn <i>et al.</i> , 2015
Warstein, (NW), Allemagne. 2013	Culture	Deux TAR, une station d'épuration et une rivière.	159 cas dont 78 confirmés en laboratoire.	<i>L. pneumophila</i> sg1, Knoxville, (ST) 345	Maisa <i>et al.</i> 2015
Villa Franca de Xira,		4 TAR à voie humide	417 cas, 337 confirmés (dont 12	<i>L. pneumophila</i> sg1	Shivaji T <i>et al.</i> 2014

⁵ rpoB : ARN polymerase B

Portugal, 2014			décès)		
Sydney, Australie. 2016	Prélèvements effectués sur 87 TAR Culture	2 TAR contaminées (> 100 UFC/L)	5 cas	<i>L. pneumophila</i> sg1 génomiquement proche de la souche clinique (whole genome sequencing)	Griffiths <i>et al.</i> 2016. (NSW health, 2016)

3 Description des méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau de TAR

3.1 Méthode par culture

La méthode par culture est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée pour le dénombrement de *Legionella* dans l'eau. En France, c'est la norme AFNOR NF T90-431 qui décrit la méthodologie à suivre afin de rechercher et de dénombrer par culture les bactéries *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila* dans tous les types d'eaux. Depuis les arrêtés du 13/12/2004, la méthode par culture selon la norme NF T90-431 est la méthode préconisée pour les analyses réglementaires de légionelles dans les réseaux d'EDCH, d'eau minérale naturelle et d'eau de TAR. Les seuils réglementaires d'alerte et d'action sur l'ensemble des installations se réfèrent donc aux résultats obtenus par culture lors de l'application de cette norme. Le résultat est exprimé en UFC pour 1 L. La norme AFNOR NF T90-431 a connu plusieurs versions successives depuis sa diffusion initiale (2003 amendée en 2006, 2014 et désormais 2017).

La norme ISO 11731 est une autre norme pour la détection de *Legionella spp.* et *Legionella pneumophila*, produite par l'organisation internationale de normalisation. Utilisable également sur tous les types d'eaux, elle a aussi connu plusieurs versions successives (1998 puis 2017). Elle est utilisée dans divers pays d'Europe et dans le reste du monde. Elle a été reprise et déclinée en 2004 en France sous une partie plus restrictive, la norme NF EN ISO 11731-2, qui n'est applicable qu'aux eaux à faible teneur en bactéries, ce qui exclut son utilisation pour le suivi des TAR.

Le rapport KC concerne des données collectées avant 2016 et donc se réfère à la version amendée en 2006 de la norme NF T90-431 de 2003, ainsi qu'à la version de 1998 de la norme ISO 11731. Le détail de la méthodologie correspondant à ces deux versions est précisé plus avant.

Les normes NF T90-431 et ISO 11731 distinguent dans les traitements les eaux dites « propres » des eaux dites « sales ». Les eaux propres sont définies comme les eaux chaudes sanitaires (ECS), les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), les eaux thermales, les eaux souterraines, les eaux de piscine et assimilées (bains à remous). Les eaux sales correspondent aux eaux industrielles, aux eaux de surface, aux eaux chargées en matières en suspension (MES) et aux eaux des tours aérofrigorantes (TAR).

En pratique, les laboratoires classent les eaux surtout en fonction de leur capacité à être filtrées : les eaux « propres » sont celles pouvant être facilement filtrées (eaux peu chargées en MES) et les eaux « sales » sont celles dont la charge colmate les filtres (eaux chargées en MES non filtrables). Concernant les eaux de TAR, elles peuvent donc être considérées comme des eaux « sales » ou « propres » en fonction du lieu de prélèvement dans le réseau alimentant la TAR. Ce critère est laissé à l'appréciation du laboratoire sans qu'il existe de critère réglementaire à cette appréciation, ce qui est susceptible d'impacter le résultat final de l'analyse.

La norme NF T90-431 a fait l'objet d'essais inter-laboratoires, réalisés notamment par l'association AGLAE. Ces essais ont démontré qu'en dépit de l'utilisation commune de la norme, il a fallu du temps et des efforts pour que les résultats soient fiables. En outre, cette fiabilité reste très relative pour les TAR car elle est très dépendante de la complexité des échantillons. À titre d'exemple d'après les données de reproductibilité communiquées par l'association AGLAE, il existe un rapport de 1 à 32 entre les résultats communiqués par les différents laboratoires lors de l'application de cette norme.

Les modifications apportées⁶ à ces normes ces dernières années pour répondre à des problèmes analytiques sont sans objet dans l'analyse critique du « rapport KC » puisque le traitement des données porte sur des résultats d'analyses réalisées antérieurement à ces modifications.

NF T90-431 de 2003 (amendée en avril 2006) :

- **Prélèvement** de 1 L.
- **Ensemencement direct** : Pour les eaux « propres » et « sales », ensemercer par étalement 0,2 mL d'eau à analyser sur milieu GVPC⁷ (Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide). Pour les eaux « sales », ensemercer par étalement 0,2 mL de la dilution au 1/10 dans de l'eau purifiée ;
- **Concentration par filtration (eaux « propres »)** : Filtrer 1L d'eau prélevée sur une ou deux membrane(s) en polycarbonate puis placer la ou les membrane(s) en polycarbonate dans 1 récipient stérile contenant 5mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée (obtention du **concentrat**). Agiter au moyen d'un vortex pendant le temps défini lors du contrôle de performance ;
- **Concentration par centrifugation (eaux « sales »)** : Après homogénéisation, centrifuger à température ambiante 500 mL d'eau prélevée dans 1 ou 2 récipients stériles à fond conique à environ 30 000 m.s⁻² pendant 30 min ou autre valeur à valider conformément au contrôle de performance. Eliminer le(s) surnageant(s) stérilement par aspiration en veillant à ne pas perturber le(s) culot(s) et en laissant un peu moins de 5 mL du surnageant (si deux récipients ont été utilisés, laisser moins de 5 mL de surnageant au total). Remettre le(s) culot(s) en suspension (et les regrouper si deux récipients ont été utilisés). Ramener le volume à 5 ml avec de l'eau à analyser ou de l'eau purifiée stérile (obtention du **concentrat**) ;
- **Ensemencement du concentrat** : Ensemercer rapidement par étalement 0,1 mL du concentrat obtenu après filtration ou après centrifugation sur une boîte de milieu GVPC. Traiter une partie du concentrat restant par traitement acide (ensemencer rapidement par étalement de 0,2 mL sur une boîte GVPC ou 2 x 0,1 mL sur deux boîtes de GVPC) et une autre par traitement thermique (ensemencer rapidement 0.1 mL sur une boîte GVPC). Traiter une troisième partie par traitement associé (thermique et acide) (ensemencer rapidement par étalement 0,2 mL sur une boîte de milieu GVPC ou 2 x 0,1 mL sur deux boîtes de GVPC ;
- **Incubation** : Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée à 36 ± 2°C durant 8 j à 11 j. Examiner les boîtes au moins à trois reprises à partir du troisième ou quatrième jour d'incubation jusqu'à la fin de la période d'incubation ;
- **Repérage des colonies caractéristiques de *Legionella*** : Sont considérées comme caractéristiques les colonies qui présentent une coloration généralement grise ou blanche le plus souvent avec un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire et un contour de

⁶ Les principales modifications techniques apportées en 2014 à la méthode normalisée par culture concernant uniquement les eaux « propres ». Le changement concernant tous les types d'eaux est relatif à l'identification des colonies de *Legionella*. Il est désormais possible d'utiliser d'autres méthodes d'identification (sous réserve que celles-ci soient certifiées selon un référentiel normatif). Dans la prochaine version de la norme (publication prévue en 2017), il sera désormais possible d'utiliser la q-PCR comme méthode d'identification au lieu du typage par immunofluorescence ou par agglutination au latex en présence d'anticorps anti-*L. pneumophila*. Pour le dénombrement, le nombre minimal de colonies à prendre en compte pour confirmation est désormais de 1 sur la boîte la plus concentrée (auparavant 5), ce qui permet de baisser la limite de quantification à 10 UFC/L (eaux propres) ou 100 UFC/L (eaux sales) en l'absence de flore interférente (au lieu de 250 (eaux propres) ou 500 UFC/L (eaux sales) pour la norme précédente).

⁷ Gélose GVPC : La gélose sélective GVPC pour *Legionella* est destinée au dénombrement, à l'isolement et à la culture des espèces de *Legionella* dans les eaux et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

- couleur variable. Elles peuvent changer d'aspect en vieillissant. Certaines sont fluorescentes sous lampe de Wood (ou équivalent) ;
- **Confirmation et dénombrement des *Legionella*** : Repiquer les colonies caractéristiques dans l'ordre suivant, sur gélose au sang, sur gélose BCYE⁸ (buffered charcoal yeast extract) sans L-cystéine, sur gélose BCYE avec L-cystéine. Incuber à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ et lire entre 2 et 4 j. Sont considérées comme *Legionella* toutes les colonies présentant un aspect caractéristique avec absence de croissance sur milieu BCYE avec L-cystéine ;
 - **Identification des *Legionella pneumophila*** : Tester en vue de la confirmation de l'espèce *Legionella pneumophila* toutes les colonies repiquées confirmées comme *Legionella* non fluorescentes sous lampe de Wood (ou équivalent). Utiliser pour les tests, les cultures obtenues après repiquage sur milieu BCYE avec L-cystéine. Sont considérées comme *L. pneumophila* les colonies précédentes qui sont non fluorescentes sous lampe de Wood ou équivalent et donnent une réaction positive en immunofluorescence ou en agglutination au latex en présence d'anticorps anti-*L. pneumophila*.

ISO 11731 : 1998

- **Prélèvement** de 1 L ;
- **Ensemencement sans concentration** : (si le résultat attendu est $>10^5$ UFC/L) le prélèvement est séparé en trois portions, la première est ensemencée directement (0,1 à 0,5 mL sur une gélose GVPC ou un milieu de Wadowsky et Yee (MWY)⁹), la deuxième subit un chauffage, la dernière subit un traitement acide avant d'être ensemencée ;
- **Ensemencement sans concentration après dilution** : (si l'échantillon contient beaucoup de flore interférente) le prélèvement est dilué puis traité par une combinaison chauffage et acide, avant d'être ensemencé (0,1 à 0,5 mL sur une gélose GVPC ou MWY) ;
- **Concentration par filtration et ensemencement direct** : Filtrer entre 10 mL et 1 L d'eau prélevée sur une membrane en polycarbonate puis placer la membrane directement sur une gélose BCYE supplémentée en antibiotiques ou une gélose GVPC ;
- **Concentration par filtration et lavage de la membrane** : Filtrer entre 10 mL et 1 L d'eau prélevée sur une membrane en polycarbonate puis placer la membrane dans un récipient stérile contenant 5 à 25 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée. Agiter pendant au moins 2 minutes (obtention du concentrat). Alternativement, placer dans un bain à ultrasons entre 2 et 10 minutes ;
- **Concentration par centrifugation** : Après homogénéisation, centrifuger 200 mL d'eau prélevée dans un récipient stérile à fond conique à 6000 g pendant 10 min ou 3000 g pendant 30 min. Eliminer le(s) surnageant(s) stérilement. Remettre le culot en suspension dans 2 à 20 mL avec de l'eau à analyser ou de l'eau purifiée stérile (obtention du concentrat) ;
- **Ensemencement du concentrat** : Séparer le concentrat en 2 portions, la première est ensemencée directement (0,1 à 0,5 mL sur une gélose BCYE supplémentée en antibiotiques ou GVPC), la deuxième subit un chauffage avant d'être ensemencée ;

⁸ Les géloses BCYE et BCYE sans cystéine, sont destinées à la confirmation des colonies obtenues sur la gélose GVPC, elle-même utilisée pour les dénombrement et isolement des espèces de *Legionella* dans les eaux et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

⁹ Le milieu MWY est un milieu sélectif qui a pour base la gélose BCYE supplémentée en polymyxine B, Anisomycine, Glycine et Vancomycine

- **Incubation** : Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée à 36 +/- 2°C durant 7 à 10 j ;
- **Confirmation et dénombrement des *Legionella*** : Repiquer les colonies caractéristiques sur gélose BCYE sans L-cystéine et gélose BCYE avec L-cystéine. Incuber à 36 +/- 2°C pendant au moins 2 j. Sont considérées comme *Legionella* toutes les colonies présentant un aspect caractéristique avec absence de croissance sur milieu BCYE avec L-cystéine ;
- **Identification des *Legionella*** : L'espèce de *Legionella* peut être identifiée par diverses méthodes (un protocole de la méthode par immunofluorescence est décrit comme exemple).

Limites des méthodes par culture :

La méthode par culture ne permet pas de détecter les bactéries non cultivables ni les bactéries internalisées dans des protozoaires ou vésicules externes de ces protozoaires (Dietersdorfer *et al.*, 2016).

Cette méthode est fortement impactée par la présence de flore interférente. Le temps de génération de *Legionella* étant important, sur gélose les colonies peuvent être recouvertes par la flore contaminante à croissance plus rapide. Elles sont alors difficilement reconnaissables à l'œil nu et nécessitent un repiquage sur milieu sélectif pour confirmer leur identification.

