

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



Année 2003

Thèse n° 313

**GESTION DU RISQUE
LEGIONELLE**

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 12.05.2003

Par Mr BRY Gaël

Né le 07 octobre 1979 à Limoges

Examineurs de thèse :

Madame le professeur BOSGIRAUD Claudine

présidente

Monsieur BONNIN Jean-Jacques

juge

Madame DELABASSEE Sylvie

juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de conférence

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-louis

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE – PARASITOLOGIE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE – CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE – CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE – BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE – CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESH Christian

HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT

OUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES

ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy

BASLY Jean-Philippe

BATTU Serge

CALLISTE Claude

CARDI Patrice

CLEDAT Dominique

COMBY Francis

DELABASSEE Sylvie

DREYFUSS Marie-Françoise

EA KIM Leng

FAGNERE Catherine

FROISSARD Didier

FOURNIER Françoise

JAMBUT Anne Catherine

LAGORCE Jean-François

LARTIGUE Martine

LIAGRE Bertrand

LOTFI Hayat

MOREAU Jeanne

PARTOUCHE Christian

ROUSSEAU Annick

SIMON Alain

TROUILLAS Patrick

VIANA Marylène

VIGNOLES Philippe

ASSISTANT

FAURE Monique

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ATER

POUGET Christelle

RIAHI DEHKORDI Homayoun

TALLET Dominique

PHARMACOGNOSIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BIOPHYSIQUE

PHYSIOLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PHARMACODYNAMIE

CHIMIE ORGANIQUE

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

BIOCHIMIE

CHIMIE THERAPEUTIQUE

CHIMIE ORGANIQUE

PHARMACODYNAMIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

TOXICOLOGIE

IMMUNOLOGIE

PHYSIOLOGIE

BIOMATHEMATIQUE

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE

BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PHARMACIE GALENIQUE

INFORMATIQUE

PHARMACIE GALENIQUE

ANGLAIS

CHIMIE THERAPEUTIQUE

PHYSIOLOGIE – PARASITOLOGIE

PHARMACOLOGIE

A MON JURY :

Madame le professeur BOSGIRAUD Claudine : service de Bactériologie – virologie – parasitologie.

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Je tiens à vous remercier de l'intérêt que vous avez porté au développement de ce travail. J'ai apprécié vos connaissances, votre sympathie et votre disponibilité.

Veillez trouver ici la preuve de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Madame DELABASSEE Sylvie : Maître de conférence dans le laboratoire de Bactériologie – Virologie à la faculté de pharmacie de Limoges.

Monsieur BONNIN Jean-Jacques : Pharmacien diplômé à la faculté de pharmacie de Limoges.

Je suis très honoré de soumettre ce travail à leur jugement. Que ce travail soit l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

A mes parents, ma famille et mes amis, pour leur présence, soutien et réconfort pendant toutes ces années.

ABREVIATIONS

NIOSH :	National Institute for Occupational Safety and Health
% :	pour cent
EWGLI :	European Working Group for Legionella Infections
CDC:	Center for Disease Control
Subsp :	sous espèce
Sp. :	espèce
AND:	acide désoxyribonucléique
ADNr:	acide désoxyribonucléique ribosomal
Kda :	KiloDalton
LPS :	Lipopolysaccharide
PM :	poids moléculaire
BCYE :	Buffered Charcoal Yeast Extract
°C :	degré centigrade
IFD :	immunofluorescence directe
Ig G :	Immunoglobuline G
Ig M :	Immunoglobuline M
Ig A :	Immunoglobuline A
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RIA :	Radio-Immuno-Assay
EIA :	Enzyme-Immuno-Assays
Lp 1:	<i>Legionella pneumophila</i> sérogroupe 1
UFC :	unités formant colonies
ml :	millilitre
DO :	Déclaration Obligatoire
CNR :	Centre National de Référence
CLIN :	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CCLIN :	Centre de Coordination de Lutte contre les Infections nosocomiales
DDASS :	directions départementales et régionale des affaires sanitaires et sociales
InVS :	Institut de Veille Sanitaire
IPP :	Invalidité Permanente Accidentelle
LPS :	LipoPolySaccharide

GESTION DU RISQUE LEGIONELLE

I) INTRODUCTION

II) HISTORIQUE

1) Evénements

2) Identification de l'agent infectieux

2-1) Les agents toxiques considérés

2-2) Théorie du nickel carbonyle

2-3) Théorie du phosgène

2-4) Autres agents toxiques

3) Cause réelle de la maladie du légionnaire

III) LA BACTERIE ET SON DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1) Taxonomie

2) Caractéristiques bactériologiques et exigences métaboliques

2-1) Caractères bactériologiques

2-2) Caractères métaboliques et facteurs de croissance

2-3) Structure antigénique

3) techniques d'identification

3-1) Culture et isolement

3-2) Immunofluorescence directe

3-3) Recherche des antigènes urinaires

3-4) Techniques de biologie moléculaire

1- PCR

- 2- Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)
- 3- Ribotypie
- 3-5) Sérodiagnostique
- 3-6) Comparaison des méthodes de diagnostic de la légionellose

4) Recherche de légionelles dans l'environnement

- 4-1) Lieux de prélèvements
- 4-2) Modalités de prélèvements
- 4-3) Modalités de transport
- 4-4) Méthodes d'analyse
- 4-5) Seuils admissibles
- 4-6) Comparaison de souches

IV) EPIDEMIOLOGIE

1) Caractéristiques épidémiologiques

- 1-1) Fréquence
- 1-2) Réservoir
- 1-3) Transmission
- 1-4) Incubation
- 1-5) Facteurs de risques individuels
- 1-6) La légionellose chez les animaux

2) Surveillance de la légionellose en France

- 2-1) Déclaration obligatoire
- 2-2) Centre national de référence
- 2-3) Comité de lutte contre les infections nosocomiales
- 2-4) Réseau européen de surveillance des légionelloses acquises lors des voyages
- 2-5) Définition de cas
 - Cas de légionellose
 - Cas groupés de légionellose
 - Légionellose nosocomiale

3) Investigation d'un cas isolé de légionellose

3-1) Confirmation de diagnostique

3-2) Identification des expositions à risque

1- légionellose nosocomiale

2- légionellose communautaire

4) Investigation épidémiologique de cas groupés

4-1) Etude descriptive

4-2) Etude analytique

4-2) Discussion

V) PATHOLOGIE

1) Manifestations cliniques

1-1) La maladie des légionnaires

1-2) La fièvre de Pontiac

1-3) Les légionelloses extra-pulmonaires

2) Mise en place du traitement

VI) OUTILS DE GESTION DU RISQUE

« LEGIONELLE »

1) Maîtrise de la prolifération bactérienne environnementale

1-1) Mesures techniques préventives

1-2) Mesures à court terme

1-3) Mesures à long terme, et mesures complémentaires

1- Chloration

2- Ozonisation

3- Utilisation d'électrodes en cuivre-argent

4- Conclusion – recommandations pratiques

2) Réglementation – Recommandations

2-1) Recommandations de portées générales

- 1- Circulaire DGS n°97/311 du 24 avril relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose
- 2- Circulaire n°98-771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans les bâtiments recevant du public

2-2) Réglementations relatives aux tours aéroréfrigérantes

2-3) Réglementations relatives aux établissements thermaux

2-4) Réglementations relatives à la protection des travailleurs

VII) LA LEGIONELLOSE : ASPECTS JURIDIQUES

- 1) Le principe général de responsabilité**
- 2) Les infections nosocomiales**
- 3) Le risque pénal**

VIII) CONCLUSION

IX) ANNEXES

- Annexe I : Traitement thermique de l'eau
- Annexe II : Traitement au chlore/eau de javelle de l'eau
- Annexe III : Traitement au bioxyde de chlore de l'eau
- Annexe IV : Traitement de l'eau par ozonisation

- Annexe V : Le biofilm
- Annexe VI : Formulaire de déclaration obligatoire
- Annexe VII : Exemple de fiche de suivi d'un cas de légionellose

X) BIBLIOGRAPHIE

I) INTRODUCTION

Les légionelloses sont depuis peu portées sur le devant de la scène publique au même titre que les listérioses et les méningites à méningocoques chaque fois que des cas ou une épidémie sont diagnostiqués. Les médias présentent *Legionella* comme une bactérie tueuse et les légionelloses comme des infections cachées pour lesquelles s'applique la loi du silence quand la source de l'infection est trouvée. On oublie trop souvent qu'il s'agit d'une bactérie vivant à l'état naturel dans les mares et les étangs des zones tropicales.

Dans les pays tempérés, l'homme leur a involontairement créé un milieu favorable au sein même de son habitat. Ainsi, les bains à remous, les réseaux sanitaires, les systèmes de refroidissement d'air et tout autre équipement pourvu d'un réservoir d'eau chaude peuvent donc contenir des légionelles. A partir de 20 degrés, elles prolifèrent rapidement se diffusant dans l'atmosphère quand ce liquide est pulvérisé.

La maladie est apparue pour la première fois aux Etats-Unis en 1976. Plus de 200 vétérans de l'American Legion, réunis dans un hôtel de Philadelphie, ont été brusquement atteints de pneumonie aiguë. 34 en sont morts. La bactérie responsable a été identifiée et baptisée symboliquement *Legionella pneumophila*.

La famille des légionelles compte 43 variétés. Une seule peut tuer, *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Les personnes âgées, les enfants, les immunodéprimés sont les plus sensibles à la maladie. Globalement, entre 10 et 20% des personnes atteintes de ce mal en meurent.

Depuis 1987, elle doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire. L'institut de veille sanitaire a recensé 450 cas en 1998, 807 en 2001 [1].

La plupart des décès sont constatés chez des curistes de stations thermales ou des malades hospitalisés, du fait de la complexité des réseaux d'eau de ces établissements dont le traitement est difficile, et du fait de l'état de santé des personnes exposées.

En dehors de ces lieux bien répertoriés, des cas de légionelloses peuvent avoir lieu sans pour autant être diagnostiqués. «La réalité est beaucoup plus inquiétante que les chiffres officiels. Il y aurait au moins 2 000 cas par an en France», affirme le Docteur Squinazi (laboratoire d'hygiène, Paris). Les bactéries peuvent être inhalées

au bureau, à l'hôtel, à la maison, voire en plein air, comme ce fut le cas en 1998 à Paris durant la coupe du monde (20 cas de légionellose ont été déclarés, dont 4 mortels). Il ajoute : « Il est très probable que des nuages de légionelles ont déjà été relâchés dans le ciel de Paris les années précédentes, seulement, personne n'y a été exposé » [2].

Avec la multiplication des tours crachant leur panache de vapeurs de refroidissement, il existe un grand risque de récurrence d'un phénomène dont on ne connaît ni le mode de concentration dans l'atmosphère ni le comportement sous l'influence du vent et du soleil.

Pour la médecine du travail, la légionellose fait partie des pathologies liées à une mauvaise gestion de l'air intérieur des bâtiments, où le citoyen passe 80% de son temps.

Dans tous les cas, la réduction du risque lié aux légionelles reposera avant tout sur un bon entretien des circuits et des installations d'eau, en particulier d'eau chaude, notamment dans les établissements de santé, les établissements thermaux et les bâtiments où un large public circule. Il sera essentiel de réaliser des diagnostics précoces, et des enquêtes épidémiologiques adaptées, afin de prévenir ou de limiter tout risque d'épidémie, et de détecter la source de contamination.