La méthode préconisée par la norme ISO 11731, propose une étape de concentration par filtration qui n'est pas appropriée à l'analyse d'eaux à forte teneur en MES, ce qui est généralement le cas des eaux de TAR alimentées en eaux de rivière.

Ces limites sont résumées dans le tableau présenté en annexe 2.

3.2 Méthodes basées sur l'amplification génique

3.2.1 Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (q-PCR)

La méthode par polymérisation en chaîne en temps réel, dite méthode par q-PCR, est une méthode de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. En France, c'est la norme Afnor NF T90-471 qui décrit la méthodologie à suivre afin de rechercher et de dénombrer par q-PCR les bactéries *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* dans tous les types d'eaux. Cette méthode n'est pas réglementaire et ne possède donc pas de seuils d'alerte et d'action définis dans la réglementation. L'Anses a suggéré dans son rapport de 2011 des valeurs potentiellement utilisables à cet effet, mais ces dernières n'ont pas été reprises jusqu'ici par le législateur. La méthode par q-PCR selon la norme NF T90-471 est néanmoins couramment utilisée pour la surveillance des réseaux d'eau chaude et des TAR en complément de la méthode par culture. D'un point de vue général, la méthode par q-PCR consiste en la mesure d'un signal de fluorescence émis lors de chaque cycle d'amplification de l'ADN, lequel sera proportionnel, dans la zone de linéarité de cette amplification, à la quantité d'ADN présent dans le tube de réaction au moment de la mesure. L'apparition d'un signal mesurable est dépendante de la quantité d'ADN cible de *Legionella* présent initialement dans l'échantillon. Le cycle de quantification (C_q) est le cycle auquel est effectuée la mesure. Il permet de déterminer cette quantité initiale.

La norme AFNOR NF T90-471 a été révisée à plusieurs reprises depuis sa diffusion en 2006 (révisions 2010 et 2015).

NF T90-471 (avril 2010 utilisée dans l'étude) :

- **Prélèvement** de 50 mL à 1 L ;
- **Concentration** de l'échantillon par filtration sur membranes de polycarbonate de porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm ;

- **Extraction par lyse cellulaire et purification de l'ADN.** L'ADN purifié est remis en suspension dans une solution garantissant la stabilité de l'ADN et la qualité de la qPCR ;
- **Amplification de l'ADN par q-PCR :** la norme laisse toute liberté sur la méthodologie de qPCR utilisée, en revanche elle fixe des critères de performance à valider quelque soit la technique retenue. Ces critères sont définis pour les kits commerciaux par le « protocole de validation pour les méthodes commerciales de détection et de dénombrement de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction en chaîne de polymérisation (PCR) », révision 1, (version adoptée en janvier 2011 par AFNOR Certification). Le choix de l'appareillage est également libre ;
- **Détection quantitative** qui doit permettre l'identification et la quantification des amplicons spécifiques du genre *Legionella* et/ou spécifiques de l'espèce *L. pneumophila*. La quantification n'est possible que pour des valeurs de concentrations d'ADN comprises dans la gamme d'étalonnage. La spécificité doit être assurée par l'utilisation de sondes spécifiques fluorescentes.

Limites des méthodes par q-PCR :

L'étape d'extraction d'ADN reste le point faible de la méthode par qPCR en raison des variabilités entre les kits et méthodes internes d'extraction, du faible rendement de récupération de l'ADN dans les eaux très chargées en MES, ainsi que des inhibitions de l'étape d'amplification de la q-PCR dues à une mauvaise purification de la matrice ADN (Touron-Bodilis *et al.*, 2011).

L'avancée technologique des dernières années concerne le développement de kits pour l'extraction de l'ADN spécifiques pour les eaux chargées (TAR). Toutefois, la variabilité reste importante en dépit de leur existence. La chaîne d'étalonnage mise en place depuis 2010 a permis également de réduire l'incertitude sur le résultat en améliorant la justesse. Cependant, des variations perdurent, selon la méthode utilisée, car cet étalonnage ne prend pas en compte le rendement de l'extraction et la norme actuelle ne décrit pas de contrôle d'extraction pour chaque échantillon.

Interrogé sur ce point faible, l'organisme de comparaison inter laboratoire AGLAE fait remarquer qu'il n'existe pas de contrôle interne standardisé mis en place au niveau national de l'extraction, par exemple une souche de *Legionella* délétée du gène *mip*, qui permettrait d'effectuer un contrôle global de la méthode (prise en compte des étapes de concentration, d'extraction et de réaction de q-PCR). Cette approche permettrait de mieux maîtriser l'incertitude et a été utilisée pour la mesure des virus par exemple (Prevost *et al.*, 2015).

Une limite de la méthode par q-PCR est sa sensibilité aux inhibiteurs. Ceux-ci peuvent trouver leur origine dans l'échantillon analysé, dans les composants ajoutés lors de l'extraction (en particulier pour les méthodes internes) et parfois jusque dans le type de plastique utilisé tout au long du processus d'analyse. L'introduction de contrôle d'inhibition a permis toutefois de détecter efficacement leur présence.

De nombreuses études et protocoles de préparation de l'échantillon et d'extraction de l'ADN sont disponibles dans le but d'obtenir le meilleur rendement possible, tout en limitant l'inhibition lors de la réaction de q-PCR. Par exemple, l'utilisation d'un prétraitement de l'échantillon par séparation immunomagnétique permet une meilleure purification et donc de limiter les inhibitions (Yáñez *et al.*, 2005 ; Díaz-Flores *et al.*, 2015).

L'usage de colonnes de type « PCR inhibitor removal » (Zymo Research) après extraction a également permis à certains auteurs de limiter les inhibitions lors de l'usage de q-PCR (Prevost *et al.*, 2016). D'autres colonnes ou méthodes de filtration ont été proposées pour éliminer les inhibiteurs après l'extraction. Il est possible de citer de façon non exhaustive Nucléospin, Centricon, *etc.* (Hudlow, 2016). Certains auteurs ont également montré que, dans le cadre des

échantillons environnementaux chargés, le choix de la polymérase est un point essentiel à la limitation de ce phénomène (Wurtzer *et al.*, 2014).

Comme pour beaucoup de méthodes de biologie moléculaire basées sur l'amplification de génome, la détection de *Legionella* par PCR quantitative s'est toujours heurtée à la question des bactéries « vivantes » ou des bactéries « mortes » détectées de façon indifférenciée par la q-PCR. En effet, l'ADN des bactéries mortes, qu'elles soient intactes ou non, est susceptible d'être amplifié au même titre que celui des bactéries vivantes entraînant une surestimation.

3.2.2 Autres méthodes d'amplification génique

De nombreux auteurs et études ont tenté de dépasser la limitation de la méthode par q-PCR vis-à-vis de la détection des bactéries mortes, et deux approches se sont développées en parallèle :

- (i) l'utilisation de la RT-q-PCR qui cible alors les ARN, dont la durée de vie est bien plus courte que celle des ADN ;
- (ii) l'utilisation d'agents chimiques tels que l'éthidium monoazide (EMA) ou le propidium monoazide (PMA) afin de discriminer les micro-organismes intacts de ceux dont la membrane n'est plus complètement fonctionnelle et donc considérés comme morts.

Pour des raisons techniques (difficulté à extraire et conserver des ARNm sans dégradation importante, non reproductibilité de l'expression, *etc.*), la seconde approche, connue sous le nom de PCR de viabilité (viability PCR, vPCR, EMA-PCR, PMA-PCR), est souvent préférée.

Les agents chimiques EMA et PMA ont la capacité de s'intercaler entre les bases nucléiques au sein de la double hélice d'ADN (d'où le nom d'intercalant). Leur interaction avec les acides nucléiques est stabilisée par une photoactivation, rendant par la suite impossible l'amplification des acides nucléiques par la PCR. Ainsi, d'un point de vue théorique, les micro-organismes viables qui présentent une membrane cytoplasmique non perméable aux agents intercalants peuvent toujours être détectés par amplification génique, même après traitement PMA ou EMA. En revanche, les micro-organismes non viables qui présentent une membrane perméabilisée aux agents intercalants ne seront pas détectés. En pratique, de nombreuses précautions doivent être prises quant à l'interprétation des résultats, les monoazides entraînant parfois une inhibition de la PCR et donc une sous-estimation de la concentration et même parfois de faux négatifs. C'est pourquoi ces intercalants doivent être éliminés lors de l'étape d'extraction des acides nucléiques. De nombreux auteurs ont montré l'importance de ces contrôles lors de la mise au point de méthode utilisant l'EMA et le PMA. Ces méthodes ont été employées pour la détection moléculaire de nombreux micro-organismes notamment des mycobactéries et des *Pseudomonas* (Lee *et al.* 2015 ; Kralik *et al.*, 2015 ; Kralik *et al.*, 2010 ; de Assunção *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2014 ; Pribylova *et al.*, 2012 ; Gensberger *et al.*, 2014 ; Gensberger *et al.*, 2013 ; Kaushik *et al.*, 2013 ; Karim *et al.*, 2015 ; Leifels *et al.*, 2015 ; Moreno *et al.*, 2015 ; Bonetta *et al.*, 2017).

Plusieurs auteurs ont également appliqué cette approche à *Legionella* (Yáñez *et al.*, 2009 ; Chang *et al.*, 2009 ; Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2009) et ont obtenu des résultats intéressants. Les échantillons traités ont permis de diminuer le seuil de détection pour la quantification moléculaire de *Legionella*, sans toutefois permettre une correspondance parfaite avec les résultats obtenus avec la méthode par culture. Un article récent met en évidence que le traitement PMA fait directement sur la membrane de filtration semble plus efficace que le traitement fait après concentration totale de l'échantillon. Il est à noter que cette différence peut tout aussi bien être attribuée à la méthode de dénombrement par culture qui présente également des biais. En revanche, pour les échantillons complexes tel que, par exemple, les extraits de biofilms, plusieurs études (Inoue *et al.*, 2015 ; Taylor *et al.*, 2014) sembleraient montrer que l'action attendue des agents intercalants est inhibée, probablement par la forte quantité d'acides nucléiques présente dans l'échantillon ou d'autres agents complexants présents dans la matrice.

Une démarche d'intercalibration entre plusieurs laboratoires, menée en Italie, a démontré la reproductibilité de la méthode de v-PCR utilisant de l'EMA tout en soulignant l'impossibilité de discriminer les bactéries viables des bactéries non viables dans le cas d'un traitement thermique

(Scaturro *et al.*, 2016). D'autres auteurs démontrent aussi que les résultats diffèrent en fonction du type de traitement utilisé pour la désinfection. Ainsi, les traitements UV basse pression n'ont qu'une faible influence sur les membranes et ont plutôt une action sur le génome, par création de dimères de thymine. Ils rendent donc la méthode vPCR moins pertinente (Scaturro *et al.*, 2016 ; Wuertz *et al.*, 2009 ; Prévost *et al.*, 2016).

Dans une analyse comparative sur la quantification moléculaire de *Legionella* spp dans des échantillons environnementaux, certains auteurs montrent que les valeurs obtenues sont plus faibles par une approche v-PCR que par q-PCR (Ditommaso *et al.*, 2014). Sur la base de ces résultats, ils proposent un seuil d'alerte à $2,7 \cdot 10^5$ UG/L pour *Legionella* spp que les auteurs font correspondre au seuil d'alerte de 10^4 UFC/L des lignes directrices italiennes pour les eaux de d'établissements de soin.

L'usage de la vPCR demeure limité à des fins de recherche, et reste sans application au sein des laboratoires d'analyse accrédités. Aucune norme concernant cette méthode n'a pour l'instant été établie et actuellement, la société espagnole GenUIL est la seule à commercialiser un kit de diagnostic q-PCR pour *Legionella* spp indiqué comme étant validé v-PCR.

4 Analyse du rapport KC relatif à la détermination de seuils de gestion pour la méthode q-PCR dans les tours aéroréfrigérantes humides

Le rapport KC résulte d'une analyse comparée de données de terrain de concentration en *Legionella pneumophila* obtenues par la méthode utilisant la q-PCR et par la méthode par culture auprès d'acteurs utilisant ces deux méthodes conjointement pour la gestion de leurs installations. Le traitement des données recueillies a conduit les auteurs du rapport KC à proposer des seuils de gestion (seuils d'alerte et seuils d'action) pour la méthode par q-PCR.

Ces seuils ont ensuite été appliqués pour effectuer un suivi de différentes TAR. Ils ont été considérés comme pertinents par les auteurs du rapport KC lorsque les actions qu'ils induisent sont cohérentes avec celles induites par les seuils réglementaires définis avec la méthode par culture.

4.1 Données exploitées

Les résultats de dénombrement de *L. p.* obtenus conjointement par les méthodes par culture et par q-PCR dans les différents circuits de TAR ont été collectés auprès :

- d'exploitants de sites industriels ou tertiaires (principalement des circuits de climatisation). Les auteurs distinguent dans le rapport les installations alimentées par de l'EDCH de celles alimentées par de l'eau de rivière tout comme celles pour lesquelles l'eau de refroidissement est directement en contact ou non avec le procédé ;
- du laboratoire du Ministère de la Santé du Québec. Les données sont issues d'une étude menée pendant les périodes de mai-juin 2013 et septembre-décembre 2013 suite à une épidémie détectée par des cas groupés survenue au Québec en 2012. Tous les circuits de l'étude étaient alimentés par de l'EDCH dont la qualité est stable ;
- de la société CLIMESPACE qui a réalisé en 2008 une étude relative au relargage du biofilm d'un circuit de TAR dans l'eau et de comparer les résultats de différents indicateurs d'analyses (culture, q-PCR, amibes libres, flore mésophile, ATP, biofilm + paramètres physico-chimiques) selon différentes configurations : phase de colonisation, effet des « chocs biocides », dans la durée, effet du tensioactif selon les conditions de mise en œuvre, effet d'un arrêt hydraulique.