II) HISTORIQUE

1) Evènements

En juillet 1976, James Dolan, Richard Dolan, John Bryant Ralph et quelques autres membres du poste 239 de Williamstown en Pennsylvanie préparent le 58^{ème} congrès de l'American Legion, programmé du 21 au 24 juillet. L'hôtel Bellevue-Stratford est choisi : c'est un ancien hôtel de luxe de plus de 700 chambres et de 22 salles de réunion qui a commencé à décliner au début des années 1970. Toutes les chambres sont réservées pour le congrès. On attend 4400 légionnaires et leurs familles. Le climatiseur, formé de deux blocs de capacité 800 et 600 tonnes, a été installé en 1954 et présente des signes de fatigue. Un employé de 26 ans contrôle les appareils de climatisation et le thermostat des chambres, mais le 20 juillet, il est trop malade pour continuer (maux de tête, courbatures,...). Le 23 juillet, James Dolan et John Bryant Ralph souffrent d'un « mauvais rhume ». Le 26 juillet, bon nombre des congressistes sont alités. Le 30 juillet, quatre légionnaires meurent de pneumonie.

A Bloomsburg en Pennsylvanie, trois légionnaires sont atteints de fièvre étiquetée « typhoïde » et le Docteur Ernest Campbell est le premier à faire un lien entre ces patients qu'il traite pour des symptômes fébriles identiques et le congrès. En même temps, à l'hôpital de Chambersburg, l'infirmière hygiéniste, Mrs Geneva Baxter, signale une pathologie identique chez trois légionnaires hospitalisés qui avaient assisté au congrès. Le Docteur Campbell et Mrs Geneva font chacun un rapport à l'autorité sanitaire. Le lundi 2 août, 16 personnes sont mortes et 66 légionnaires sont hospitalisés. Le même jour, à New York, Maria Reeves qui a travaillé comme « call girl » sur les lieux de congrès est traitée par l'érythromycine pour une pathologie pulmonaire.

Au total, 182 membres de l'American Legion ont été malades et 29 sont morts. Le CDC (Center of Disease Control) est dépêché sur les lieux pour mener une enquête. L'équipe est composée de 3600 personnes dont 200 épidémiologistes. Cependant, malgré de nombreux mois de recherche intensive, aucun agent infectieux n'est retrouvé et la plupart des causes infectieuses connues sont exclues. Après une très longue et spectaculaire enquête, en janvier 1977, le « Center for Disease Control » (CDC) d'Atlanta publie la découverte par Mc. Dade et son équipe d'une nouvelle espèce bactérienne responsable de cette maladie appelée, compte tenu des

circonstances « maladie des légionnaires » [3]. Depuis cette découverte, de nombreux travaux rétrospectifs, ont montré que cette maladie avait, en fait, déjà été observée dans le passé, notamment à Pontiac en 1968, mais n'avait pas été identifiée précisément. Depuis d'autres bactéries de ce type ont été découvertes et le terme de « Légionelloses » est choisi pour désigner toutes les infections dont elles sont responsables. Ces bactéries, les *Legionella*, sont rassemblées dans la famille de *Legionellaceae* [4].

Après cette première description de cas de légionelloses, d'autres ont suivi. A Paris, en 1980, le nouvel hôpital Bichat est inauguré. C'est alors un établissement ultra moderne. Le 6 août 1981, toutes les admissions de malades sont suspendues à cause de deux vagues d'épidémies de légionelloses qui ont provoqué deux décès. Les admissions reprennent, mais une nouvelle épidémie provoque une douzaine de décès de novembre 1982 à mars 1983. Le système de climatisation est alors incriminé.

A Paris, en 1998, une épidémie survient en marge de la coupe du monde de football. Celle-ci est d'autant mieux repérée qu'un réseau de surveillance Européen a été mis en place : 31 pays font partie du groupe de travail européen sur les infections à légionelles « EWGLI ». L'origine de la contamination est le panache d'une tour aéro-réfrigérante [5].

Aux pays Bas en 1999, un jacuzzi est installé à l'entrée de l'exposition florale Westfriesse Flora : 181 personnes font une pneumonie à *Legionella* et 21 en meurent.... [3,6]

Plus récemment à Nice en mars 2002, six cas de légionelloses sont déclarés. Les six Niçois n'ont rien en commun si ce n'est d'avoir traversé la place Masséna. Une jolie place, la place Masséna, encadrée d'hôtels luxueux et au centre de laquelle chuchotent des jets d'eau. Pourtant c'est là, en respirant cet air rafraîchissant, qu'ils ont contracté une maladie qui a tué trois d'entre eux. Le diagnostic démontre la responsabilité des légionelles. On accuse les fontaines, dont les gouttelettes en suspension auraient introduit dans les poumons des victimes des milliers de bactéries *Legionella*. A moins qu'il ne faille regarder du côté des systèmes de

climatisation des hôtels, qui auraient rejeté vers la rue une vapeur infestée... Le mystère n'est pas encore élucidé [7].

D'autres cas de légionelloses ont été répertoriés en France au cours de l'année 2002 : au moins douze cas à Sarlat (Dordogne), dix-sept cas, dont deux mortels à Meaux (Seine et Marne) mais aussi cinq cas, depuis le mois de mai, au centre hospitalo-universitaire de Besançon (Doubs)... [8]

2) Identification de l'agent infectieux

Des pathologies présentant de tels signes cliniques et épidémiologiques sont communément causées par des agents infectieux. Par conséquent, les premières études diagnostiques sont réalisées dans le but d'identifier cet agent microbiologique pathogène. 48 heures après la réception des premiers spécimens dans l'hôpital de Pennsylvanie en 1976, dans le laboratoire du CDC, la plupart des agents infectieux capables d'induire une telle symptomatologie de cette sévérité sont exclus des causes possibles. Durant les trois mois qui suivent, des études plus sophistiquées et performantes sont mises en œuvre. Celles-ci excluent tous les agents infectieux pathogènes connus (tableau1) [9].

En décembre 1976, un mois avant la découverte par le laboratoire CDC de l'agent responsable de la maladie des légionnaires, Gary L. Lattimer et Richard A. Ormsbee qui travaillaient avec le docteur Leslie A. Page du « National Animal Disease Center in Ames » dans l'Aowa, découvrent que le sérum de nombreux survivants de l'événement de Philadelphie ont des anticorps dirigés contre les *Chlamydia*.

La maladie des légionnaires est alors suspectée comme étant une forme de psittacose (maladie infectieuse induisant un syndrome pseudogrippal, due à *Chlamydia psittaci* généralement transmise par un oiseau infecté). A la suite de cette découverte, les sérums sont réexaminés, et en plus des anticorps anti-chlamydia, des bactéries sont découvertes.

2 jours	5 jours	14 jours	3 mois
<i>Chlamydia</i>	<i>Virus Influenza</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Pneumocystis</i>
<i>Francisella tulariensis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Spiroplasma</i>	<i>Rickettsia</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Coxiella burnetii</i>	
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Nisseria</i>	<i>Virus Parainfluenzae</i>	<i>Entamoeba</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>meningitidis</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Ascaris</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>Virus syncytial</i>	<i>Toxoplasma</i>
<i>virus Lassa</i>	<i>Shigella</i>	<i>Virus Herpes</i>	<i>Candida</i>
			<i>Chlamydia</i>
<i>Virus de la</i>	<i>Histoplasma</i>	<i>Virus Mumps</i>	<i>Rhinovirus</i>
<i>chorioméningite</i>	<i>Blastomyces</i>	<i>Virus Measles</i>	<i>Picornavirus</i>
<i>lymphocytaire</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Virus Enterique</i>	<i>Arenavirus</i>
	<i>Brucella</i>	<i>Thermoactinomyces</i>	
	<i>Coccidioïdes</i>	<i>Leptospira</i>	
		<i>Coronavirus</i>	

Tableau 1 : agents infectieux exclus par le laboratoire du CDC [9].

Avant la mise en cause d'un agent infectieux dans la maladie du légionnaire, une intoxication par des substances toxiques a été tout d'abord suspectée.

Les éléments qui ont orienté cette voie de recherche sont :

- la nécessité de trouver rapidement une cause à cette maladie avant d'avoir pu étudier celle-ci ;
- l'absence de transmission interhumaine ;
- et une symptomatologie initiale ressemblant à celle induite par une substance toxique.

2-1) Les agents toxiques considérés

Un agent toxique étant suspecté comme la cause probable de la maladie du légionnaire, un congrès eu lieu à Philadelphie le 23 et 24 novembre 1976, trois mois après les premiers événements, et deux mois avant l'identification de la bactérie réellement responsable. La plupart des scientifiques présents témoignèrent de la

possibilité de la présence d'une toxine non-identifiée qui pourrait être à l'origine de la maladie. Le rapport du NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) identifia plusieurs agents toxiques susceptibles de pouvoir causer de tels troubles [9]:

- le paraquat
- le phosgène
- le nickel carbonyle
- le cadmium
- l'ozone

2-2) Théorie du nickel carbonyle

Sunderman et Sunderman sont les premiers à décrire les similitudes cliniques existantes entre une intoxication au nickel carbonyle et la maladie du légionnaire.

Le nickel carbonyle est un gaz inodore et incolore, donc imperceptible. Le délai important d'apparition des premiers symptômes associé au manque de transmission interhumaine de la pathologie vont dans le sens d'une telle possibilité.

Ils montrent que l'histopathologie des tissus pulmonaires est identique à celle trouvée dans les cas d'intoxications fatales au nickel carbonyle. Après mesure de la concentration de cet élément dans les tissus de six victimes, cinq de ces prélèvements contiennent une concentration en nickel sept fois supérieure à la normale. L'analyse du cerveau, des reins et du foie révèle des concentrations normales, or en cas d'intoxication, le nickel ou ses métabolites sont présents en plus grande quantité dans ces trois types d'organes. De plus, une contamination des organes étudiés par le nickel présent sur les scalpels, le matériel d'autopsie ou de conditionnement est aussi une possibilité.

L'analyse de Sunderman et Sunderman a été confirmée par celle de Chen et al [10] qui étudia la concentration tissulaire du nickel dans le foie et les reins avec la technique très sensible du PIXE (« proton-induced x-ray emission technique »), méthode qui mesure les éléments plus lourds que le sodium par l'intermédiaire de l'émission d'un faisceau de protons [11].

Les résultats ont montré que les concentrations en nickel étaient neuf fois supérieures dans les tissus pulmonaires des légionnaires que dans les tissus de contrôle, et que leurs reins contenaient des concentrations normales. De plus, sur trois des cinq cas analysés, les tissus pulmonaires externes possédaient des concentrations en nickel plus importantes que les tissus internes, et les plus petits échantillons de poumons examinés étaient ceux qui présentaient les taux les plus importants de nickel. Les auteurs de ces analyses en conclurent qu'une contamination externe post-mortem était probable.

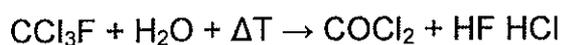
Ainsi la théorie d'une intoxication au nickel carbonyle devenait peu crédible. J. L. Abraham [12] examina les tissus pulmonaires de sept victimes avec un microscope électronique équipé de « x-ray microprobe analysis » et mesura l'émission des rayons x. Il montra que les particules de nickel découvertes étaient associées à d'autres éléments et qu'il n'y avait aucune particule de nickel pur.

Tous ces éléments l'aiderent à conclure que le nickel carbonyle n'était probablement pas la cause de la maladie du légionnaire.

2-3) Théorie du phosgène

L. F. Cook et N. Runsdorf [9] ont pensé que le phosgène pouvait être une cause de la maladie du légionnaire. En l'absence d'agent infectieux, et avec le manque de contamination interhumaine, ce gaz peut être considéré comme une source potentielle des troubles observés. Les premiers symptômes de la maladie ainsi que l'évolution de celle-ci sont similaires aux cas d'empoisonnement au phosgène. Cet agent toxique aurait pu être véhiculé par le compresseur de l'air conditionné, une fuite du compresseur pouvant induire un relargage de trichlorofluorométhane.

Comme le compresseur se trouvait dans les sous-sols de l'hôtel, ils postulèrent que le réfrigérant (trichlorofluorométhane) aurait pu entrer en contact avec la chambre de combustion de l'incinérateur, entraînant par la réaction suivante la production de phosgène :



Une fois produit, le phosgène se serait répandu dans la pièce, serait entré dans le local de ventilation et aurait été disséminé dans tout l'hôtel.

Pour expliquer les cas de pneumonies survenus chez les personnes ayant circulé dans la rue se trouvant devant l'hôtel, ils considérèrent que les conditions de températures extérieures présentes durant les événements entraînaient une chute du gaz le long des parois extérieures du bâtiment jusqu'à la rue, exposant ainsi au phosgène des personnes se trouvant en dehors du bâtiment.

Ils émirent également l'hypothèse que l'émission du gaz aurait pu être produite après pyrolyse du trichlorofluorométhane dans le compresseur/condensateur ou, après un contact avec une étincelle émise par les commutateurs ou par une cigarette. Mais après avoir réalisé des études plus poussées, ils écartèrent cette hypothèse.

En ce qui concerne les autres toxines susceptibles d'induire cette pathologie, les résultats du rapport NIOSH montrèrent après analyse des tissus pulmonaires que les concentrations non significatives en cadmium et paraquat excluaient ces types d'intoxications.

2-4) Autres agents toxiques

Les études réalisées ont permis d'exclure les agents toxiques qui auraient pu causer cette maladie (tableau 2).

3) Cause réelle de la maladie du légionnaire

Le 18 juillet 1977, cinq mois et demi après les événements de Philadelphie, le CDC publia un numéro spécial du « *Morbidity and Mortality Weekly Report* », dans lequel ils annoncèrent que leurs investigateurs avaient isolé l'agent de la maladie du légionnaire [9].

14 jours	1 mois	3 mois
Étain	Arsenic	Ethylène glycol
Thallium	Antimoine	Halogénés volatils
Beryllium	Beryllium	Phosphore
Chrome	Cadmium	
Paraquat	Cobalt	
Solvants halogénés	Cuivre	
Solvants autres, pesticides, herbicides	Or	
	Fer	
	Mercure	
	Molybdène	
	Sélénium	
	Argent	
	Thallium	
	Thorium	
	Tungstène	
	Zinc	

Tableau 2 : Agents toxiques exclus par le laboratoire du CDC après réception des corps [9].

Le Dr. Joseph Mc Dade du CDC, isola une bactérie Gram négatif à partir d'un tissu pulmonaire issu d'un cas fatal de légionellose, pour cela il a employé une technique habituellement utilisée pour cultiver des bactéries rickettsies. Il s'agit d'une découverte remarquable si l'on prend en compte le fait que de très nombreux essais de culture avaient été testés sans succès utilisant les techniques d'isolement des rickettsies et des chlamydia.

La bactérie isolée fut identifiée comme l'agent responsable de la maladie des légionnaires. La recherche des anticorps dirigés contre l'agent responsable de la maladie des légionnaires dans le sérum de sujets survivants atteints par les épidémies de 1965 à Washington et de 1968 à Pontiac (Michigan) a permis de

découvrir rétrospectivement 9 à 10 ans après que l'agent causal était la même bactérie [13].

III) LA BACTERIE ET SON DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1) Taxonomie

Les *Legionella* appartiennent à la famille des *Legionellaceae*.

La classification générale admise est celle de Brenner et al. : la famille des *Legionellaceae* comporte un seul genre : *Legionella*. L'espèce type est *Legionella pneumophila* qui est la plus fréquente en pathologie humaine et qui comporte 15 sérogroupes. Il existe actuellement 43 espèces de *Legionella* dont le tableau 3 donne un aperçu.

L'espèce *L. pneumophila* est actuellement subdivisée en : subsp. *pneumophila*, subsp. *fraseri*, subsp. *pascullei*.

Les premières souches de légionelles ont en fait été mises en évidence entre 1943 et 1968 et considérées comme des rickettsies. Ces bactéries n'ont fait l'objet d'aucune étude approfondie jusqu'en 1976.

Plusieurs souches de légionelles sont qualifiées de LLAP (pour *Legionella*-Like Amoebal Pathogens), elles ont un développement intracellulaire obligatoire. Celles-ci n'ont pas été cultivées et pourraient représenter plusieurs espèces différentes. En mai 2001, Adeleke *et al.* [14] ont validé les nomenclatures de *Legionella drozanskii*, de *Legionella fallonii* et de *Legionella rowbothamii* pour 12 souches de LLAP.

La famille des *Legionellaceae* forme un groupe cohérent placé dans la subdivision gamma-2 des *Proteobacteria*. Phylogénétiquement, les espèces les plus proches sont *Coxiella burnetii* et *Rickettsiella grylli*, espèces actuellement exclues de l'ordre des *Rickettsiales*.

Les études d'hybridation ADN - ADN ont montré que quelques espèces de la famille des *Legionellaceae* présentaient peu d'homologies avec les espèces du genre *Legionella* ; elles ont conduit à proposer deux nouveaux genres : les genres *Fluoribacter* et *Tatlockia* dont les nomenclatures ont été publiées par l'ICSB (Comité International de classification de la Systématique Bactérienne).

ESPECES	SOURCES D'ISOLEMENT
<i>L.pneumophila</i>	tissu pulmonaire, circuit de refroidissement
<i>L. anisa</i>	pleurésie, eau chaude
<i>L. birminghamensis</i>	pneumonie
<i>L. bozemanii</i> (2 sérogroupes)	tissu pulmonaire
<i>L. cincinnatiensis</i>	pneumonie
<i>L. dumofii</i>	pneumonie
<i>L. feeleii</i> (2 sérogroupes)	pneumonie
<i>L. hackeliae</i> (2 sérogroupes)	pneumonie
<i>L. gormanii</i>	terre, pneumonie
<i>L. jordanis</i>	biopsie pulmonaire, eau de rivière
<i>L. longbeachae</i> (2 sérogroupes)	aspiration transtrachéale, pneumonie
<i>L. maceachenii</i>	pneumonie, citerne d'eau potable
<i>L. micdadei</i>	sang, pneumonie
<i>L. oakridgensis</i>	pneumonie
<i>L. tucsonensis</i>	pneumonie
<i>L. wadsworthii</i>	pneumonie
<i>L. parisiensis</i>	pneumonie, circuit de refroidissement
<i>L. cherii</i>	citerne d'eau potable
<i>L. erythra</i>	circuits de refroidissement
<i>L. fairfieldensis</i>	circuits de refroidissement
<i>L. jamestowniensis</i>	terre humide
<i>L. rubrilucens</i>	eau du robinet
<i>L. spiritensis</i>	étang

Tableau 3 : Principales espèces de *Legionella* actuellement rencontrées en pathologie humaine ou dans l'environnement

Toutefois, il n'existe pas de définition précise d'un genre bactérien et les caractères phénotypiques des genres *Legionella*, *Fluoribacter* et *Tatlockia* sont très proches. Il est admis que sur un plan nomenclatural, l'appellation de *Fluoribacter bozemaniae* (*sic*) a remplacé celle de *Legionella bozemaniae*.

En 1996, *Sarcobium lyticum* a été transféré dans le genre *Legionella* avec la dénomination de *Legionella lytica*. La nomenclature de *Sarcobium lyticum* avait été proposée en 1991 pour une espèce bactérienne parasite d'amibes du sol et de l'eau et appartenant au groupe *Acanthamoeba* - *Naegleria*. La reclassification de cette bactérie dans le genre *Legionella* repose sur l'étude de la séquence des ADNr 16S.

2) Caractéristiques bactériologiques et exigences métaboliques

2-1) caractères bactériologiques

Les souches de *Legionella* se présentent sous la forme de bacilles Gram négatif comme nous le montre la figure 1, non sporulés, non capsulés, présentant jusqu'à 90 % d'acides gras insaturés dans la paroi (caractère inhabituel pour une bactérie à Gram négatif). Elles mesurent de 0,3 à 0,9 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de longueur, pouvant donner des formes filamenteuses de 20 µm ou plus après culture *in vitro*. Elles sont aérobies stricts, à métabolisme non fermentatif, catalase positive (réaction parfois faiblement positive), ne réduisant pas les nitrates et ne synthétisant pas d'uréase [15].

Après coloration de Gram, les légionelles sont faiblement colorées par la safranine et il convient soit de laisser agir le colorant plus longtemps soit de le remplacer par de la fuchsine à 0,05 % ou par un mélange safranine et fuchsine. Un caractère d'acidorésistance a été mis en évidence pour les cellules de *L. micdadei* présentes dans les prélèvements d'origine clinique. Ce caractère est toutefois perdu après culture.

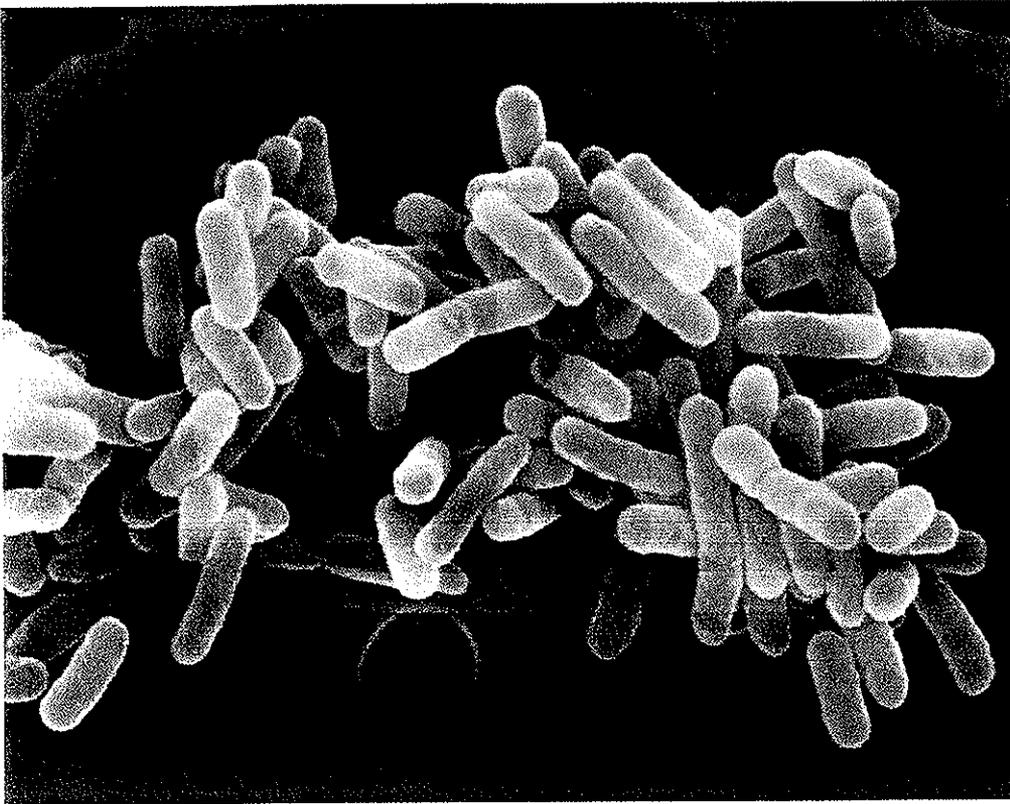


figure 1 : Legionella sp au microscope électronique à balayage × 22800 [16].

La paroi des Legionella se caractérise par la présence:

- D'un peptidoglycane de structure proche de celle des autres bacilles Gram négatifs, d'une membrane externe dont l'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) révèle chez toutes les souches de *L. pneumophila* la présence d'une protéine dite majeure ayant un poids moléculaire de 29 Kda ;
- d'acides gras ramifiés cellulaires. Ces acides gras ramifiés, fréquents chez les bacilles Gram positifs, sont rarement rencontrés chez les bacilles Gram négatifs et toujours en faible quantité. Chez les *Legionella*, ils arrivent à constituer jusqu'à 90 % de l'ensemble des acides gras. Cette composition est à rapprocher de celle de certaines bactéries aquatiques thermophiles. La composition en acides gras permet de différencier les espèces de *Legionella* [17,18].