Au total 744 paires de données ont été collectées (figure 3):

- 695 données ont été obtenues selon la norme NFT90-431 et 49 selon la norme ISO 11731 pour les résultats issus de la méthode par culture ;
- 132 données ont été obtenues avec le système d'extraction et d'analyse d'ADN Biorad, 586 avec le système d'extraction et d'analyse Pall Gensystem, 26 par une méthode développée en interne par un laboratoire accrédité pour les résultats donnés par q-PCR.

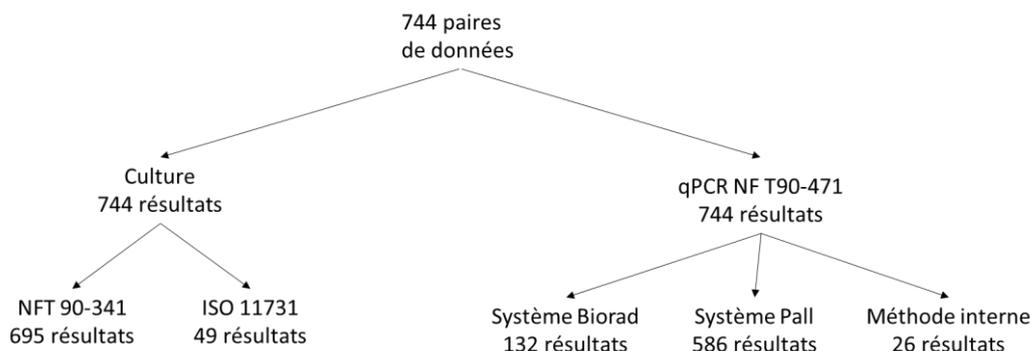


Figure 3 : présentation des données selon les méthodes analytiques utilisées.

Le GT :

- note que l'un des auteurs du rapport KC a été associé directement à la production d'un des jeux de données analysé et présenté dans le dit rapport ;

- constate que le jeu de données est hétérogène comprenant des données issues de prélèvements environnementaux (français et canadiens) et d'autres obtenues dans une unité pilote de laboratoire ;

- regrette :

- l'absence de distinction entre ces deux jeux de données dans le traitement qui leur est appliqué. Certaines installations sont alimentées en EDCH et d'autres en eau de rivière. La localisation des points de prélèvements permettant d'évaluer une éventuelle hétérogénéité n'est pas indiquée. Aucune indication n'est fournie sur l'intervalle de temps entre le prélèvement et le dernier traitement appliqué dans la TAR, le type de traitement ainsi que la charge en MES des eaux prélevées ;

- qu'aucune donnée de performance des laboratoires ayant réalisé les analyses ne soit décrite ;

- note que le rapport KC fait état de données obtenues à partir de deux normes différentes (NF T 90-431 et ISO 11731) pour la méthode par culture. Bien que la proportion des données correspondant à chacune des méthodes soit précisée, l'ensemble des données est associé comme s'il s'agissait d'une méthode unique (« la méthode par culture ») alors qu'il s'agit de deux méthodologies potentiellement distinctes. Le rapport KC ne tient pas compte du possible impact de la proportion de ces deux méthodes dans l'analyse subséquente. Le GT considère que le regroupement des résultats obtenus selon deux normes est susceptible d'augmenter la variabilité des données car la norme ISO 11731 fait notamment appel à la filtration, laquelle n'est pas recommandée pour les eaux à forte teneur en MES, ce qui est généralement le cas des eaux de TAR alimentées par des eaux de rivière ;

- remarque que deux kits commerciaux différents ainsi qu'une méthode interne ont été utilisés pour l'obtention des données q-PCR. Ces deux kits d'extraction présentent des rendements assez différents. Or peu d'informations relatives aux méthodes d'extraction de l'ADN utilisées par les

laboratoires figure dans le rapport¹⁰. Il en est de même concernant le rendement de la méthode interne. Bien que la proportion des données correspondant à chacune des méthodes soit indiquée, l'ensemble des données est regroupé comme s'il s'agissait d'une méthode unique (« la méthode par qPCR ») alors qu'il s'agit de trois méthodologies potentiellement distinctes. Le GT considère que le regroupement des résultats obtenus selon ces trois méthodologies est susceptible d'augmenter la variabilité des données, en raison notamment de la variabilité des rendements d'extraction, mais aussi de possibles différences dans les jeux d'amorces, la sonde, le type de polymérase et les conditions de cycle utilisées lors de l'étape d'amplification.

Points à retenir

Le mode d'obtention du jeu de données est très hétérogène et insuffisamment caractérisé. Les résultats obtenus en application de méthodes de dénombrement selon des normes différentes pour la culture ou avec des kits et méthodologies différents pour la q-PCR sont traités chacun comme un seul groupe de données. Une des méthodes utilisées n'est pas recommandée pour les eaux de TAR (ISO 11731). Les biais relevés ne sont pas pris en compte de manière suffisante dans la présentation des données et dans les analyses qui s'en suivent.

4.2 Traitement des données

Le rapport KC présente un traitement qualitatif et un traitement quantitatif des données recueillies. Le traitement qualitatif vise à estimer les performances de la méthode q-PCR (tous kits ou méthode interne confondus) vis-à-vis des méthodes basées sur la culture tandis que le traitement quantitatif conduit les auteurs du rapport KC à déterminer des seuils de gestion pour la méthode par q-PCR des circuits des TAR. Pour chaque seuil déterminé la concordance entre les deux méthodes, et la conséquence en termes de décisions de gestion, a été évaluée.

4.2.1 Étude qualitative

Pour l'analyse qualitative, le rapport KC fait état de 667 paires de données conservées sur les 744 initiales. Ont été retenus pour cette analyse, les prélèvements dont les résultats de dénombrement comportaient des informations sur les LD et LQ. Ont ainsi été éliminées 77 paires de données (46 au titre de la méthode par culture et 31 au titre de la méthode par q-PCR) : soit $744-77=667$ paires restantes.

Sur ces 667 restantes, seuls 7 échantillons étaient négatifs pour les deux méthodes de dénombrement (doubles négatifs).

¹⁰ Les informations les plus précises ont été fournies par le laboratoire canadien qui a indiqué que seul le système PALL (pack environnement 1, système PALL V3) a été utilisé pour extraire l'ADN des échantillons d'eau et que les analyses par culture ont toutes été effectuées selon la norme NF T90-431. Les méthodes et kits utilisés par les autres laboratoires pour l'extraction d'ADN ne sont pas précisés.

Le GT :

- note l'inclusion des données issues du pilote dans le jeu de données retenues pour l'étude qualitative (cf 4.1 données exploitées) ;
- constate que pour réaliser le traitement qualitatif des données, les auteurs du rapport KC ont utilisé la méthode de dénombrement par culture (méthode réglementaire) comme référence. Ce choix n'est pas assorti d'une analyse critique de cette méthode. En effet, compte tenu des données à leur disposition d'une part, et suite à l'audition des représentants de l'association AGLAE d'autre part, le GT estime que la méthode par culture n'est pas sans faille, notamment en raison d'un rendement faible, de l'impact que peut représenter la présence de flore interférente sur la lisibilité des résultats et de la cultivabilité variable de *Legionella* sur les milieux de laboratoire.

L'analyse qualitative a été abordée de façon similaire à la mise en œuvre d'un essai de dépistage biologique. Ont donc été définies pour la q-PCR les valeurs suivantes :

- Les vrais positifs (résultats positifs pour les deux méthodes) ;
- Les vrais négatifs (résultats négatifs pour les deux méthodes = doubles négatifs) ;
- Les faux positifs en q-PCR (culture négative, q-PCR positive) ;
- Les faux négatifs en q-PCR (culture positive, q-PCR négative) ;
- La valeur prédictive positive de la q-PCR (VPP : doubles positifs/Total q-PCR positive) ;
- La valeur prédictive négative de la q-PCR (VPN : doubles négatifs/ Total q-PCR négative) ;
- La sensibilité de la q-PCR (doubles positifs/ Total culture positive) ;
- La spécificité de la q-PCR (doubles négatifs/ Total culture négative).

Le GT

- considère que l'usage des termes « vrais positifs » et « faux positifs » devrait être évité car ces termes font référence au fait que le résultat obtenu par une des méthodes est exact et que toute discordance avec ce résultat, s'il existe, est une erreur. Les termes « double positif », « double négatif », « simple positif par PCR » et « simple positif par culture » devraient être préférés car ils ne sont pas entachés de subjectivité ;
- note que les données considérées comme positives sont celles supérieures aux seuils déduits des figures présentées dans le rapport KC, respectivement de 750 UFC/L pour la méthode par culture et de 500 UG/L pour la méthode par q-PCR ;
- s'interroge sur les critères ayant conduit à retenir ces seuils de positivité ;
- notent également que l'étude de Lee *et al.* (2011) à laquelle il est fait référence dans le rapport KC utilise des seuils de positivité de 750 UFC/L et 750 UG/L respectivement pour les deux méthodes.

Tableau V : Tableau croisé des principaux résultats obtenus par culture et q-PCR et paramètres de validité intrinsèque en référence à la culture présentés dans le rapport KC

		Résultats par culture <i>L.p</i> (UFC/L)		
		Cultures positives	Cultures négatives	Valeurs prédictives
Résultats q-PCR	q-PCR positive	37%	22%	VPP : 63%
<i>L.p</i> (UG/L)	q-PCR négatives	1%	40%	VPN : 97%
		Sensibilité 97%	Spécificité 65%	

L'analyse produite dans le rapport KC montre que *Legionella pneumophila* est détectée par les deux méthodes dans 37 % des cas et n'est pas détectée par les deux méthodes dans 40 % des cas. La q-PCR permet de détecter *L. p.* quand la culture est négative dans 22 % des cas. Une valeur négative de la q-PCR signale dans une grande majorité des cas (97 %) une valeur de culture négative. Mais la réciproque (VPN de la culture) n'est vraie que dans deux tiers des cas (65 %). Une valeur positive de q-PCR est en revanche difficilement prédictive d'une évolution similaire de l'indicateur par culture 63 % de VPP. La réciproque (VPP de la culture par rapport à la q-PCR) est nettement plus élevée (97 %).

Le GT considère que ces différences se justifient car les deux méthodes ne mesurent pas la même chose, comme l'indique leur sensibilité et spécificité différentes. Ceci a clairement été montré dans le rapport de l'Agence de 2011¹¹.

D'après les calculs effectués à partir des données à leur disposition, les auteurs du rapport KC concluent que la spécificité de la méthode q-PCR est de 0,65 et la sensibilité de 0,97. Les auteurs indiquent que la technique par q-PCR est « peu spécifique ».

Le GT :

- rappelle que les faux positifs sont ici décrits par rapport à la technique par culture, qui est connue pour présenter une sensibilité faible (cf. partie 3.1 méthode par culture). En effet, les données présentées montrent que la sensibilité de la culture est ici de 0,63 par rapport à la q-PCR. Mais ces « faux-positifs » peuvent être en réalité des « faux-négatifs » de culture. En effet, Reyrolles et al. (2008) signalent que : « la présence d'un signal positif en PCR et d'une culture négative peut indiquer la présence de légionelles VBNC (bactérie viable mais non-cultivable) ou de légionelles LLAP (*Legionella Like Amoebal Pathogen*) » ;

- considère que les conclusions du rapport sur la sensibilité élevée et la valeur prédictive négative de la q-PCR sont justifiées en prenant la culture comme méthode de référence. En revanche, le pourcentage élevé de simples positifs en q-PCR (appelés par les auteurs « faux-positifs ») doit être nuancé par le rendement variable et généralement faible (de 10 à 30 %) de la méthode par culture et la présence possible de *Legionella pneumophila* viables non cultivables ;

- note que si le contrôle d'inhibition est réalisé sur chaque échantillon pour la méthode par q-PCR, il n'est pas réalisé systématiquement pour la méthode par culture ;

¹¹ Anses. (2011). Méthode de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. (Saisine 2009-SA-330). Maisons-Alfort : Anses, 144 p.

- remarque qu'il peut être réalisé le même tableau en considérant non pas la culture mais la q-PCR comme référence. Cette analyse aboutira à des conclusions parfaitement symétriques, à savoir une très bonne spécificité de 97 % de la technique par culture, mais une faible sensibilité de 63 % seulement.

Point à retenir

Les données du pilote auraient dû être retirées de l'analyse car elles ont été obtenues en condition de laboratoire, conditions très différentes des conditions de terrain. Les deux méthodes n'ont pas bénéficié de la même analyse critique. L'étude qualitative aboutit néanmoins aux mêmes conclusions que la littérature sur le sujet : la q-PCR possède une meilleure sensibilité que la culture et donne donc parfois des résultats positifs pour des échantillons négatifs en culture. Ceci s'explique par le mesurande de chaque méthode qui est différent, mais induit des difficultés d'interprétation des résultats par l'exploitant s'il cherche à mettre en parallèle les résultats obtenus par deux méthodes. En effet celles-ci ne sont pas comparables ainsi que l'a démontré le rapport de l'Anses de 2011.