La plupart des espèces sont mobiles grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles polaires, subpolaires ou latéraux mais, la mobilité est parfois difficile à

mettre en évidence et son expression est fonction des facteurs environnementaux et notamment de la température. *L. fairfieldensis*, *L. londiniensis*, *L. nautarum* et *L. oakridgensis* sont toujours immobiles.

Les caractères biochimiques ont peu d'intérêt pour caractériser le genre *Legionella* ou pour différencier les diverses espèces. L'oxydase, l'hydrolyse de la gélatine et l'hydrolyse de l'hippurate sont des caractères variables selon les espèces ou selon les souches d'une même espèce :

- L'oxydase est généralement négative ou faiblement positive.
- La majorité des espèces liquéfie la gélatine mais une réponse négative est obtenue avec *Legionella fairfieldensis*, *Legionella feeleii*, *Legionella lansingensis* et *Legionella nautarum*. Quelques souches de *Legionella israelensis* et de *Legionella quinlivanii* n'hydrolysent pas ou hydrolysent faiblement la gélatine. Un résultat variable est obtenu avec les souches de *Legionella micdadei*.
- La non-hydrolyse de l'hippurate a été longtemps considérée comme caractéristique des souches de *L. pneumophila*. En fait, les souches de *L. geestiana*, de *L. gresilensis* et de *Legionella waltersii* hydrolysent également l'hippurate et les souches de *L. feeleii* et de *L. londiniensis* sont faiblement hippurate positive.

La culture des légionelles est difficile : elles ne se cultivent pas sur des géloses au sang et *Legionella lytica* ainsi que les souches de LLAP n'ont pas été cultivées *in vitro*. De plus, il a été démontré que les légionelles pouvaient être présentes dans un état viable mais non cultivable sauf si la culture est effectuée en présence de protozoaires (figure 2).

Cette observation a conduit à mettre en œuvre des techniques de co-cultures légionelles/protozoaires utilisées par certains laboratoires spécialisés [19].



Figure 2: Légionelles à l'intérieur d'un protozoaire [16].

La croissance est optimale à un pH légèrement acide (de l'ordre de 6,8 - 6,9) et, pour la majorité des espèces, à une température de 36 °C. Les souches isolées de l'homme se cultivent entre 25 et 43 °C mais, dans le milieu extérieur, les légionelles sont aptes à croître à des températures plus basses ou plus élevées. La croissance de *Legionella gormanii* est favorisée par la présence de 2,5 % de dioxyde de carbone et, comme ce gaz a un effet tampon, les cultures sont généralement incubées dans une atmosphère contenant 2,5 % de dioxyde de carbone. Lors d'une primoculture, la présence de L-cystéine et de fer est requise et l'exigence en L-cystéine persiste, le plus souvent, même après plusieurs repiquages.

Les cultures sont généralement réalisées sur une gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) supplémentée en L-cystéine, en tampon ACES et en fer. La source de fer peut être constituée par du nitrate de fer, du sulfate de fer, du chlorure de fer, de l'hématine ou de l'hémine mais, les meilleurs résultats sont obtenus avec du pyrophosphate de fer.

Lors d'une primoculture sur milieu BCYE, les colonies obtenues après trois jours d'incubation sont minuscules puis elles grandissent et atteignent un diamètre de 3 à 4 mm après cinq à sept jours d'incubation. Elles sont grisâtres, de consistance muqueuse, de taille hétérogène et, observées à la loupe binoculaire, elles ont généralement un aspect en verre brisé. Après observation sous un éclairage ultraviolet, les colonies de *L. bozemaniae*, de *L. cherrii*, de *L. dumoffii*, de *L. gormanii*, de *L. parisiensis*, de *L. steigerwaltii*, de *L. tucsonensis* et la majorité des souches de *L. anisa* présentent une fluorescence bleue. Une fluorescence jaune - vert est notée avec *L. birminghamensis* et *L. wadsworthii* et une fluorescence rouge est observée avec la majorité des souches de *L. erythra*, de *L. rubrilucens* et de *L. taurinensis*.

Après culture sur un milieu sans charbon mais contenant de la L-tyrosine ou de la L-phénylalanine, la majorité des souches de *Legionella* sp. provoque un brunissement du milieu. Un résultat négatif est toutefois noté avec *L. adelaidensis*, *L. beliardensis*, *L. birminghamensis*, *L. fairfieldensis*, *L. gresilensis*, *L. israelensis*, *L. lansingensis*, *L. micdadei*, *L. nautarum*, *L. quinlivanii*, *L. shakespearei*, *L. taurinensis*, *L. tucsonensis*, *L. wadsworthii* et *L. waltersii*. Quelques souches de *L. geestiana*, *L. brunensis*, *L. moravica*, *L. pneumophila* et de *L. sainthelensi* donnent également un résultat négatif.

2-2) Caractères métaboliques et facteurs de croissance

Les amino-acides ont un rôle indispensable dans le métabolisme des *Legionella* lors de leur croissance [15]. Parmi les plus importants on peut citer l'arginine, l'acide L-glutamique, source d'énergie et la L-cystéine. L'exigence en L-cystéine caractéristique des *Legionella* est un élément indispensable lors de leur identification. Même après adaptation, la L-cystéine reste indispensable à leur culture à l'exception d'une espèce : *L. oakridgensis*. La présence de fer apportée sous forme

de pyrophosphate, de nitrate ou d'hémine est également nécessaire à leur croissance, en particulier lors de l'isolement.

Dans la fonction respiratoire des *Legionella* interviennent des ubiquinones, constituants de la membrane cytoplasmique qui jouent un rôle important dans le transport d'électrons. Ces ubiquinones, présentes chez d'autres bacilles Gram négatifs ont une structure particulière chez les *Legionella* : les chaînes latérales isoprénoïdes fixées sur le noyau 1-4 benzoquinone se caractérisent par leur nombre d'unités isoprènes supérieur à ce qui est habituellement observé (10 à 14 unités) et leur degré d'insaturation. L'analyse de ces ubiquinones en chromatographie liquide haute performance permet de classer les *Legionella* en cinq grands groupes d'espèces [13].

De nombreuses enzymes ont été détectées chez les *Legionella* (phosphatases, estérases, protéases, β -lactamases,...). L'analyse des variations de mobilité électrophorétique de certaines de ces enzymes (isoenzymes) a permis de déterminer des types électrophorétiques confirmant la classification taxonomique des espèces et a pu être utilisé à l'intérieur de certaines espèces comme marqueurs épidémiologiques [20].

2-4) Structure antigénique

La structure antigénique des *Legionella* est plus ou moins bien connue et a surtout été étudiée pour *L. pneumophila*.

- Sur la membrane externe, on trouve : le lipopolysaccharide (LPS), la protéine majeure « *Major outer membrane protein* » (MOMP) et d'autres antigènes protéiques.
 - ✓ La structure générale du LPS des *Legionella* est semblable à celle des autres bactéries Gram négatives mais sa composition chimique est différente ; il contient des sucres, une forte proportion d'acides gras ramifiés et peu d'acides gras hydroxylés. Son activité biologique est conforme à celle d'une endotoxine. La chaîne polysaccharidique est le support de l'antigénicité O et elle est caractéristique de chaque séro groupe de *L. pneumophila*. Chez les patients, les anticorps

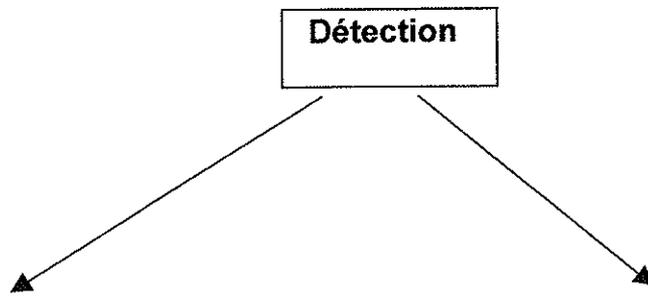
détectés par la réaction d'immunofluorescence indirecte sont, en majorité, dirigés contre le LPS.

- ✓ La protéine de la membrane externe (MOMP) (PM = 29 Kda) est présente chez les 64 sérogroupes de *L. pneumophila* et serait spécifique de cette espèce [19]. Un anticorps monoclonal dirigé contre la MOMP (Monofluor® Kit *Legionella pneumophila* Diagnostics Pasteur) est commercialisé, en vue du diagnostic direct de *L. pneumophila*.
- ✓ D'autres antigènes protéiques ont été mis en évidence par électrophorèse (SDS-PAGE) et immunoblotting. Parmi eux, un antigène de 57-62 Kda, de situation profonde dans la membrane a été retrouvé chez toutes les espèces de bacilles Gram négatif [20,21].
- Au niveau flagellaire, il existe une activité antigénique qui semble commune et spécifique à l'ensemble des espèces du genre *Legionella*. Les patients s'immunisent irrégulièrement contre cet antigène dont le rôle dans la virulence ne semble pas très important [22].

3) techniques d'identification

Il est essentiel de pouvoir détecter les *Legionella* dans les milieux environnementaux afin de pouvoir réaliser un traitement préventif des installations présentant un risque potentiel pour le public. Mais il est également important de disposer de techniques de détection précoces et fiables lors des cas de légionellose afin de pouvoir réaliser une mise en route précoce du traitement.

De part les caractéristiques bactériologiques de *Legionella*, plusieurs techniques de détection sont utilisées selon que le prélèvement à analyser sera un produit biologique ou un prélèvement environnemental.



A partir de l'environnement

- Culture (BCYE)

A partir d'un prélèvement biologique

- Isolement
- Identification
- Serodiagnostic

Identification d'espèce

- Culture (BCYE)
- Immunofluorescence directe
- Test d'agglutination au latex
- Techniques d'identification spécialisées:
 - PCR
 - Techniques de biologie moléculaire (ribotypage, électrophorèse en champ pulsé, hybridation moléculaire)

Schéma de détection et d'identification de Legionella

3-1) Culture et isolement

principe

Les *Legionella* ne peuvent pas être cultivées sur les milieux usuels. Le milieu utilisé actuellement est le Buffered Charcoal Yeast Extract additionné d'acide alpha-céto-glutarique ou BCYE alpha incubé à 35°C sous une atmosphère à 2,5 à 5 % de CO₂.

Ce milieu est rendu sélectif par l'adjonction de différents antibiotiques. On utilise le plus souvent un mélange : vancomycine, céfamandole, polymyxine B, anisomycine.

Pour les prélèvements de l'environnement, il est préconisé d'ajouter au mélange: glycine, vancomycine, polymyxine (milieu GVP).

Dans la préparation de ces milieux, il est indispensable d'apporter une attention particulière à la qualité des ingrédients et à leur ordre d'adjonction, ainsi qu'aux conditions de pH final qui doit être rigoureusement compris entre 6,85 et 6,95 [23].

Réalisation pratique

Avec des prélèvements plurimicrobiens, tels que aspirations trachéales ou lavages broncho-alvéolaires, il peut être utile de les décontaminer. Pour ce faire, l'échantillon est traité par un tampon HCl - KCl à pH 2,2.

Dans le cas d'une contamination possible par *Pseudomonas Aeruginosa*, on traitera le prélèvement par la chaleur (1 à 2 minutes à une température inférieure ou égale à 60°C).

Chaque prélèvement estensemencé sur 6 boîtes de milieu BCYE-alpha : 3 BCYE-alpha simples et 3 BCYE-alpha sélectifs. Chaque série de boîte estensemencée avec le prélèvement pur, dilué à 10⁻² et à 10⁻⁴ en eau distillée afin de diminuer la concentration en inhibiteurs naturels présents dans les prélèvements (antibiotiques ou contaminants).

En ce qui concerne les prélèvements sanguins, *Legionella* peut croître dans les milieux spéciaux pour hémoculture.

Caractères cultureux de la bactérie

Legionella est un bacille de culture difficile ne poussant que lentement (2 à 15 jours en moyenne, parfois plus dans les hémocultures). La croissance est optimale à une température de 35°C, les limites se situant entre 25 et 48°C.

Les boîtes de pétri seront examinées tous les jours (pendant 15 jours). Quand les colonies apparaissent, elles ont un aspect typique dit en verre fritté et peuvent être pigmentées. En fonction des espèces, cette pigmentation (variant du bleu au rose) pourra être plus intense sous lampe de Wood (ce n'est pas le cas de *Legionella pneumophila*). Cet aspect typique, mais non spécifique, est généralement observé pendant 24 à 48 heures. Toutes les colonies seront prélevées et réensemencées sur BCYE-alpha dépourvu de cystéine et sur gélose au sang.

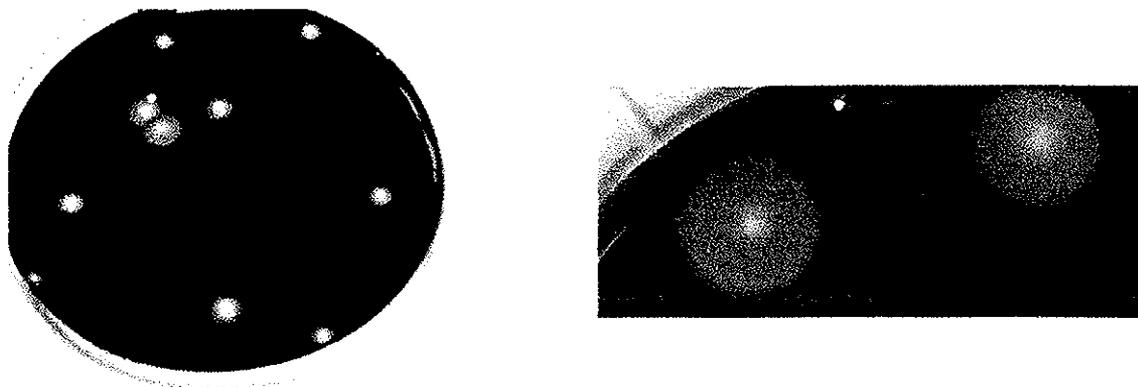


Figure 3 : Aspect de *Legionella* en culture sur gélose BCYE-alpha [3].

Une identification du genre *Legionella* peut alors être faite lorsque les arguments suivants sont réunis:

- Aspect typique de culture sur BCYE-alpha,
- Absence de culture sur BCYE-alpha dépourvu de L-cystéine, sauf pour *Legionella jordanis* et *Legionella oakridgensis*,
- production de β -lactamases,
- hydrolyse de l'hyppurate,
- liquéfaction de la gélatine,
- Absence de culture sur gélose au sang [4].

Intérêt de l'isolement

L'isolement du germe permet un diagnostic de certitude absolue, c'est la technique de référence. Il s'agit du seul argument de diagnostic biologique lorsque l'immunofluorescence directe et la sérologie sont négatives [23].

3-2) Immunofluorescence directe

Principe

Les anticorps utilisés sont dirigés contre les différentes espèces et les différents sérogroupes de *Legionella*. Ces anticorps sont conjugués à la fluoroscéine.

L'IFD peut être pratiquée sur les produits frais, ou conservés dans le formol (ou dans la paraffine).

Chez un malade traité depuis moins de trois jours, cet examen est encore possible quoique moins sensible. La lecture est toutefois plus difficile : les corps bactériens perdent leur morphologie habituelle, et, il existe une fluorescence de fond due à la lyse bactérienne.

Réalisation pratique

Plusieurs frottis en couche mince sont réalisés, l'un d'eux est coloré au Gram pour évaluer la flore dominante.



Figure 4 : Aspects de *Legionella* après coloration de Gram [3].

Pour l'immunofluorescence directe, on utilise généralement trois pools d'anticorps conjugués différents (A, B, C) :

- A : *L. pneumophila* sérogroupes 1, 2, 3 et 4
- B : *L. pneumophila* 5 et 6, *L. dumoffii* et *L. longbeachae* 1
- C : *L. gormanii*, *L. micdadei*, *L. longbeachae* 2, *L. bozemanii*

L'examen est dit positif si on voit plus de cinq petits bacilles franchement fluorescents (vert pomme) et avec une morphologie typique (souvent incurvés, polymorphes). Ces bacilles sont intra et extra-leucocytaires (figure 5).

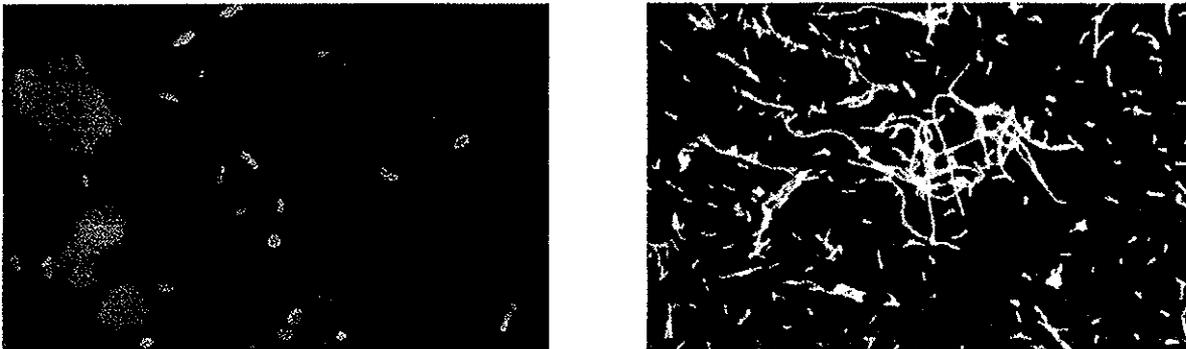


Figure 5 : Aspects de *Legionella* en immunofluorescence [3].

Intérêt - limites

L'intérêt majeur de cette technique est sa rapidité : environ une heure. Sa sensibilité est médiocre ; elle est fonction du prélèvement examiné (de 30 à 50 %). Le seuil de détection est de 10^4 UFC / mL.

Par conséquent, un examen négatif ne doit pas faire exclure la possibilité d'une infection : c'est pourquoi il est obligatoire de pratiquer des cultures.

La spécificité est bonne, mais il peut exister des réactions croisées avec *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*. Elle est améliorée par l'emploi d'anticorps monoclonaux. L'identification de *L. pneumophila* par le biais de l'immunofluorescence directe est très courante et facilement réalisable par tout laboratoire [4].

3-3) Recherche des antigènes solubles urinaires

Cette méthode permet de mettre en évidence les antigènes spécifiques du LPS de la bactérie.

Il s'agit d'une technique de détection et d'identification dans le sens où elle est spécifique de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Lp1).

Principe, réalisation pratique

Les antigènes solubles peuvent être éliminés dans les urines pendant plusieurs mois, même après une antibiothérapie adaptée.

Ces antigènes sont détectables par technique radio-immunologique ou immunoenzymologique (ELISA). Ce test utilise des anticorps monoclonaux et polyclonaux.

Intérêt de la méthode

La sensibilité du test est bonne : entre 56 et 80 %, et la spécificité est excellente : 99%. Les avantages de cette méthode sont les suivants:

- la facilité de recueil des urines,
- la précocité du diagnostic : un à trois jours après l'apparition des symptômes (d'où un facteur de bon pronostic en ce qui concerne la mise en place du traitement),
- la rapidité du diagnostic : trois heures pour un test ELISA, quinze minutes pour un test Now®,
- la mise en place d'une antibiothérapie n'influence pas le résultat du test,
- le test reste positif plusieurs mois (jusqu'à un an).

La recherche d'antigènes urinaires est réalisée dans les cas suivants :

- En association avec les techniques conventionnelles d'identification,
- pour rechercher une légionellose devant une pneumopathie nosocomiale avec présence de légionelles dans le circuit d'eau,
- en cas de suspicion d'une épidémie.

Intérêt, limites

Il s'agit d'une méthode d'identification simple et rapide, mais dont l'interprétation est souvent délicate [24].

3-4) Techniques de biologie moléculaire

1) Amplification génique

L'identification des légionelles par PCR est réalisée avec la méthode RAPD (pour Random Amplified Polymorphic DNA). Dans cette méthode, on utilise l'amorce pour amplifier des séquences distinctes, mais aléatoires de l'ADN chromosomique.

La différence avec la technique PCR "classique" vient du fait que cette méthode ne nécessite l'emploi que d'une seule amorce contre deux habituellement. Ainsi, les copies de l'amorce arbitraire se fixent, dans des conditions de stringence appropriées, aux diverses séquences qui lui correspondent au mieux, et les divers produits de cette PCR sont analysés par électrophorèse sur gel et coloration (qui révèle "l'empreinte" ou le "profil" de l'organisme).

Comme l'amorce est arbitraire, on ne peut pas prédire quelles séquences du chromosome seront copiées. On peut cependant utiliser la méthode pour faire du typage, parce que, dans des conditions données, la même amorce (avec la même polymérase) copiera les mêmes séquences du même chromosome [25].

Intérêt, limites

Cette méthode rapide permet de détecter les légionelles dans les prélèvements d'urines, les lavages bronchovéolaires, et les sérums.

Le gène amplifié est le gène mip (Macrophage Infectivity Potentiator). Il est retrouvé dans la majorité des espèces de légionelles dont *L. pneumophila*. Toutes les espèces de légionelles seront donc identifiables.