4.2.2 Étude quantitative

L'objectif du traitement quantitatif est de déterminer une concordance d'actions à préconiser, en fonction des valeurs cibles fixées pour la q-PCR et les seuils réglementaires pour la culture. Pour cette partie de l'étude, les données antérieures à 2011 (date de mise en place de l'étalonnage de référence) ont été écartées de l'analyse .

Le GT approuve le retrait de ces données du traitement quantitatif, mais signale que l'ADN étalon ne permet pas toutefois de standardiser l'étape d'extraction d'ADN précédant la q-PCR qui reste source de variabilité importante pour des échantillons difficilement filtrables comme le sont les eaux de TAR, en raison notamment de leur charge en MES élevée.

Sur la base d'un jeu de 499 paires de données normalisées, l'approche réalisée dans le rapport KC a consisté dans un premier temps à établir des courbes de distributions à partir des écarts entre les valeurs logarithmiques des résultats obtenus par culture et par q-PCR pour chaque jeu de données ($\log_{qPCR} - \log_{culture}$). Cette méthodologie a été développée par Lee *et al.* (2011). Menée par 7 laboratoires provenant de 6 pays différents (Angleterre, Allemagne (2), Espagne, France, Italie et Suisse), la méthodologie proposée par Lee *et al.* consiste à comparer les paires de données dont les résultats sont supérieurs à la limite de quantification pour les deux méthodes de dénombrement. Pour chaque laboratoire, 6 installations (idéalement 3 TAR et 3 systèmes d'eau chaude sanitaire (ECS)) identifiées pour avoir été infectées par *L. p.* par le passé ont été évaluées au moins une fois par semaine sur un minimum de 6 semaines. Chaque prélèvement a été réalisé selon la norme ISO 19458:2006. Le résiduel éventuel de biocide oxydant dans l'échantillon a été neutralisé au thiosulfate de sodium et l'analyse effectuée dans les 24 h. Le volume de prélèvement était de 2 litres pour l'ECS ou 500 mL pour les TAR. Chaque échantillon a été scindé en deux pour une analyse en parallèle en q-PCR et en culture. Chaque mesure a été effectuée en duplicat (deux ADN et deux ensemencements). L'extraction d'ADN a été réalisée sur l'appareil GeneExtract (Pall GeneSystems : pack environnement 1, système PALL V3) et la q-PCR à l'aide du système Pall Genedisc Cyler certifié AFNOR T90-471 (kit *Legionella* DUO GeneDisc). La culture a été réalisée selon la norme NF EN ISO 11731 en s'assurant que le volume analysé était comparable à celui traité en q-PCR (soit 6,7 mL pour les TAR et 27 mL pour les systèmes d'ECS). L'ensemble des données représente 232 échantillons de TAR et 506 échantillons d'EDCH froide/chaude. Par ailleurs, la fiabilité des données de chaque laboratoire a été évaluée par le biais d'une étude circulaire comprenant deux échantillons d'ADN standardisés de *L. p. sg1* (ATCC 33152) à 10^2 et 10^3 UG/puits, respectivement ainsi que deux échantillons d'eauensemencés par 2.10^4 et 2.10^5

UFC L⁻¹ de *L. p. sg1* (ATCC 33152) respectivement. Le nombre de paires positives par les deux méthodes représentait 15,5 % des échantillons (36/232) pour les TAR et 30,4 % (154/506) pour les systèmes d'ECS.

Dans le cadre du rapport KC, les résultats des écarts ont été rangés par classe de 0,5 log. Au sein de chaque classe, une valeur moyenne a été calculée, permettant de placer le point sur l'axe des abscisses. Le nombre de points dans la classe sur le nombre de point exploités permettait d'avoir la fréquence (le pourcentage) et de positionner le point sur l'axe des ordonnées.

Les 232 données analysées dans l'étude de Lee *et al.* (2011) concernant les TAR sont toutes des « doubles positifs » (positives par culture et par q-PCR). Le rapport KC dispose de 102 paires de données doubles positifs (figure 4). Afin d'augmenter la taille de leur échantillon, les auteurs du rapport KC ont décidé d'ajouter aux « doubles positifs » les « simples positifs ». Ils ont donc traité ensemble toutes les données dont les résultats sont supérieurs ou égaux au seuil de quantification pour au moins une méthode de dénombrement. Cela représente 248 paires de données sur les 499 données originelles, un chiffre proche des 232 traités par Lee *et al.* (2011). Toutefois, il est à noter que généralement, ce sont les résultats obtenus par q-PCR qui sont supérieurs au seuil de quantification. Pour expliquer ce déséquilibre, les auteurs de l'étude ont évoqué, lors de leur audition, leur difficulté à collecter des résultats positifs en culture.

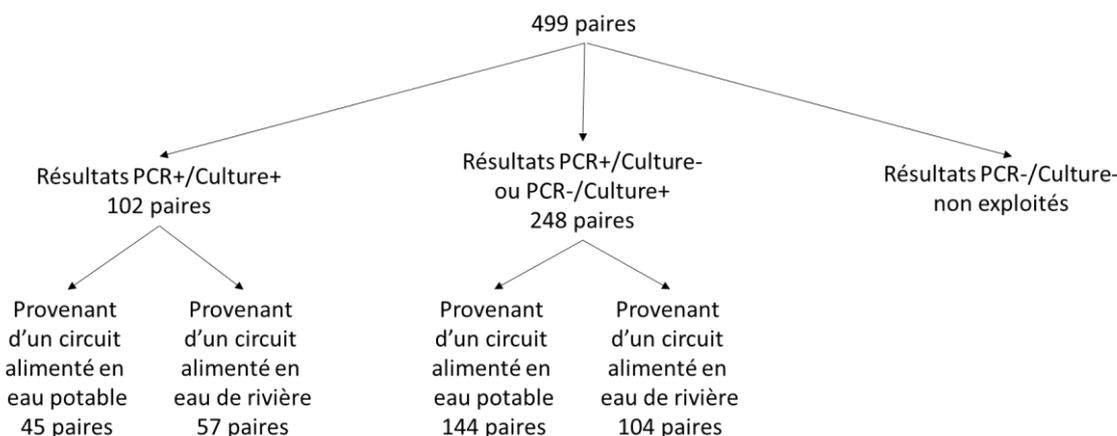


Figure 4 : présentation de la répartition des données utilisées pour déterminer des valeurs cibles de q-PCR.

Ces courbes ont permis d'établir les seuils de gestion considérés pour la suite de l'étude KC. quatre seuils ont été déduits du pic des écarts (écart le plus fréquemment rencontré ou de l'écart moyen observé) sur chaque jeu de données considéré :

- deux seuils estimés en considérant seulement toutes les valeurs doubles positives ;
- deux seuils estimés en considérant toutes les valeurs simples et doubles positives.

Les 4 seuils retenus ainsi que les seuils proposés par l'Anses en 2011 ont été ensuite appliqués au jeu de données complet et aux données scindées en fonction de l'origine de l'eau d'appoint des sites concernés (EDCH ou eau de rivière) (cf 4.3).

Les auteurs du rapport KC ont considéré que le meilleur compromis a été établi pour une différence de seuil de 1,1 log entre les deux méthodes, ce qui correspond à un seuil d'alerte d' $1,3 \cdot 10^4$ UG/L et un seuil d'action d' $1,3 \cdot 10^6$ UG/L. Ils indiquent que ces valeurs sont supérieures à celles proposées par le rapport de l'Anses (2011). Pour mémoire, les seuils préconisés par l'Agence en 2011 pour la méthode q-PCR étaient de $5 \cdot 10^3$ UG/L pour le seuil d'action et $5 \cdot 10^5$

UG/L pour le seuil d'arrêt respectivement, soit une différence de seuil de 0,5 log entre les deux méthodes.

Les auteurs du rapport KC concluent que les valeurs cibles fixées pour la q-PCR (en UG/L) à partir de l'analyse des résultats n'induisent pas une concordance d'actions avec les seuils réglementaires pour la culture (en UFC/L).

Le GT

- constate que les données disponibles pour la méthode par culture sont plus nombreuses à être négatives ou inférieures à la limite de quantification. Il considère que cela introduit un biais lors de l'estimation des seuils basés sur l'ensemble des valeurs simples et doubles positives et donc empêche d'apprécier correctement la validité des seuils proposés par le rapport KC. Il regrette que ce biais n'ait pas été mentionné plus clairement dans le rapport KC et n'ait pas été suffisamment pris en compte dans ses conclusions ;

- considérant que le rapport KC indique utiliser la méthodologie exposée par Lee *et al.* (2011), note néanmoins de nombreuses différences entre la-dite méthodologie et celle présentée dans le rapport KC:

- concernant la fiabilité des laboratoires, Lee *et al.* (2011) ont pris soin de réaliser une étude préliminaire circulaire permettant de s'assurer de l'homogénéité inter-laboratoire des résultats; les données présentées dans le présent rapport n'intègrent pas une étude similaire ou à défaut des éléments suffisants permettant d'apprécier cette homogénéité ;

- concernant la q-PCR, Lee *et al.* (2011) utilisent une seule technique q-PCR standardisée et un seul kit d'extraction d'ADN. Ce n'est pas le cas dans les données collectées ;

- concernant la culture, Lee *et al.* (2011) utilisent une méthode par culture normalisée, ce qui n'est pas le cas dans l'étude analysée (néanmoins il est à noter que l'étude de Lee utilise la norme ISO 11731, qui laisse la possibilité de concentrer par filtration ou centrifugation les échantillons d'eaux provenant de tours aéroréfrigérées ce qui serait susceptible d'introduire des différences de rendement de la méthode culture) ;

- concernant le niveau de validation internationale, Lee *et al.* (2011) utilisent des valeurs issues de laboratoires de 6 pays. La présente étude se limite à deux ;

- concernant les valeurs utilisées pour l'étude quantitative (détermination des seuils de qPCR), Lee *et al.* (2011) ne considèrent que les paires de données double positives (positives simultanément en culture et en q-PCR) dans son analyse. La présente étude retient toutes les valeurs positives dès lors qu'elles le sont au moins pour une des deux techniques ;

- considère que les méthodologies de Lee *et al.* (2011) et celle du rapport KC sont trop différentes pour permettre une analyse comparative de leurs résultats respectifs ;

- par rapport au nombre de données utilisées dans l'étude de Lee *et al.*, considère que 102 paires de données diminuent la robustesse du traitement statistique. Le déséquilibre dans l'origine des « simples positifs » introduit un biais conséquent dans l'échantillon et fausse les résultats de l'analyse ;

- considère comme très discutable le choix de changer la façon de traiter les données par rapport à l'étude de Lee *et al.* (2011) si l'objectif avéré est de comparer les deux séries de résultats ;

- considère également que le fait d'abaisser le critère de sélectivité pour augmenter la taille de l'échantillon de données n'est pas une façon éprouvée et approuvée par les statisticiens pour améliorer la valeur prédictive d'une étude ¹² ;

12 ENV ISO 13843 (2001) Qualité de l'eau - Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques

- remarque que les seuils retenus dans le rapport KC ont été acquis dans des conditions différentes de l'étude de Lee *et al.*, à partir de circuits différents, avec des méthodologies non identiques. Il est donc pas étonnant que les seuils soient différents.

Afin d'affiner les premiers résultats, les auteurs du rapport KC ont ensuite séparé les résultats obtenus pour les sites alimentés en EDCH de ceux obtenus pour les circuits alimentés en eau de rivière. Ceci représente :

- Pour l'EDCH, 45 jeux de données supérieurs ou égaux pour les deux méthodes, 144 pour au moins une méthode ;
- Pour les eaux de rivière, 57 jeux de données supérieurs ou égaux pour les deux méthodes et 104 pour au moins une méthode.

Le GT note que la partition, même si elle est absolument nécessaire, est dommageable à l'analyse car elle diminue de manière très significative la taille de l'échantillon et donc par la même sa valeur représentative.

Le même traitement que précédemment a été appliqué. Le calcul des écarts pour les sites alimentés en EDCH montre une différence de 1,7 log lorsque les résultats sont supérieurs aux LQ pour les deux méthodes et de 0,8 log dans le cas de résultats supérieurs aux LQ pour au moins une méthode. Pour les sites alimentés par de l'eau de rivière, le calcul des écarts n'a pas permis aux auteurs du rapport KC de distinguer une valeur représentative de la majorité des échantillons lorsque les résultats étaient supérieurs aux LQ pour les deux méthodes. Les auteurs ont donc retenu la valeur de l'écart moyen de 1,1 log. Il en est de même lorsque les résultats étaient supérieurs aux LQ pour au moins une méthode. Dans ce cas l'écart moyen retenu par les auteurs du rapport KC est de 1,3 log.

Les auteurs du rapport KC concluent que, contrairement aux circuits alimentés par de l'EDCH, les actions correctives induites par la q-PCR pour les circuits alimentés par de l'eau de rivière, lorsque les résultats sont inférieurs au seuil d'alerte par culture, sont cohérentes avec celles induites par la culture pour 50 à 53,2 % des échantillons. En cas de résultats supérieurs au seuil d'alerte pour la culture, la cohérence des actions n'est alors valable que dans 47 à 59 % des cas.