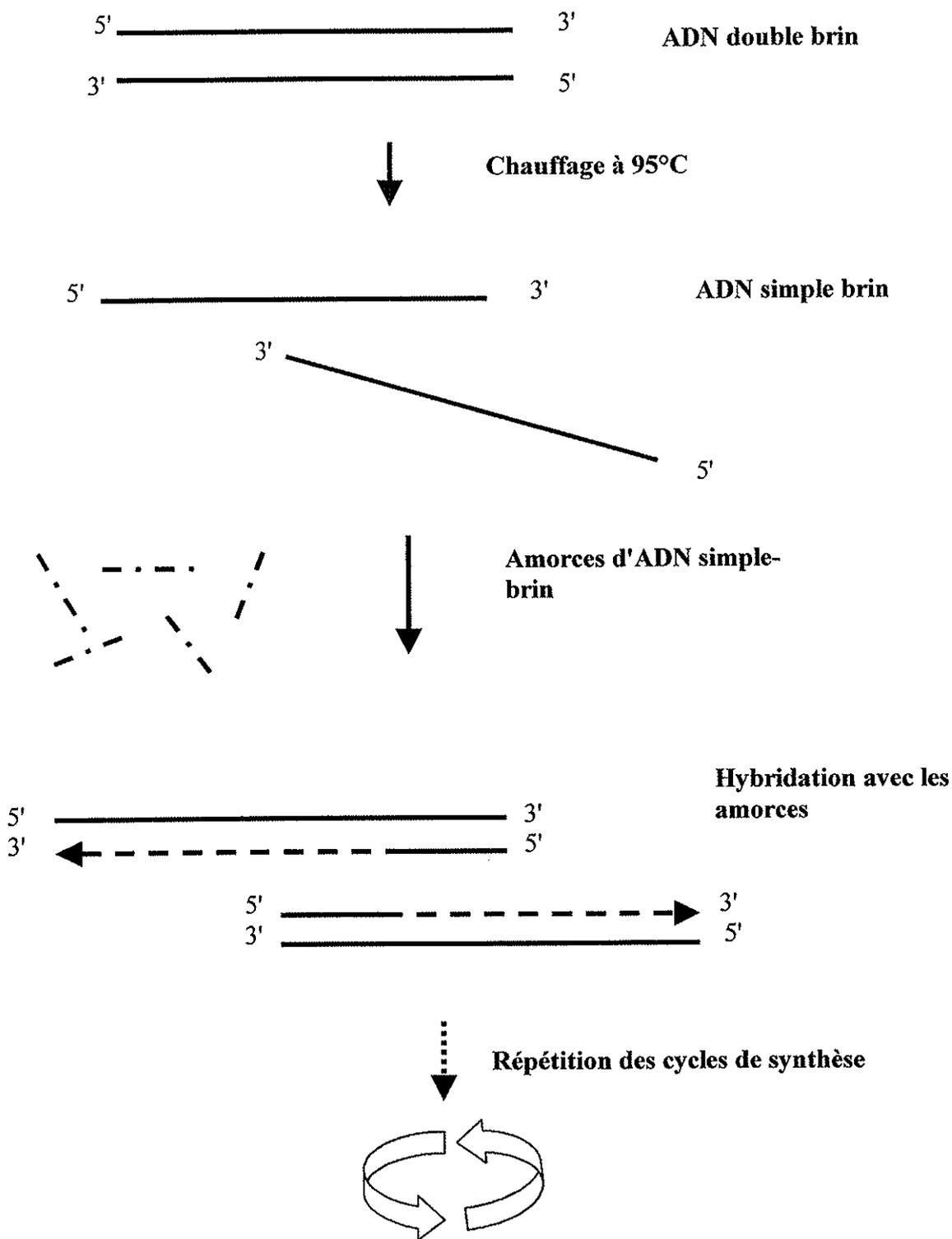


Figure 6 : schéma de la réaction de polymérase en chaîne (PCR)

2) Electrophorèse en champ pulsé : PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Principe

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique longue mais discriminante pour typer des souches, en particulier lors d'enquêtes épidémiologiques. Elle permet de comparer des souches bactériennes en fonction du profil de macrorestriction de l'ADN total. L'ADN de la bactérie *Legionella* testée est coupé par des enzymes de restriction qui reconnaissent des sites de restriction rares sur le chromosome (environ dix sites tous les millions de paires de bases), donnant de grands fragments en petit nombre (en général inférieur à 20). Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse en champ pulsé [26].

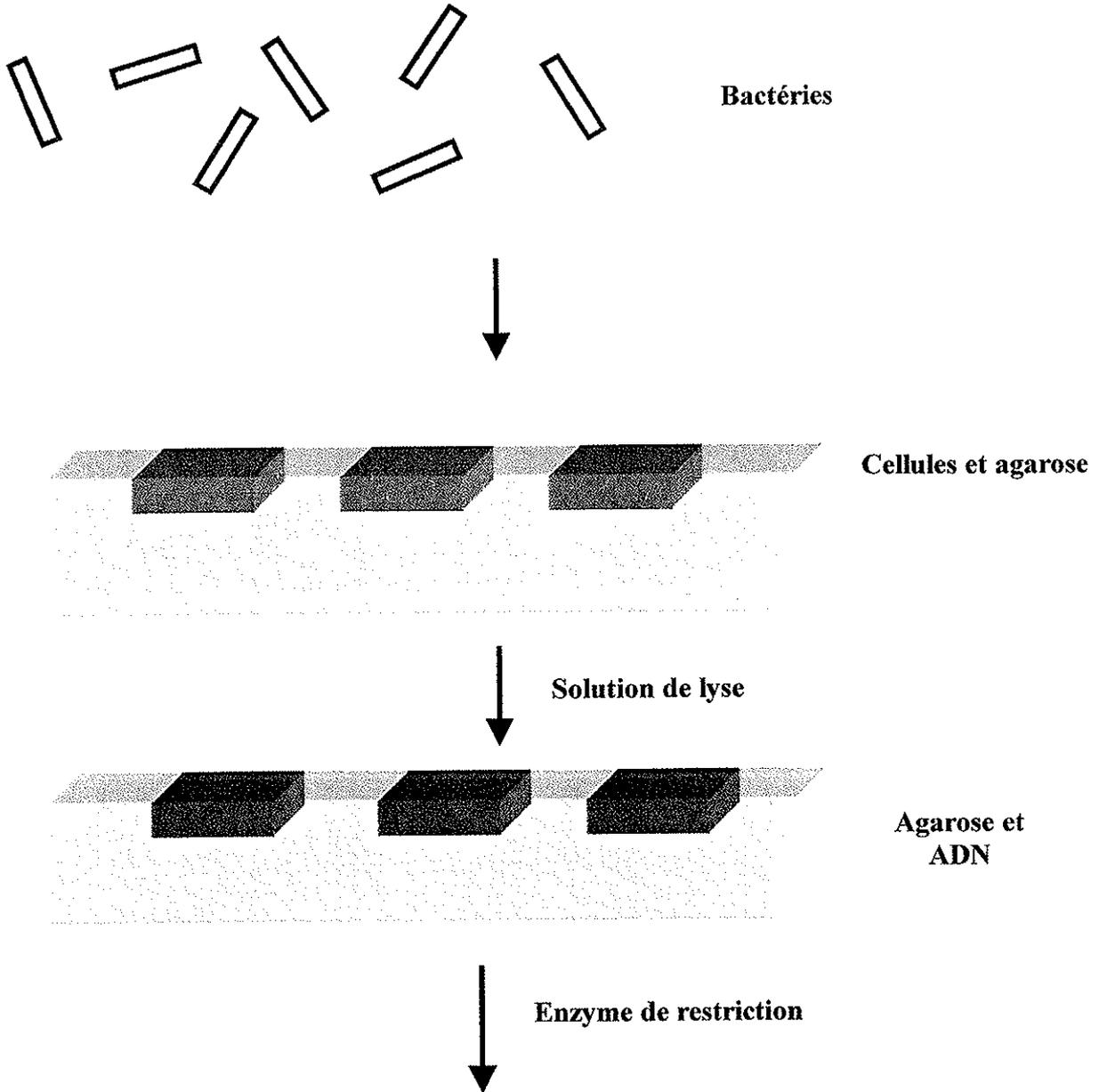
Réalisation pratique

L'électrophorèse en champ pulsé nécessite l'extraction de l'ADN total à partir des souches isolées. Un paramètre essentiel de cette technique est l'obtention d'un ADN purifié, indemne de toute coupure physique ou enzymatique. Dans cette optique, toutes les manipulations sont réalisées après inclusion des cellules bactériennes dans une matrice semi-solide d'agarose (insert) [26].

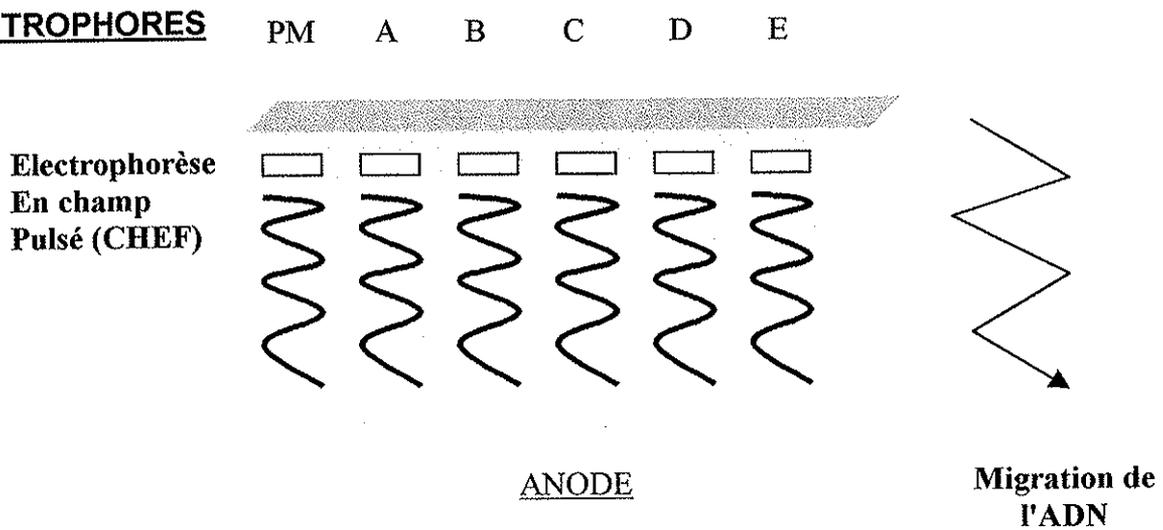
L'extraction de l'ADN total par des enzymes appropriées, et sa digestion (par des endonucléases de restriction) sont obtenues par diffusion des réactifs enzymatiques dans les mailles de l'agarose. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose en fonction de leur taille, sous l'influence de champs électriques activés alternativement (ou "pulsés"). Les cinétiques de pulsation doivent être optimisées pour chaque espèce de *Legionella* et pour chaque endonucléase afin d'obtenir une séparation électrophorétique adéquate.

Les fragments composant le profil de macrorestriction (ou pulsotype) sont colorés dans un bain de bromure d'éthidium et photographiés pour disposer d'un document archivable. Au laboratoire, les photos sont scannées, et à l'aide d'un logiciel d'exploitation, les poids moléculaires de chaque fragment sont calculés. On peut obtenir des représentations schématiques des pulsotypes et faire une analyse statistique de comparaison de ces souches [27].

PREPARATION DE L'ECHANTILLON



ELECTROPHORES



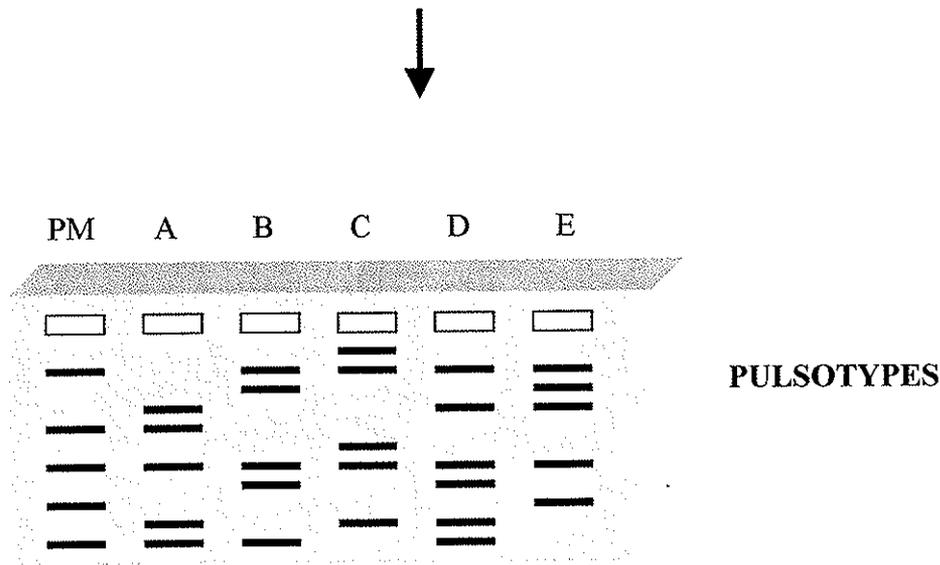


Figure 7 : schéma de la réaction d'électrophorèse en champ pulsé

3) Ribotypie

Principe

La ribotypie utilise le principe de l'hybridation avec des sondes nucléiques spécifiques reconnaissant les gènes codant pour les ARN ribosomiaux. Ce marqueur analyse le génome bactérien dans sa totalité en s'intéressant à la position des gènes codant les ARNr sur le chromosome.

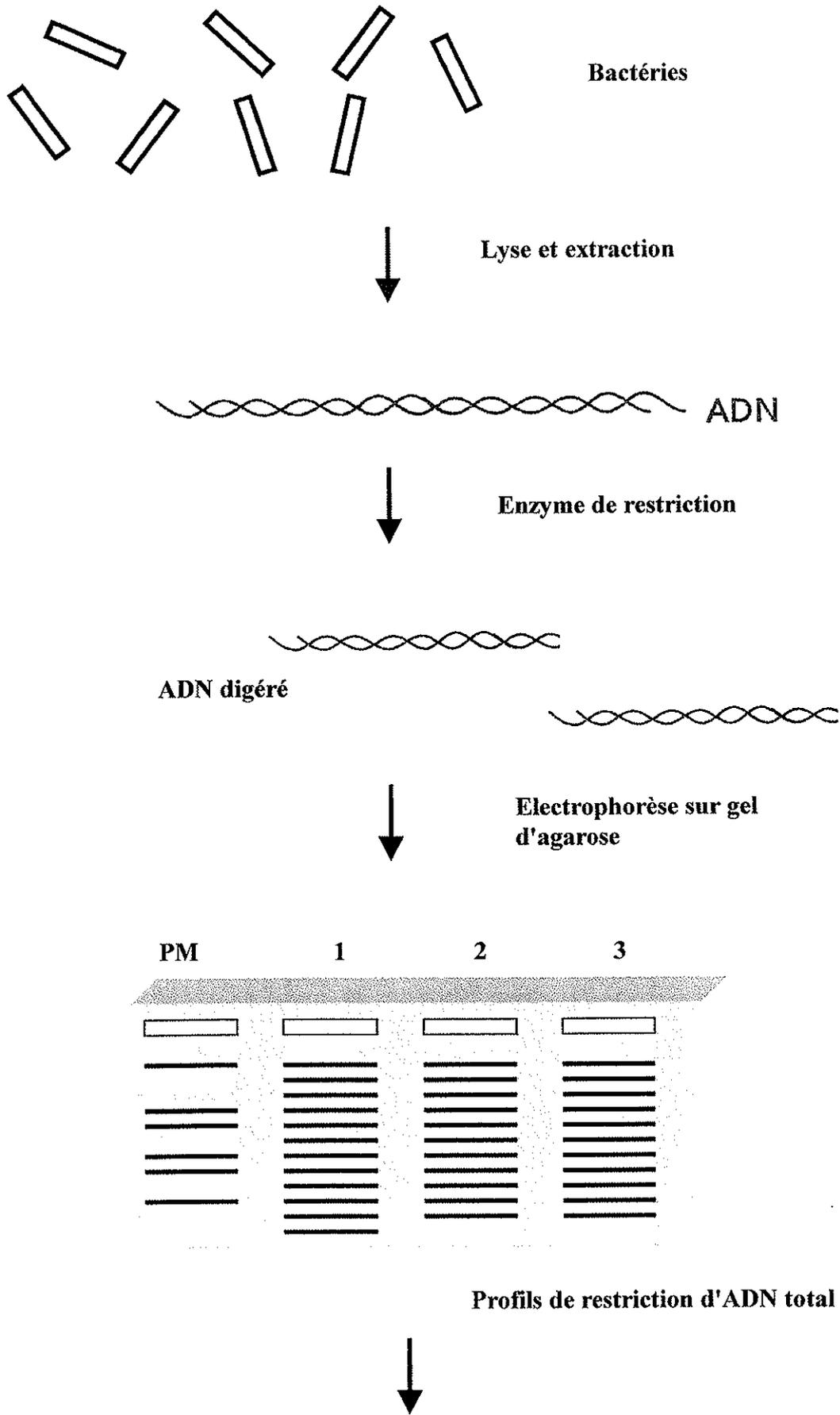
Deux caractéristiques contribuent à l'intérêt de cette technique de typage :

- Il s'agit d'un marqueur universel. Les gènes codant les ARNr sont organisés en opérons 16S-23S-5S. Ils sont conservés au cours de l'évolution des espèces bactériennes, ce qui permet l'utilisation d'une sonde nucléique universelle pour caractériser des espèces différentes
- Le polymorphisme détecté par cette sonde nucléique est lié au nombre et à la position des copies de l'opéron ribosomal, variable selon l'espèce et la sous

espèce analysée. Le nombre de copies (variant de 1 à 11) est en général proportionnel à la taille du génome et à la vitesse de croissance des bactéries. C'est ainsi que les espèces à division rapide ont plus de copies de l'opéron que les espèces à croissance lente.

Réalisation pratique

Pour mettre en évidence la variabilité des copies de l'opéron ribosomal chez les espèces bactériennes, l'ADN chromosomique est extrait puis coupé en un grand nombre de fragments à l'aide d'enzymes de restriction. La séparation de ces fragments par électrophorèse conventionnelle en gel d'agarose génère un profil de restriction spécifique de l'enzyme utilisée, ce profil est ensuite transféré sur un support membranaire. La reconnaissance sélective des gènes codant pour les ARNr sur le profil de restriction s'obtient par hybridation entre l'ADN cible et des sondes nucléiques spécifiques marquées complémentaires de ces gènes. La révélation des fragments hybridés donne lieu à un profil comportant un nombre de bandes restreint, c'est le profil de ribotypie (ou ribotype) de la souche testée (24).



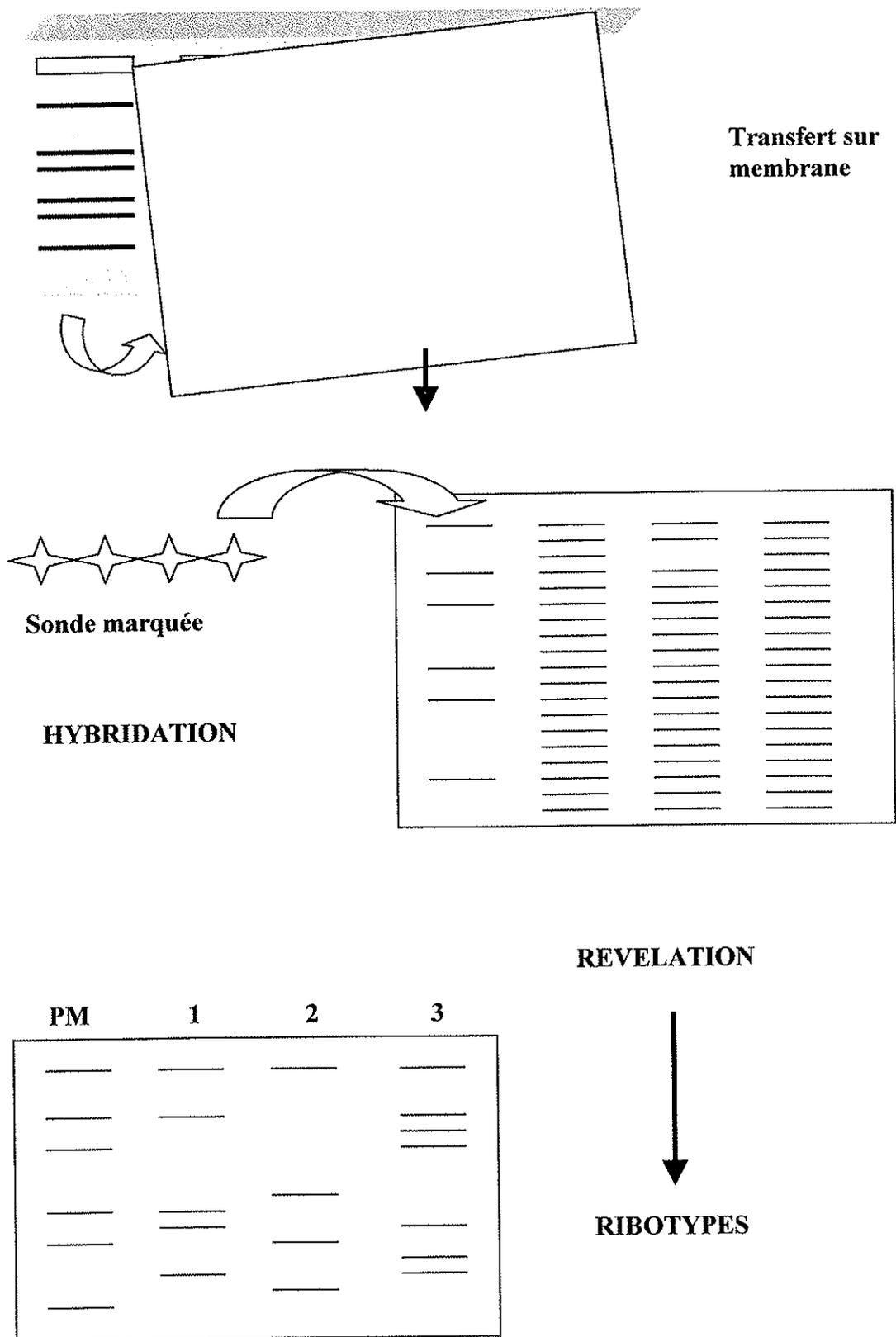


Figure 8 : schéma de la réaction de ribotypie.

3-5) Sérodiagnostic

Principe

La recherche des anticorps constitue le diagnostic indirect de l'infection.

Les anticorps spécifiques (IgG, IgM et IgA) apparaissent le plus souvent deux semaines après le début des signes cliniques, mais chez 25 % des malades, leur apparition peut être retardée à la 4^e-8^e semaine. Cette réponse anticorps peut être faible ou absente chez les sujets immunodéprimés. Puisqu'une proportion élevée de malades garde un titre anticorps élevé toute la vie, il faut insister sur l'importance de réaliser le titrage des anticorps sur deux sérums prélevés à deux ou trois semaines d'intervalle.

Une Légionellose sera affirmée par sérodiagnostic sur la vue d'une séroconversion ou d'une élévation par un facteur quatre du titre des anticorps.

La technique la plus utilisée est le titrage des anticorps par immunofluorescence indirecte [28].

Réalisation pratique

L'antigène utilisé est soit *Legionella* cultivée sur œuf embryonné et tuée par le formol (antigène de Taylor, le plus utilisé en Europe en raison de sa plus grande sensibilité), soit *Legionella* cultivée sur milieu artificiel et tuée par le formol et la chaleur (antigène de wilkinson). L'antigène est fixé sur lame, et la technique utilisée est donc l'immunofluorescence indirecte réalisée avec un conjugué fluorescent anti-gamma-globulines humaines totales.

On prélève un premier sérum le plus tôt possible, puis un sérum tous les huit jours pour observer une éventuelle séroconversion parfois tardive.

Compte tenu du nombre d'espèces et de sérogroupe de *Legionella*, il est matériellement impossible de tester en routine toutes les espèces connues. Cette étude sérologique est facilitée par l'existence de réactions sérologiques croisées entre différentes espèces de *Legionella*.

En pratique, on utilise des pools d'antigènes : *L. pneumophila* 1 à 4 et 5-6,

L. micdadei, ainsi que l'antigène monovalent *L. pneumophila* 1. En cas de positivité vis à vis d'un pool d'antigènes, un titrage est effectué vis à vis de chacun des antigènes monospécifiques.

Intérêt, limites

Ce test permet souvent de confirmer une suspicion clinique, c'est parfois le seul moyen d'établir un diagnostic (échec de l'isolement du germe). La sensibilité est bonne (75 %) et la spécificité est excellente (95 %). Néanmoins, cette méthode ne permet de réaliser qu'un diagnostic tardif en raison du délai d'apparition des anticorps (grandes variations suivant les malades). De plus, il est à noter que des réactions croisées sont sporadiquement observées chez certains malades avec *mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, et *Yersinia pestis*. Ces réactions peuvent être en partie évitées par l'utilisation d'antigènes purifiés [4,20,28].