Par manque de données, il n'a pas été possible de comparer la cohérence des actions lorsque le seuil d'arrêt était dépassé.

Le GT :

- note que la cohérence d'action n'a été estimée que sur le seuil d'alerte. Le rapport KC présente, avec les mêmes chiffres (75% de concordance, 25% de non concordance) une conclusion à l'opposé de celle proposée par l'étude de Lee *et al.* (2011). Les auteurs du rapport KC soutiennent en effet que 25 % de non-concordance est un pourcentage trop élevé pour considérer les deux méthodes comme équivalentes. À l'inverse, l'étude de Lee *et al.* (2011) publiée et expertisée par des pairs indique, que 75 % de concordance est une valeur suffisante pour considérer une équivalence entre les deux méthodes. Le rapport KC ne justifie pas cette divergence de vue ;

- s'interroge sur les éléments qui ont conduit les auteurs du rapport KC à une conclusion opposée à celle de Lee *et al.* (2011) ;

- considère que, eu égard à la collecte des échantillons, la méthodologie de traitement et l'ensemble des biais relevés, la non concordance annoncée dans le rapport KC est infondée. Seul le fait de disposer de conditions d'évaluation plus homogènes permettrait d'obtenir une conclusion fiable. Ces conditions ne sont pas réunies dans le rapport KC ;

- note par ailleurs la difficulté de disposer d'un échantillon de taille suffisante pour comparer des résultats de culture et de q-PCR. Cette difficulté est visible dans le petit nombre des données doubles positives (102/744).

Concernant les résultats inférieurs au seuil d'alerte « par culture », mais supérieurs au seuil d'alerte « par q-PCR », les auteurs en concluent que la q-PCR « soit surestime le risque, soit elle le détecte mieux ». Un signal de q-PCR accru par rapport à la culture peut provenir de plusieurs causes, telles que la présence de bactéries viables non cultivables (BVNC) ou encore de bactéries mortes mais de structure cellulaire intacte, dont l'ADN est toujours présent dans le réseau. Les bactéries mortes et intactes induisent effectivement une surestimation du risque lors de l'analyse q-PCR.

À l'inverse, la détection par q-PCR des BVNC témoigne d'un risque potentiel accru car elles sont susceptibles d'être réactivées de diverses manières, notamment par exemple lors de leur internalisation par des amibes, un processus qui permet une multiplication intra-amibienne. Le niveau de risque est susceptible de croître de manière peu prévisible et parfois significative en fonction du moment et de l'intensité de cette réactivation.

À l'inverse, en examinant les résultats supérieurs au seuil d'alerte en culture, mais inférieurs au seuil d'alerte en PCR, les auteurs estiment que la q-PCR « sous-estimerait le risque » sans pour autant souligner la possibilité que ce soit la culture qui surestime ledit risque. La sous-estimation du risque par la q-PCR pourrait effectivement résulter d'une inhibition du signal par excès d'ADN (par exemple, en cas de trop forte concentration d'ADN de *Legionella*) ou en raison de la présence de molécules exogènes interférant avec la réaction d'amplification (inhibiteurs). La surestimation du risque par la culture pourrait résulter de la forte incertitude associée aux résultats de la culture lorsque les eaux sont très chargées (MES, bactéries, etc.). En effet, l'audition des représentants de l'association AGLAE a permis de constater une grande dispersion des résultats de la culture réalisée à partir d'échantillons d'eaux chargées en MES lors des études inter-laboratoires. Comme signalé plus avant, il n'est pas effectué de contrôles systématiques d'inhibition dans les méthodes par culture.

Points à retenir :

Le rapport KC indique utiliser la méthodologie exposée par Lee *et al.* (2011). Néanmoins, il existe des différences multiples entre la méthodologie de Lee *et al.* et celle présentée dans le rapport KC (intercalibration des laboratoires, variation des méthodes, etc.). La méthodologie du rapport KC présente également une anomalie majeure dans la constitution de l'échantillon initial de l'analyse (conservation des simples positifs). Les résultats obtenus par ces deux méthodologies ne sont donc pas comparables. L'utilisation du même jeu de données hétérogènes pour fixer des seuils en impacte négativement la fiabilité. En dernier lieu, les conclusions émises sur la base des résultats du traitement quantitatif à propos de la concordance ou non des méthodes, sont en contradiction avec celles obtenues par Lee *et al.* avec les mêmes valeurs de concordance (75% de concordance) sans pour autant que cette prise de position soit argumentée.

4.3 Suivi des installations

Dans la dernière partie de l'étude, les auteurs du rapport KC ont souhaité utiliser les valeurs cibles déterminées précédemment et débouchant sur des actions de gestion identiques pour gérer plusieurs TAR (uniquement celles avec au moins 5 points de données) : 10 TAR alimentées par de l'EDCH et 4 alimentées en eaux de rivière.

L'observation des résultats de la surveillance des TAR alimentés en EDCH montre une grande variabilité dans la cohérence entre les actions induites par les valeurs cibles fixées pour la q-PCR et celles induites par les seuils réglementaires de la culture. La même variabilité est observée lors du suivi des installations alimentées par de l'eau de rivière.

Les auteurs du rapport KC expriment une difficulté à piloter des actions curatives à partir des seuils q-PCR qu'ils ont fixés en raison de cette non-concordance. Ils indiquent que, à leur sens, le pilotage et le suivi réglementaire des installations par q-PCR n'est pas envisageable en l'état (« ainsi pour l'ensemble des installations, ..., il n'apparaît pas possible de définir des valeurs applicables à la q-PCR de manière à ce que le taux de résultats supérieurs à ces valeurs cibles, ..., soit équivalent pour la culture et pour la q-PCR. »). Ils s'inquiètent par ailleurs du risque de surutilisation de biocides qui accompagnerait un suivi des TAR par la méthode q-PCR. Ils considèrent en effet que « par rapport à la culture, la q-PCR surestime le risque soit elle le détecte mieux ». Ils ont toutefois indiqué, lors de leur audition, leur recommandation de tenir compte d'un résultat positif par q-PCR pouvant indiquer selon eux une dérive dans la maîtrise du circuit, et nécessite donc une analyse plus précise pour savoir ce qui pourrait être à la source de ce dysfonctionnement. En effet, seul un double négatif (culture + qPCR) serait de nature à écarter sans ambiguïté toute suspicion.

Le GT :

- note que le suivi a été effectué sur un nombre réduit de TAR et estime que la plus grande prudence est de mise dans les conclusions qui en découlent. Concernant la méthodologie suivie, les auteurs du rapport KC n'indiquent pas si le point de prélèvement des différents échantillons est constant pour les deux méthodes de dénombrement de *Legionella pneumophila*, ni à quel moment a été réalisé le prélèvement par rapport aux traitements biocides réguliers. Le GT souligne que ces deux éléments sont de nature à influencer le résultat obtenu ;
- note que les graphiques illustrant le suivi des installations introduisent une valeur arbitraire de LQ chaque fois qu'une valeur positive n'a pu être déterminée. Il note que sur certains circuits, une seule valeur parmi les dix représentées est supérieure à la LQ vraie, toutes les autres étant ramenées à cette LQ ;
- souligne que le suivi a été matérialisé graphiquement par des points, ce qui maximise visuellement les écarts observés. Cette représentation graphique n'est pas pertinente au regard de la question posée ;
- considère, en ce qui concerne le pilotage des actions, que la difficulté à piloter les actions curatives aurait été la même si la q-PCR avait été la méthode réglementaire, la difficulté se situant dans la non-concordance des méthodes. Cette absence de concordance ne permet pas de préjuger qu'une méthode soit meilleure que l'autre ;
- concernant le risque de sur-consommation de biocides, souligne que des résultats de q-PCR positifs (présence d'ADN de *L. pneumophila*) et de culture négatifs (absence de colonies sur les milieux utilisés) sont susceptibles de refléter un risque sanitaire réel. Il n'est donc pas en mesure de statuer sur la position des auteurs du rapport KC.

Points à retenir :

Le nombre de TAR suivi est faible et les paramètres de suivi sont insuffisamment documentés. Les résultats montrent une non-concordance entre les méthodes sans qu'il soit possible de l'attribuer à la qualité intrinsèque de l'une d'entre elles. Les difficultés d'interprétation, en termes d'actions de gestion, sont directement liées à cette non-concordance.

5 Conclusions

5.1 Conclusions de l'étude Kosanti-Capsis

L'étude KC avait pour objectif d'évaluer la possibilité de déterminer des seuils de gestion par la méthode q-PCR *Legionella pneumophila* qui aboutirait à des actions de gestion similaires à celles de la méthode par culture dans le contexte de la gestion des TAR des ICPE.

L'étude KC conclut en différents points du rapport qu'il n'est pas possible, au vu des données à disposition, de définir des valeurs applicables à la q-PCR de manière à ce que les actions induites soient cohérentes avec celles induites par les résultats de la culture sur une même série de prélèvements. Ils estiment toutefois possible de gérer des circuits de TAR sur la base des profils des résultats d'analyse q-PCR. Mais ceci implique de ne pas chercher à mesurer l'efficacité de cette gestion à l'aune de la culture, mais plutôt à celle des résultats sanitaires.

Par ailleurs, le rapport KC indique que : « *La part de variabilité des résultats dépend directement de la méthode d'analyse et du laboratoire d'analyse. Ainsi l'interprétation du résultat d'analyse en temps réel peut être parfois délicate. En effet c'est sur la base d'un résultat d'analyse ou sur la seule tendance que sur la seule tendance qu'une série d'échantillon affiche que l'exploitant décide des actions à mener.* ».

Enfin les auteurs de l'étude KC soulignent qu'en cas de crise « *il apparait utile de demander la réalisation de l'analyse de Legionella pneumophila selon les deux méthodes* ».

5.2 Avis du groupe de travail sur le rapport d'étude Kosanti et Capsis

L'étude KC ne correspond pas à une analyse métrologique rigoureuse telle que suggérée par l'agence dans son rapport relatif aux méthodes de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau, de 2011 car elle procède d'une agrégation *a posteriori* de données disparates et non d'une collecte de données issues d'un protocole précis fixé *ab initio* et maîtrisé de bout en bout, avec prise en compte des contrôles et précautions nécessaires.

L'approche analytique utilisée dans le rapport KC est celle d'un exploitant devant interpréter des données provenant des mesures de *L. pneumophila* par q-PCR. Elle consiste à vérifier si les décisions de gestion prises avec cette méthode sont comparables à celles prises en utilisant la méthode actuellement réglementaire. Toutefois, la réponse à cette question dépend largement de l'homogénéité et de la fiabilité des données brutes sur lesquelles repose l'analyse. Elle implique également une prise en compte rigoureuse des défauts et qualités des deux méthodes et une maîtrise de leurs dérives respectives.

La conclusion du rapport KC sur l'impossibilité de proposer des seuils de gestion pour la méthode de dénombrement par q-PCR est en adéquation avec les informations sur les données à disposition des auteurs. Toutefois, le GT signale que l'hétérogénéité des données et les incertitudes associées rendent cette conclusion discutable. En effet, il n'est pas certain que la conclusion de cette étude aurait été identique si les données avaient été davantage contrôlées en amont.

En l'absence de quantification du risque avéré (cas de légionellose), l'ensemble de ces données ne fait que confirmer le biais respectif de ces deux méthodes, qui avait déjà été identifié dans l'article de Lee *et al.* (2011) et dans le rapport de l'Anses de 2011.

Cette étude pointe néanmoins la difficulté de piloter les installations pour maîtriser le risque de développement de *Legionella*. La diversité des installations fait que leur gestion quotidienne doit être adaptée à chacune d'elle. Ceci a été confirmé lors de l'audition des auteurs qui ont expliqué la complexité de fonctionnement des différents types de circuits. C'est, selon eux, un équilibre qui doit être recherché, entre la maîtrise du risque *Legionella* (circuit maîtrisé avec des résultats d'indicateurs conformes) et l'utilisation de biocides pour arriver à cette maîtrise. Il n'est pas question pour les auteurs du rapport KC de mettre en œuvre des mesures telles que des chocs biocides à chaque fois que l'indicateur ne serait pas conforme, mais plutôt d'inciter les exploitants à rechercher l'origine de l'apparition ou du relargage de *Legionella* dans le réseau. Le GT fait remarquer que c'est toutefois ce qui est fait jusqu'ici lorsque le seuil d'action en culture est dépassé.

Enfin, le GT souligne qu'à l'heure actuelle, il reste difficile de corréler les concentrations de *Legionella pneumophila* détectées avec un risque infectieux. Les seuils de prévention réglementaires ont été fixés de manière empirique (O'Brien et Bhopal, 1993) sur la base des données de la littérature qui présentaient des cas de légionellose liés à des TAR dont les niveaux de concentration en UFC/L de *Legionella* étaient connus. À l'époque, la maîtrise de la technique par culture n'était pas ce qu'elle est aujourd'hui. Pourtant, malgré les incertitudes associées, il est apparu nécessaire de fixer des seuils pour maîtriser le risque. Des données équivalentes pour la méthode par q-PCR ne sont actuellement pas disponibles. L'indicateur n'en est pas moins intéressant et le GT recommande donc la poursuite des travaux afin de fixer des seuils de gestion pour la méthode par q-PCR.

5.3 Propositions du groupe de travail sur la détermination de seuils de gestion des TAR par q-PCR

Pour fixer des seuils avec la plus grande justesse, une étude dont tous les paramètres seraient maîtrisés doit être mise en place. Elle nécessitera un audit préalable du ou des laboratoire(s) impliqué(s) afin de s'assurer de l'homogénéité des résultats. En cas d'implication de plusieurs laboratoires une étude circulaire, dans l'esprit de celle réalisée par Lee *et al.* en préambule à son étude de 2011 serait nécessaire.

Impératifs :

Il faut comparer les résultats des deux méthodes par type d'installation (puissance de la tour, eau d'alimentation, type de tour, *etc.*) et/ou par points de prélèvements sur le circuit de la TAR :

- les résultats de culture sur une période donnée (pendant au moins une année) et comparer les actions réalisées suite à ces résultats ;
- les résultats de q-PCR au cours de la même période et comparer les actions qui auraient été entreprises en se basant sur les seuils proposés par l'Anses en 2011 et évaluer le nombre d'actions similaires et lorsque que le nombre/importance de l'action est différente, étudier plus en détail les raisons de cette différence.

Un projet basé sur la réalisation d'une étude pré-définie peut être proposée sur la base de ces impératifs. Doivent être définis :

- les différents types d'installations (TAR à circuit ouvert ou fermé) / qualité de l'eau d'appoint (eau de rivière, EDCH ou autre) / complexité du réseau (matériaux, présence de biofilm / fonctionnement continu ou ponctuel) / caractéristiques du traitement (selon le type de désinfectant/ ajout en continu ou seulement en cas d'alerte);

- la nature des traitements (en continu à titre préventif ou après alerte à titre curatif) et les conditions d'application en essayant d'évaluer les différents traitements les plus employés soit par une étude sur site soit sur une TAR pilote en conditions plus maîtrisables ;
- les caractéristiques des prélèvements (lieux de prélèvement au sein du réseau et temps par rapport au traitement choc) ;
- les méthodes d'analyse :
 - (A) pour la culture, laboratoire respectant les normes NF T90-431 ou ISO 11731 : demander une analyse unique selon la méthode « eaux sales ».
 - (B) pour la q-PCR, laboratoire respectant les normes NF T90-471 ou ISO/TS 12869 – demander l'utilisation d'une méthode unique d'extraction avec témoin d'extraction.

6 Bibliographie

6.1 Normes

AFNOR (2014). NF T90-431 Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation

ENV ISO 13843 (2001) Qualité de l'eau - Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques

ISO/TS 12869 (novembre 2012) Qualité de l'eau -- Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR).

ISSO-Publicatie 55.3 Legionellapreventie in koeltorens en luchtbevochtigers (2014). (*Legionella* : Prévention dans les installations climatiques)

NF EN ISO 11731 (juillet 2008) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella* - Partie 2 : méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries. AFNOR (indice de classement T90-430).

NF EN ISO 19458 (novembre 2006) Qualité de l'eau - Échantillonnage pour analyse microbiologique. AFNOR (indice de classement T90-480).

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

VDI-Standard: VDI 4250 (2015) Bioaerosols and biological agents environmental health assessment of bioaerosols in ambient air. Risk assessment for aerosols containing *Legionella*.

6.2 Publications

► Articles scientifiques

Addiss D.G., Davis J.P., Laventure M., *et al.* (1989) Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. American Journal of Epidemiology, vol 130 (3) : p 557-568.

Addiss D.G., Davis J.P., Wand P.J., *et al.* (1989) Two Cases of Community-Acquired Legionnaires' Disease: Evidence for Association with a Cooling Tower. The Journal of Infectious Diseases. vol 159 (3) : p 572-575.

Ad-Hoc Committee (1986) Outbreak of Legionellosis in a Community. Report of an Ad-hoc committee. Lancet, vol 2 (8503) : p380-383.

Alonso J.P. (2004). Community outbreak of Legionnaires' disease related to hospital cooling towers in Zaragoza, Spain, May-June 2004. Eurosurveillance, vol 8(33).

Al-Matawah Q., Al-Zenki S., Al-Azmi A. *et al.* (2015). *Legionella* detection and subgrouping in water air-conditioning cooling tower systems in Kuwait. Environmental Science and Pollution Research, vol. 22 : p 10235-10241.

- de Assunção T.M., Batista E.L. Jr, Deves C., *et al.* (2014). Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. *Tuberculosis (Edinb)*, vol 94 (4) : p 421-427.
- Armstrong T., Haas C. (2008). Legionnaires' disease: evaluation of a quantitative microbial risk assessment model. *Journal of Water and Health*, vol 6 : p 149–166.
- Armstrong T. W., Haas C. N. (2007a). A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: animal model selection and dose-response modeling. *Risk Analysis*, vol 27 : p 1581–1596.
- Armstrong T. W., Haas C. N. (2007b). Quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: assessment of human exposures for selected spa outbreaks. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, vol 4 : p 634–646.
- Bell J. C., Jorm L. R., Williamson M., *et al.* (1996). Legionellosis linked with a hotel car park how many were infected. *Epidemiology and Infection*, vol 116 : p 185-192.
- Blystad H, Bjorlow E, Aavitsland P, *et al.* (2001). Outbreak of legionellosis in Stavanger, Norway – final report. *Eurosurveillance*, vol 5 (47).
- Blystad H, Brantsæter A.B., Løvoll Ø. (2005). Outbreak of community-acquired Legionnaires' disease in southeast Norway, May 2005. *Eurosurveillance*, vol 10 (21).
- Bonetta S., Pignata C., Bonetta S., *et al.* (2017). Viability of *Legionella pneumophila* in Water Samples : A Comparison of Propidium Monoazide (PMA) Treatment on Membrane Filters and in Liquid. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol 14: p467-474.
- Brown C. M., Nuorti P. J., Breiman R. F., *et al.* (1999). A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: An epidemiological method to calculate dose of exposure. *International Journal of Epidemiology*, vol 28 : p353-359.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., *et al.* (2009). The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical chemistry*, vol. 55 (4) : p 611-629.
- Castellani Pastoris M., Ciceroni L., Lo Monaco R. *et al.* (1997). Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol 16 (12) : p 883-892.
- Castilla J., Barricarte A., Aldaz J. *et al.* (2008). A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality. *Epidemiology and Infection*, vol 136 : p 823 – 832.
- Chang B., Sugiyama K., Taguri T., *et al.* (2009). Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75 (1) : p 147-53.
- Cordes L.G., Fraser D.W., Skaufy. P, *et al.* (1980). Legionnaires' disease outbreak at an Atlanta, Georgia, country club : evidence for spread from an evaporative condenser. *American Journal of Epidemiology*, vol 111 (4) :p. 425-431
- Cordes L.G., Goldman W.D., Marr J.S., *et al.* (1980). Legionnaire's disease in New York City, August-September 1978. *Journal of Urban Health : Bulletin of the New York Academy of Medicine* vol 56 (5) : p 467-482.
- Delgado-Viscogliosi P., Solignac L., Delattre J.M. (2009). Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75 (11) : p. 3502-3512.
- Dennis P.J., Bartlett C.L.R., Wright A.E. (1984) Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In: Thornsberry C, Balows A, Feeley JC, Jakubowski WJ, eds. *Legionella*. Proceedings of the

2nd international symposium, Atlanta, 1983. Washington DC: American Society of Microbiology, p 294-296.

Dietersdorfer E., Cervero-Aragó S., Sommer R. (2016). Optimized methods for *Legionella pneumophila* release from its Acanthamoeba hosts. *Bio Med Central Microbiology*, vol. 16 (74) : p 1-10.

Díaz-Flores A, Montero JC, Castro FJ. (2015) Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology*, vol. 15 (91) : p. 1-9.

Dilger T., Melzl H., Gessner A. (2016). Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 127 : p. 154-159.

Ditommaso S., Ricciardi E., Giacomuzzi M. *et al.* (2014). Overestimation of the *Legionella* spp. load in environmental samples by quantitative real-time PCR : pretreatment with propidium monoazide as a tool for the assessment of an association between *Legionella* concentration and sanitary risk. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 80 (4) : p. 260-266.

Dondero T.J. J.R., Rendtorff R.C., Mallison G.F., *et al.* (1980) An outbreak of Legionnaires' Disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower *The New England Journal of Medicine*, vol 302 (7) : p.365-370.

Essig A., von Baum H., Gonser T., *et al.* (2016). Microbiological diagnosis and molecular typing of *Legionella* strains during an outbreak of legionellosis in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 306 (2) : p.109-114.

Fiore A. E., Nuorti J. P., Levine O. S., *et al.* (1998) Epidemic Legionnaires' disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *Clinical Infectious Diseases*, vol 26 (2) : p 426-433.

Formica N., Tallis G. F., Zwolak B., *et al.* (2000). Legionnaires' disease outbreak: Victoria's largest identified outbreak. *Communicable Diseases Intelligence*, vol 24 (7) : p199-202.

Fraser D. W., Tsai T. R., Orenstein W., (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, vol 297: 1189 – 1197.

Friedman S., Spitalny K., Barbaree J., *et al.* (1987) Pontiac Fever Outbreak Associated with a Cooling Tower. *American Journal of Public Health*, vol 77 (5) : p. 568-572.

Gaia V., Casati S., Tonolla M. (2011). Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 34 (1) : p. 40-44.

Garbe P. L., Davis B. J., Weisfeld J. S., *et al.* (1985) Nosocomial Legionnaires' disease. Epidemiologic demonstration of cooling towers as a source. *The Journal of the American Medical Association*, vol 254 (4) :p 521-524.

Garcia de Olalla P., Gracia J., Rius C., *et al.* (2008). Community outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila*: importance of monitoring hospital cooling towers. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, vol 26(1) : p.15-22 (Esp.)

Garcia-Fulgueiras A., Navarro C., Fenoll D., *et al.* (2003). Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, vol 9(8) : p.915 – 921.

Gensberger E.T, Polt M., Konrad-Köszler M., *et al.* (2014). Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. *Water Research*, vol 67 : p 367-376.

Gensberger E.T., Sessitsch A, Kostić T. (2013). Propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction for viable *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* detection from abundant background microflora. *Analytical Biochemistry: Methods in the Biological*, vol 441 (1) : p 69-72.

- Gilmour M.W., Bernard K., Tracz D.M. *et al.* (2007). Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *Journal of Medical Microbiology*, vol 56 : p 336-341.
- Gorman G.W., Barbaree J.M., Feeley J.C (1983). Procedures for the recovery of *Legionella* from water, in *Developmental Manual*. Atlanta, Centers for Disease Control, p 2-3.
- Greig J. E., Carnie J. A., Tallis G. F., *et al.* (2004) An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *The Medical Journal of Australia*, vol 180 (11): p.566-572.
- Henry B., Young J. G., Walker D. (2005). Report of the expert panel on the Legionnaires' disease outbreak in the City of Toronto - September/October 2005.
- Hudlow W.R. (2016). NucleoSpin(®) XS Columns for DNA Concentration and Clean-Up. *Methods. Molecular Biology*, vol (1420) : p 125-129.
- Hugosson A., Hjorth M., Bernander S., *et al.* (2007). A community outbreak of Legionnaires' disease from an industrial cooling tower: assessment of clinical features and diagnostic procedures. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol 39(3) : p.217-224.
- Hunt D. A., Cartwright K. A. V., Smith M. C., *et al.* (1991) An outbreak of Legionnaires' disease in Gloucester. *Epidemiology and Infection*, vol 107 : p133-141.
- Inoue Y., Iwamoto A , Inoue A. *et al.* (2015) Establishment and characterization of new human cell lines for recombinant therapeutic protein production. *BMC Proceedings*, vol. 9 (Suppl 9) : p. 1-3.
- Jansà, J.M., Caylà, J.A., Ferrer D., *et al.* (2002) An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: Importance of the first 24 hours in the investigation. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol 6(9) : p.831-838.
- Karim M.R., Fout G.S., Johnson C.H. (2015). Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *Journal of Virological Methods*, vol. 219 : p. 51-61.
- Kaushik R., Balasubramanian R.. (2013) Discrimination of viable from non-viable gram-negative bacterial pathogens in airborne particles using propidium monoazide-assisted qPCR. *Science of the Total Environment.*, vol 449 : p 237-243.
- Kim C, Jeon S, Jung J, *et al.* (2015). Isolation of *Legionella pneumophila* From Cooling Towers, Public Baths, Hospitals and Fountains in Seoul, Korea, from 2010 to 2012. *Journal of Environmental Health*, vol. 77 (6), p. 58-62.
- Kim Y.J., Lee S.M., Park B.K., *et al.* (2014). Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens. *Annals of Laboratory Medicine*, vol 34 (3) : p 203-209.
- Kirrage D., Reynolds G., Smith G.E., *et al.* for the Hereford Legionnaire' Outbreak Control Team (2007). Investigation of an outbreak of Legionnaires' disease: Hereford, UK 2003. *Respiratory Medicine*, vol 101(8) : p.1639-1644.
- Klaucke D. N., Vogt R. L., Larue D., *et al.* (1984). Legionnaires' disease: the epidemiology of two outbreaks in Burlington, Vermont, 1980, *American Journal of Epidemiology*, vol 119 (3) : p. 382-391.
- Kool J.L., Buchholz U., Peterson C., *et al.* (2000). Strengths and limitations of molecular subtyping in a community outbreak of Legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection*, vol 125 : p 599-608.

- Kralik P., Nocker A., Pavlik I. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *International Journal of Food Microbiology*, vol 141 Suppl 1: p 80-86.
- Kralik P., Babak V., Dziedzinska R. (2014). Repeated cycles of chemical and physical disinfection and their influence on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability measured by propidium monoazide F57 quantitative real time PCR. *The Veterinary Journal*, vol 201 (3) : p 359-364.
- Leifels M., Jurzik L., Wilhelm M. (2015). Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 218 (8) : p. 686-693.
- Lévesques S., Plante P.L., Mendis N. *et al.*, (2014). Genomic characterization of a large outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains in Quebec City, 2012. *Plos One*, vol. 9 (8) : p. 1-10.
- Lee J.V., Lai S., Exner M. *et al.* (2011). An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 110 : p. 1302-1044.
- Lee E.S., Lee M.H., Kim B.S. (2015). Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, vol 210 : p 143-148.
- Li L., Qin T., Li Y., *et al.* (2015). Prevalence and Molecular Characteristics of Waterborne Pathogen *Legionella* in Industrial Cooling Tower Environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol.12 (10) : p. 12605-11267.
- Lim W.S., Slack R., Goodwin A., *et al.* (2003). Community-acquired Legionnaires' Disease in Nottingham – too many cases? *Epidemiology and Infection*, vol 131 :p. 1097-1103.
- Luna H. V., Aledon R. M., Moran F. G., *et al.* (2005). Outbreak of legionnaires' disease in Torrevieja, Spain, November-December 2005. *Eurosurveillance*, vol 10 (51).
- Maisa A., Brockmann A., Renken F., *et al.* (2015). Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013. *Euro Surveillance*, vol. 20 (46) : p. 1-9.
- Mitchell E., O'Mahony M., Watson J. M., *et al.* (1990). Two outbreaks of Legionnaires' disease in Bolton Health District. *Epidemiology and Infection*, vol 104 (2) :p. 159-170.
- Moreno L., Aznar R., Sánchez G. (2015). Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, vol.18 (201) : p. 1-6.
- Morris G.K., Patton C.M., Feeley J.C., *et al.* (1979). Isolation of the Legionnaires' Disease Bacterium from Environmental Samples. *Annals of Internal Medicine*, vol 90 : p. 664-666.
- Morton S., Bartlett C.L.R., Bibby L.F., *et al.* (1986). Outbreak of legionnaires' disease from a cooling water system in a power station. *British Journal of Industrial Medicine*, vol 43 : p. 630-635.
- Nguyen T. M. N., Ilf D., Jarraud S., *et al.* (2006) A community-wide outbreak of Legionnaires' disease linked to industrial cooling towers: How far can contaminated aerosols spread? *Journal of Infectious Diseases*, vol 193: p.102-111.
- Nordström K, Kallings I, Dahnsjö H., *et al.* (1983). An outbreak of Legionnaires' disease in Sweden: report of sixty-eight cases. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, vol 15(1) :p.43-55.
- Nygaard K., Werner-Johansen O., Ronsen S., *et al.* (2008) An outbreak of Legionnaires' disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway *Clinical Infectious Diseases* ,vol 46(1) : p.61-69.

- O'Brien S., Bhopal R. (1993). Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *Lancet*, vol 342 : p 5–6. 10.1016/0140-6736(93)91877-O
- O'Mahony M., Lakhanf A., Stephens A., *et al.* (1989). Legionnaires' disease and the sick-building syndrome. *Epidemiology and Infection*, vol 103 : p. 285-292.
- O' Mahony M. C., Stanwell-Smith R. E., Tillett H. E., *et al.* (1990). The Stafford outbreak of Legionnaires' disease, *Epidemiology and Infection*, vol 104 : p.361 – 380.
- Pelaz C., García L., Martín Bourgon C. (1992). Legionellae isolated from clinical and environmental samples in Spain (1983–1990): monoclonal typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Epidemiology and Infection*, vol (108) : p 397-402.
- Politi B. D., Fraser D. W., Mallison G. F., *et al.* (1979). A major focus of Legionnaires' disease in Bloomington, Indiana. *Annals of internal medicine*, vol 90 (4) : p 587-591.
- Prevost B., Goulet M., Lucas F.S. *et al.* (2016). Viral persistence in surface and drinking water : suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research*, vol 91 : p 68-76.
- Pribylova R., Kubickova L., Babak V., *et al.* (2012). Effect of short- and long-term antibiotic exposure on the viability of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis as measured by propidium monoazide F57 real time quantitative PCR and culture. *The Veterinary Journal*, vol 194 (3) : p 354-360.
- Quinn C., Demirjian A., Watkins L. F., *et al.* (2015). Legionnaires' Disease Outbreak at a Long-Term Care Facility Caused by a Cooling Tower Using an Automated Disinfection System—Ohio, 2013. *Journal of Environmental Health*, vol . 78 (5) : p. 8-13.
- Reyrolle M., Jarraud S., Étienne J. (2008). Détection des légionelles dans l'eau. Signification du signal PCR. *European journal of water quality*, vol 39 (1) : p 11-12.
- Rota M.C., Pontrelli G., Scaturro M., *et al.* (2005) Legionnaires' disease outbreak in Rome, Italy. *Epidemiology and Infection*, vol 133 (5) : p. 853-859.
- Sabria M., Alvarez J., Dominguez A., *et al.* (2006). A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol 12 : p.642-647.
- Sala M. R., Arias C., Oliva J. M., *et al.* (2007). Community outbreak of Legionnaires' disease in Vic-Gurb, Spain in October and November 2005. *Eurosurveillance*, vol 12(3) : p. 48-50.
- Scaturro M., Fontana S., Dell'eva I., *et al.* (2016). A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect *Legionella* in water samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 85 (3) : p. 283-288.
- Scheikl U., Tsao H.F., Horn M., *et al.* (2016). Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers : a 1-year routine screening. *Journal of Parasitology Research*, vol. 115 (9) : p. 3365-3374.
- Shivaji T., Sousa Pinto C., San-bento A. (2014). A large community outbreak of Legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, October to November 2014. *Eurosurveillance*, vol.19 (50) : p. 1-4.
- Sonder G. J., van den Hoek J. A., Bovée L. P., *et al.* (2008) Changes in prevention and outbreak management of Legionnaires' disease in the Netherlands between two large outbreaks in 1999 and 2006. *Eurosurveillance*, vol 13 (38).
- Taylor M.J., Bentham R.H., Ross K.E. *et al.* (2014). Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples. *Microbiology Insights*, vol 7 : p. 15-24.

Timbury M.C., Donaldson J.R., McCartney A. C., *et al.* (1986). Outbreak of Legionnaires' disease in Glasgow Royal Infirmary: microbiological aspects. *The journal of hygiene, Cambridge*, vol 97: p 393-403.

Touron-Bodilis A., Pougard C., Frenkiel-Lebossé H., (2011). Usefulness of real-time PCR as a complementary tool to the monitoring of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* by culture in industrial cooling systems. *Journal of Applied Microbiology*, vol.111 (2) : p. 499-510.

Von Baum H., Härter G., Essig A., *et al.* (2010). Preliminary report: outbreak of Legionnaires' disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009 - January 2010, *Eurosurveillance*, vol 15 (4).

Ward M., Boland M., Nicolay N., *et al.* (2008) A Cluster of Legionnaires' Disease and Associated Pontiac Fever Morbidity in Office Workers, Dublin, June-July 2008. *Journal of environmental and Public health J Environ Public Health*. vol 2010 : p. 1-5.

Watson J. M., Mitchell E., Gabbay J., *et al.* (1994). Piccadilly Circus Legionnaires' disease outbreak. *Journal of Public Health Medicine*, vol 16 (3) : p. 341-347.

Whitney C.G., Hofmann J., Pruckler J.M., *et al.* (1997) The Role of Arbitrarily Primed PCR in Identifying the Source of an Outbreak of Legionnaires' Disease. *Journal of clinical microbiology*, vol 35 (7): p. 1800-1804.

Yáñez M.A , Carrasco-Serrano C, Barberá VM, *et al.* (2005). Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene. , vol 71 (7) : p 3433-3441.

Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., *et al.* (2011). Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, vol.85 (2) : p. 124-130.

Wurtzer S., Prevost B., Lucas F.S. *et al.* (2014). Detection of enterovirus in environmental waters : a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. *Journal of virological methods* ,vol209 : p. 47-57.

► Rapports

Anses. (2011). Méthode de détection et de dénombrement de *Legionella* dans l'eau. (saisine 2009-SA-330). Maisons-Alfort : Anses, 144 p.

Centers for Disease Control and Prevention. (2005). Procedures for the recovery of Legionella from the environment. Retrieved from <http://www.cdc.gov/legionella/specimen-collect-mgmt/procedures-manual.html>

Health and Safety Executive (2013). Legionnaires' disease: Technical guidance Part 1: The control of Legionella bacteria in evaporative cooling systems.

Guide des bonnes pratiques. *Legionella* et tours aéroréfrigérantes (2001).

Ministère de l'économie, des finances et de l'industrie, Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement- Ministère de l'emploi et de la solidarité (2001). Guides des bonnes pratiques : *Legionella* et tours aéroréfrigérantes.

NSW Health (2016). Public health investigation into the *Legionella* outbreaks in Sydney CBD. March and May 2016 : p.20.

NSW health (2012). Norme intégrée à la réglementation : Air handling and water systems of buildings, microbial control, performance based-maintenance AS/NZS 3666.4/2011.

Office fédéral de la santé publique (2009) *Legionella* et légionellose.

OMS (2007) Légionelle et prévention de la légionellose. p.252.

OSHA (2017) Technical manual: section III, chapter 7. Legionnaires' Disease site consulté le 3/01/2017)

Taouqi M, Bassi C. (2013). Investigation d'un épisode de cas groupés de légionellose dans les Hauts-de-Seine. Août 2012. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire : 24 p.

6.3 Législation et réglementation

Arrêté du 14 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations relevant du régime de la déclaration au titre de la rubrique n° 2921 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement.

Arrêté du Gouvernement flamand du 9 février 2007 publié le 24 mai 2007 relatif à la prévention de la maladie du légionnaire dans des espaces accessibles au public.

Conferenza permanente per i rapporti tra lo stato le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano. Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi, n.103. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, serie generale; 2005.

Décret n° 2013-1205 du 14 décembre 2013 modifiant la nomenclature des installations classées.

Gazette officielle du Québec du 28 mai 2014, 146e année, no 22. Décret 451-2014.

Institute of Environmental Epidemiology Ministry of the Environment, Singapore (2001). code of practice for the control of legionella bacterian cooling towers .

Ministerio de Sanidad y Consumo «BOE» núm. 171, de 18 de julio de 2003 por el que seestablecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis (Décret royal 865/2003 du 4 juillet établissant les critères de santé et d'hygiène pour la prévention et le contrôle de la légionellose, modifié le 14 juillet 2010).

Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer, en charge des relations internationales sur le climat. Arrêté du 13 janvier 2017 portant homologation de la décision n°2016-DC-0578 de l'Autorité de sûreté nucléaire du 6 décembre 2016 relative à la prévention des risques résultant de la dispersion de micro-organismes pathogènes (légionelles et amibes) par les installations de refroidissement du circuit secondaire des réacteurs électronucléaires à eau sous pression.

6.4 Site internet

New York State Department of Health (NYSDOH) (2016). Rules governing cooling towers and health care facilities designed to reduce legionella infection (https://www.health.ny.gov/press/releases/2016/2016-07-19_legionella_regulations_in_effect.htm, consulté le 23 mars 2017).

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2016 -SA- 0 0 3 5

Décision N° 2016-01-024

AUTOSAISINE

Le directeur général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses),

Vu le code de la santé publique, et notamment son article L. 1313-3 conférant à l'Anses la prérogative de se saisir de toute question en vue de l'accomplissement de ses missions,

Décide :

Article 1^{er}.- L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail se saisit afin de réaliser une expertise dont les caractéristiques sont listées ci-dessous.

1.1 Thématiques et objectifs de l'expertise

Détermination des seuils de gestion associés à la méthode d'analyse par q-PCR de dénombrement des *Legionella pneumophila* dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air.

1.2 Contexte de l'autosaisine

L'Anses a rendu en 2011 un avis sur les méthodes à privilégier pour le dénombrement des légionelles dans les circuits d'eau chaude sanitaire et les tours aéroréfrigérantes. L'avis préconise le suivi de l'espèce *Legionella pneumophila* par deux méthodes : la méthode dite par culture (norme NFT90-431) qui est la méthode de dénombrement de référence sur le plan réglementaire et la méthode par q-PCR (quantitative polymerase Chain Reaction) (normes NFT90-471 et ISO/TS 12869). Suite à la publication de cet avis, le ministère en charge de l'écologie, du développement durable et de l'énergie a fait réaliser une étude sur la détermination des seuils de gestion associés à la méthode d'analyse de dénombrement des *Legionella pneumophila* par q-PCR dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air.

Le ministère en charge de l'écologie a fait appel à des experts techniques, compétents en matière de gestion du risque légionelle dans les installations de refroidissement évaporatifs, pour déterminer des seuils de gestion (seuil d'alerte et seuil d'action) pertinents en se basant sur une analyse comparée de données réelles de concentration en *Legionella pneumophila* obtenues par la méthode par q-PCR et par la méthode dit par culture.

1.3 Questions sur lesquelles portent les travaux d'expertise à mener

Les conclusions de l'étude commanditée par le ministère en charge de l'écologie indiquent que les résultats des deux méthodes sont très différents selon le type d'installation et la stratégie de traitement utilisée pour lutter contre les légionelles et ne conduisent pas à une cohérence des actions correctives. Des résultats similaires sont également observés au sein d'une même installation puisque les actions induites par les deux méthodes sont cohérentes ou incohérentes de manière aléatoire selon les

périodes. Compte tenu de l'influence des paramètres intrinsèques à chaque installation (gestion hydraulique, traitement de l'eau notamment) une comparaison binaire des deux méthodes d'analyse semble limitée. L'Agence souhaite analyser en détail cette étude.

1.4 Durée prévisionnelle de l'expertise

L'expertise sera réalisée sur une durée de 10 mois à compter de la constitution du groupe de travail sous réserve du flux des saisines prioritaires à traiter qui pourraient être transmises à l'Anses d'ici là.

Article 2.- Un avis sera émis et publié par l'Agence à l'issue des travaux.

Fait à Maisons-Alfort, le **16 FEV. 2016**

La Directrice générale suppléante



Caroline GARDETTE

Annexe 2 : Avantages et inconvénients de méthodes normalisées par culture et par q-PCR pour le dénombrement de *Legionella* dans les TAR.

Méthodes	Culture	q-PCR
Critères à priorité élevée		
Quantification de <i>Legionella pneumophila</i>	+	+
Prise en compte des <i>Legionella</i> intra amibiennes ou intra vésiculaires dans la quantification	-	+
Non détection des <i>Legionella</i> mortes	+	-
Détection des <i>Legionella</i> viables et potentiellement pathogènes dont les VBNC	-	+
Applicable sur des échantillons d'eau contenant des inhibiteurs de croissance des légionelles (présence d'autres bactéries, résidus des produits ayant servi au traitement des TAR...)	-	+
Rapidité des résultats	-	+
Critères d'interprétation pour le risque sanitaire disponibles	+	-
Critères à priorité modérée		
Détection de l'ensemble des <i>Legionella</i> spp	-	+
Applicable sur des échantillons d'eau chargée (l'extraction permet à la qPCR de s'affranchir des MES par rapport à la concentration par filtration)	-	+
Faisabilité, simplicité	+	+
Equipements nécessaires faibles	+	+
Temps technicien faible	-	+
Interprétation technique simple des résultats bruts	+	+
Permet de disposer de souches pour des études complémentaires	+	-
Permet de réaliser une enquête épidémiologique	+	(+)

Annexe 3 : Validation des méthodes alternatives pour la détection de *Legionella* par PCR

La société AFNOR Certification a défini les modalités de validation des méthodes alternatives aux méthodes de référence pour la détection de micro-organismes dans l'eau et en particulier *Legionella*. Le déposant d'une nouvelle méthode doit solliciter un laboratoire expert dont la liste est disponible sur le site de l'AFNOR pour faire valider la méthode selon le protocole défini ci-dessous. Le dossier de validation est ensuite soumis au bureau technique de l'AFNOR constitué de représentants des fabricants, de laboratoires experts et d'un représentant de laboratoire organisateur d'essais interlaboratoires. Un bureau technique a été constitué pour les méthodes alternatives en microbiologie de l'eau (appelé Bureau Technique Eaux) et un second spécialisé sur les méthodes de détection de *Legionella* par PCR (appelé Bureau Technique PCR légionelles).

1-Principe

Le protocole permet de valider une méthode commerciale (kit) selon les exigences de la norme NF T90-471 transposée dans la norme ISO/TS 12869 (2012). Il s'applique à la détection et/ou la quantification de *Legionella* dans les eaux. L'étude de validation est basée sur les critères, plans d'expérience et modes de calculs définis dans ces normes.

L'étude comporte 3 phases :

1. Phase 1 : définition des limites de détection (LD) et quantification (LQ) (optionnel pour des kits uniquement dédiés à la détection), vérification de la fonction de calibrage, du raccordement à l'ADN étalon, du rendement et de la robustesse, vérification des calculs des logiciels sur les fonctions quantification et détection ;
2. Phase 2 : étude d'inclusivité pour vérifier la détection/quantification sur les souches de *Legionella* et d'exclusivité pour vérifier la non détection/quantification sur un panel de 16 souches de bactéries détectables dans les matrices analysées, vérification de la praticabilité et la qualité des réactifs ;
3. Phase 3 : étude interlaboratoire avec des essais sur solutions d'ADN et échantillons d'eau artificiellement/naturellement contaminés.

2-Phase 1 : Performances de la méthode

1. Raccordement de la solution calibrante et du matériau de référence à l'étalon primaire

La justesse de la mesure par q-PCR temps réel est garantie par trois niveaux d'étalons :

- 1) l'étalon primaire : solution d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration définie. Il est certifié et utilisé comme référence pour raccorder les solutions calibrantes de travail ;
- 2) un matériau de référence : solution d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration connue raccordée à l'étalon primaire utilisé sans dilution comme contrôle externe quantitatif de préférence à chaque série de mesures, disponibles auprès du CNR ;
- 3) une solution calibrante de travail utilisée à chaque série d'amplification d'échantillons : solution d'ADN de *Legionella pneumophila* WDCM 00107 de concentration connue et raccordée à l'étalon primaire, utilisée pour établir l'équation de la droite de calibrage.

Le raccordement de la solution calibrante de travail à l'étalon primaire doit être réalisé au minimum une fois par an par le laboratoire utilisateur ou le fabricant de kit commercial validé tierce partie.

À partir de la solution calibrante de travail à raccorder, préparer au moins trois gammes indépendantes de quatre niveaux (minimum) par dilutions successives ou en cascade, couvrant le domaine de quantification linéaire.

À partir des valeurs obtenues pour les gammes issues de l'étalon primaire (appelée gamme de référence), vérifier que la pente est comprise entre $-4,115$ et $-2,839$ afin que l'efficacité d'amplification soit comprise entre 75 % et 125 %. Calculer les valeurs obtenues pour la solution calibrante en log génomes et comparer les valeurs obtenues sur l'étalon primaire. Si cette valeur est inférieure ou égale à 0,2 log, les pentes et donc les efficacités sont équivalentes et le raccordement est possible.

2. Étude de la fonction de calibrage

Elle consiste à évaluer une gamme étalon d'au moins 4 niveaux de contaminations (qui correspondent à l'étendue possible d'obtention de résultats quantitatifs et dont le niveau le plus bas doit correspondre à la LQ de la méthode) et à vérifier que la pente de la droite étalon soit comprise entre $-4,115$ et $-2,839$, afin que l'efficacité d'amplification soit comprise entre 75 % et 125 %. La régression linéaire doit satisfaire à l'exigence d'exactitude de linéarité $< 0,15$ log sur chacun des niveaux de la gamme.

3. Étude des limites de détection et de quantification

Il s'agit de vérifier les LD et LQ annoncées par le fournisseur pour 30 dilutions d'ADN indépendantes préparées à partir d'une solution d'ADN raccordée à l'étalon primaire. La LD doit être vérifiée pour au moins 90 % des résultats. La LQ est vérifiée à 25 Unités génomes par puits. L'exactitude de la LQ doit être $< 0,15$ log.

4. Seuil de positivité

Les valeurs de Cq^{13} (quantification cycle) obtenues lors de la validation de la LD seront vérifiées comme étant inférieures à la valeur de Cq fournie par le fabricant. Pour les kits de quantification, un échantillon avec une valeur de Cq supérieure à la valeur de l'intercepte (ordonnée à l'origine de la fonction de calibrage) sera considéré négatif.

5. Rendement et robustesse

L'étude du rendement doit être effectuée avec 10 échantillons indépendants, ceci pour trois matrices différentes (eau chaude sanitaire, eau de TAR et eau minérale naturelle, exemptes d'ADN de *Legionella* et artificiellement contaminées par *L. pneumophila* à deux niveaux de contamination : 1000 et 10 000 UG/L dans des conditions de reproductibilité intra-laboratoire : jours différents et/ou opérateurs différents ...) soient $10 \times 3 \times 2 = 60$ échantillons.

Le calcul du rendement doit être compris entre $-0,6$ et $+0,3$ log, ce qui correspond à un rendement compris entre 25 % et 199 %. La robustesse consiste à caractériser l'effet matrice (eau chaude sanitaire et eau de TAR en particulier) et à vérifier que le rendement n'est pas substantiellement affecté par la nature de l'eau analysée. Le calcul est identique.

¹³ Les termes « quantification cycle » remplacent ici les termes « cycle threshold » utilisés dans la norme. L'usage de Cq est recommandé par les directives MIQE (Bustin et al. 2009)

6. Vérification des calculs et interprétations établis par le logiciel

Le laboratoire expert devra présenter tous les calculs de résultats (pentes, interceptes (ordonnée à l'origine de la fonction de calibrage), valeurs recalculées par étalonnage inverse) effectués selon la norme NF T90-471 et à l'aide du logiciel du fabricant. Lorsque des critères de conformité (validité des blancs) sont établis par le logiciel, les calculs doivent être vérifiés par le laboratoire expert.

Pour le témoin d'inhibition, la vérification sera réalisée sur un échantillon inhibiteur total par ajout dosé de l'ADN de *L. pneumophila* (de l'ordre de 1 000 unités génome) et dilutions successives.

3-Phase 2 : Inclusivité et exclusivité, praticité de la méthode

1. Inclusivité

Les amorces et les sondes utilisées dans la méthode doivent être évaluées avec 21 espèces de *Legionella spp* et 15 sérogroupes de *Legionella pneumophila* à raison de 100 unités génome par puits. Toutes les amplifications doivent être positives.

2. Exclusivité

Les amorces et les sondes utilisées dans la méthode doivent être évaluées avec 16 souches de bactéries « environnementales » n'appartenant pas au genre *Legionella*, mais susceptibles d'être présentes dans les échantillons traités, à raison de 10 000 unités génome par puits pour la recherche de *Legionella spp*. Pour *L. p.*, les amorces et sondes doivent être évaluées, en complément des 16 souches de bactéries « environnementales » n'appartenant pas au genre *Legionella*, avec 9 souches de *Legionella* autres que *L. p.*, à raison de 10 000 unités génome par puits. Aucune amplification ne doit être détectée

3. Praticabilité

L'étude de praticabilité consiste à contrôler 18 critères, en particulier le conditionnement des réactifs, leur stabilité, les modalités d'utilisation, les contrôles qualité, le délai d'obtention des résultats, etc.

4-Phase 3 : Étude interlaboratoire

L'essai interlaboratoire est réalisé pour évaluer la fidélité de la méthode.

Il est conseillé de solliciter 10 laboratoires différents pour obtenir un minimum de 8 jeux de données interprétables. Deux extraits d'ADN de *Legionella* sont réalisés à partir des 10 espèces de *Legionella*, dont *L. p.* Ils sont testés à deux niveaux de concentrations en duplicat.

Si la méthode comprend la phase d'extraction d'ADN, à partir d'une suspension bactérienne de *L. p.*, *Legionella spp* et non-*Legionella*, les laboratoires contamineront une matrice commune à tous les participants et exempte d'ADN de *Legionella*, de manière à obtenir 2 niveaux de concentration et 2 répétitions par niveau.

La méthode sera également évaluée avec un échantillon d'eau chaude sanitaire naturellement contaminée et contenant une flore associée à 10^4 UG/L. Chaque laboratoire participant recevra 2 flacons pour effectuer 2 mesures en condition de répétabilité.

Un calendrier sera élaboré avec les laboratoires participants et le laboratoire expert se chargera de l'envoi des échantillons.

L'exploitation statistique des données permet de vérifier « l'étroitesse » de l'accord entre les résultats de mesures et la valeur de référence acceptée, en l'occurrence la moyenne des résultats

des laboratoires participants, si la distribution des résultats est normale. La norme ISO 5725 parle de fidélité des résultats. Cette fidélité doit être vérifiée :

- sur une partie de la méthode, le système q-PCR (amorces / sonde). Ceci est réalisé d'abord sur des extraits purs de *L. p.*, puis sur des mélanges d'extraits de différentes *Legionella* ;
- sur la totalité de la méthode sur des suspensions pures de *L. p.*, puis sur des mélange de suspensions pures de diverses *Legionella* et d'interférents ;
- en situation réelle sur une eau chaude sanitaire naturellement contaminée.

Le biais (écart à la moyenne) est calculé pour chacun des niveaux de contamination et doit être inclus dans un intervalle de 0,5 Log.

5-Commentaire sur la validation

S'agissant des kits destinés à être commercialisés, il n'est pas demandé au fabricant de détailler les séquences des amorces et sondes utilisées et de fait la validation de l'outil q-PCR *in silico*. Cependant, ces informations sont critiques pour estimer le bon fonctionnement de la méthode. La séquence des amorces et sondes utilisées est couverte par la propriété intellectuelle, mais il devrait être exigé a minima une validation de l'étape de leur vérification *in silico*.



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)