3-6) Comparaison des méthodes de diagnostic de la légionellose

Le choix d'une méthode de diagnostic est effectué au cas par cas. Il est fonction des symptômes observés, du prélèvement à analyser, et de la précocité de mise en œuvre de ces techniques.

Les sensibilités et les spécificités des méthodes de diagnostic sont résumées dans le tableau 4.

Méthodes	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Culture (sur milieu BCYE)		
▪ Sécrétions bronchiques ou lavage alvéolaire	80-90	100
▪ Biopsie pulmonaire	90-99	100
▪ sang	10-30	100
Détection d'antigène de Lp1 dans les urines	80-99	99
Immunofluorescence directe (Lp1)		
▪ biopsie pulmonaire	80-90	99
▪ sécrétions bronchiques ou lavage bronchoalvéolaire	25-75	95-99
Sérologie		
▪ augmentation du titre	75	95-99
▪ titre unique élevé	inconnue	50-70

Tableau 4 : Sensibilité et spécificité des méthodes diagnostiques de la légionellose (d'après EDELSTEIN, 1993).

4) Recherche de *Legionella* dans l'environnement

4-1) Lieux de prélèvement

Les *Legionella* sont très fréquemment isolées dans l'environnement hydrique artificiel. Les analyses de prélèvements étant onéreuses, il est important d'orienter ces prélèvements en fonction des arguments épidémiologiques, de la structure des réseaux d'eau et de l'identification des points critiques.

Les lieux de prélèvements privilégiés sont les suivants :

- Réseau d'eau chaude sanitaire (points de puisage d'eau chaude sanitaire, partie base des ballons de stockage) ;
- Réseau d'eau froide (si la température est anormalement élevée > 25 °C)
- Installations de conditionnement d'air (condensats de batteries froides, fluides d'humidification, eau des siphons) ;
- Tours aéroréfrigérantes (eau de ruissellement) ;
- Divers : tout site susceptible de contenir de l'eau réchauffée ou des dépôts humides.

4-2) Modalités de prélèvement

Un prélèvement consiste à recueillir un litre d'eau dans un flacon stérile. Lorsque l'eau prélevée est traitée par un biocide oxydant, les flacons doivent contenir du thiosulfate de sodium à 0,50 % afin de bloquer l'action germicide dans le flacon.

Les conditions de prélèvement en terme de localisation, de flambage des éléments périphériques, d'enrichissement par stagnation ou par écouvillonnage dépendent de la finalité de la recherche et du dénombrement de *Legionella*. Plusieurs techniques de prélèvement peuvent être réalisées aux points d'usage :

- si la contamination au point d'usage dans des conditions normales d'utilisation est recherchée, le prélèvement sera fait sans flambage et en prenant le premier jet de l'eau à température d'utilisation. Si la situation la plus défavorable en terme de contamination est recherchée, un prélèvement peut être fait après stagnation d'une nuit ;
- si la contamination du réseau à l'amont du point d'usage est recherchée, les points de prélèvement doivent être flambés et le prélèvement effectué après écoulement prolongé ;
- l'incorporation au prélèvement des produits d'écouvillonnage peut être intéressante pour étudier l'écologie du point de prélèvement. Elle est recommandée dans le cadre d'une surveillance de l'installation et d'évaluation des mesures de lutte et de prévention. L'écouvillon doit être introduit le plus profondément possible à l'intérieur du robinet ou du pommeau de douche. Le

prélèvement doit être effectué par un geste circulaire répété (environ quatre fois). L'écouvillon est ensuite cassé dans le prélèvement d'eau correspondant.

Dans un souci de qualité, quelle que soit la technique adoptée, il est important d'en rechercher la reproductibilité surtout lorsqu'il s'agit de comparer les contaminations dans l'espace ou dans le temps. Des protocoles détaillés devront être créés pour les personnes chargées des prélèvements et la fiche de prélèvement pour chaque échantillon devra être complétée très soigneusement.

Sur les fichiers de prélèvement doivent être indiqués :

- la nature de l'eau analysée : eau chaude sanitaire, condensats, ... ;
- les opérations subies : traitement, mélange, ... ;
- l'identification du point de prélèvement ;
- la date, l'heure et les conditions de prélèvement.

4-3) Modalités de transport

Les échantillons prélevés doivent être transportés dans une glacière. Ils sont acheminés au laboratoire en moins de 48 heures, avec un emballage réfrigéré en période d'été. En cas d'attente, conserver à 4°C, et surtout ne pas congeler.

4-4) Méthode d'analyse

La recherche et la numération des *Legionella* dans l'eau sont effectuées selon la norme NF T 90-431 (novembre 1993). Elle permet l'obtention de résultats homogènes avec une sensibilité suffisante au regard du risque sanitaire (50 UFC/litre). Pour la détermination de la densité des légionelles, la norme analytique demande que les résidus présents dans le filtre soient récupérés dans 5 ml. Les caractéristiques de certaines eaux (turbides, ...) rendent parfois nécessaires une filtration en plusieurs étapes. La récupération ne peut alors se faire que dans 10 ml et cette opération modifie le seuil de détection qui passe à 100 UFC/l. Les résultats complets de recherche et de dénombrement sont en général disponibles en huit à dix jours.

4-5) Seuils admissibles (eaux thermales, eaux chaudes sanitaires...)

Pour les réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire il n'existe aucun texte réglementaire fixant une densité maximale admissible de *Legionella*. Il est reconnu qu'en dessous une densité de 10^3 UFC/l, le risque d'apparition de cas de légionellose est très faible. Mais ce risque varie en fonction de l'état immunitaire des personnes exposées et de la densité et durée d'exposition aux aérosols contaminés.

Pour les eaux thermales, la circulaire DGS/SD1D/92 n° 513 du 20 juillet 1992 relative à la qualité des eaux minérales dans les établissements thermaux a proposé de prendre 10^2 UFC/l comme valeur de référence non impérative au-delà de laquelle un suivi attentif de la situation doit être réalisé. A partir de 10^3 UFC/l, des mesures de lutte et de prévention doivent être prises pour les usages et soins occasionnant la production d'aérosols.

Etant donné que ces seuils ont été fixés en fonction du risque sanitaire, il est préférable que les techniques de prélèvement puissent traduire la contamination au point d'usage dans des conditions normales ou défavorables d'utilisation.

L'interprétation des résultats devra se faire en tenant compte de l'expertise préalable du réseau. Ces résultats serviront également de référence pour évaluer l'efficacité des mesures prises.

4-6) Comparaison des souches cliniques et environnementales

La comparaison des souches isolées chez les malades avec des souches isolées dans l'environnement par des techniques de typage moléculaire peut servir à confirmer la source de contamination. Cependant, prise isolément sans argument épidémiologique, l'identité des souches n'est pas suffisante pour établir une relation causale.

Par conséquent, l'enquête environnementale devra toujours faire l'objet d'un rapport écrit indiquant les principaux résultats de l'enquête et les mesures envisagées de

réduction du risque (fermeture, restrictions d'activités ou d'usage d'eau, mise hors service de locaux ou d'équipements, nettoyage, désinfection, protocoles d'entretien et de surveillance). Compte tenu des délais d'analyse pour la recherche des *Legionella*, il sera souvent préférable de ne pas attendre les résultats d'analyse pour formuler les premières recommandations de lutte et de prévention si les éléments fournis par les enquêtes épidémiologiques et environnementales suffisent pour les définir [29].

IV) Epidémiologie

1) caractéristiques épidémiologiques

1-1) Fréquence

La proportion de légionelloses parmi les pneumopathies communautaires varie de 0,5 % à 5 %.

La prévalence des anticorps contre *L. pneumophila* sérogroupe 1 (titre > 256) varie de 1 à 16 % dans la population adulte en bonne santé, selon les estimations réalisées.

Le nombre de cas diagnostiqués en France en 1995 a été évalué à 530 cas, 807 en 2001 [30], soit une incidence de 0,9/100 000. Le nombre réel de cas de légionellose est estimé à 2 000 à 3 000 cas annuels [31].

Les légionelloses observées dans tous les pays où elles sont recherchées apparaissent sous trois formes épidémiologiques :

- anadémies (exemple : Philadelphie en 1976, Pontiac en 1968) c'est à dire une contamination multiple sans contagion interhumaine ;
- endémies (hôtels, hôpitaux) : ces situations sont souvent dues à des retards de diagnostic, ou à des difficultés d'éradication de la source infectieuse ;
- cas sporadiques : les plus fréquents.

Le taux d'attaque (nombre de malades / nombre de personnes exposées) est plus faible dans les épidémies de maladie des légionnaires (0,1 % à 5 %) que dans celles de fièvre de Pontiac (95 %).

En raison de la diversité des méthodes utilisées, il est difficile de connaître précisément l'incidence des légionelloses. Les *Legionella* seraient responsables de moins de 1 % des pneumopathies soignées à domicile, 5 à 15 % de celles hospitalisées et 15 à 25 % des pneumopathies nosocomiales [31].

1-2) Réservoir

Les légionelles sont des bactéries présentes dans le milieu extérieur et notamment dans l'eau douce. Elles peuvent être isolées de lacs, de rivières, de canalisations d'eau, de systèmes de climatisation, d'humidificateurs, de nébulisateurs, de bacs de réserve d'eau, de fontaines d'eau, de machines à glace, de piscines, de bains à remous, d'équipements de stations thermales...

L'importance de la colonisation des réseaux d'eau ou des bacs d'eau est fonction de nombreux facteurs : la longueur des tuyauteries, la nature des matériaux, la présence de boucles ou de réservoirs permettant une stagnation de l'eau. L'ancienneté des réseaux peut être la cause de formation de biofilms (cf annexe 5) permettant la nutrition des légionelles. La température de l'eau comprise entre 35 et 45 °C permet une multiplication importante des bactéries.

Dans l'eau, les légionelles peuvent être à l'état libre ou associées à des amibes (*Acanthamoeba* sp., *Didasculus* sp., *Echinamoeba* sp., *Hartmanella* sp., *Mayorella* sp., *Naegleria* sp., *Schizopyrenus* sp., *Vahlkampfia* sp. ...) et à des protozoaires ciliés tels ceux du genre *Tetrahymena*. Selon les espèces de légionelles, la spécificité d'hôte est large ou étroite.

L. pneumophila est apte à infecter de nombreux micro-organismes eucaryotes ce qui expliquerait qu'elle soit largement répandue et que ce soit l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections de l'homme. Les légionelles pénètrent dans les micro-organismes eucaryotes, se multiplient dans des vacuoles et peuvent provoquer la mort de la cellule hôte. Le parasitisme des protozoaires par les légionelles permet donc une pollution importante du milieu extérieur. Dans les vacuoles, les légionelles sont mobiles, elles ont une taille inférieure à la taille des bactéries cultivées sur les milieux gélosés et elles acquièrent des propriétés particulières. Après avoir été libérées, elles sont plus résistantes aux conditions d'environnement défavorables (acidité, température, pression osmotique, désinfectants, antiseptiques) et leur pouvoir infectieux pour des cellules de mammifères est plus important. De plus, la présence des légionelles dans les vacuoles des protozoaires leur permet de survivre dans les eaux froides et leur

présence dans les kystes ambiants leur permet de résister à la dessiccation, aux biocides et à de hautes températures [29].

Les sources de contamination les plus souvent incriminées dans les épidémies sont :

- les circuits de distribution d'eau chaude sanitaire alimentant des douches ;
- les systèmes de climatisation et les tours aéroréfrigérantes ;
- les bassins utilisés pour la détente comme la balnéothérapie, ou le thermalisme dans lesquels l'eau est chaude (> 30°C) et agitée (bains à remous, bains à jet,...) ;
- les eaux thermales ;
- et les fontaines décoratives

Parmi toutes ces sources, les circuits d'eau chaude sanitaire représentent la cause la plus fréquente d'infections. Les légionelles sont isolées dans 30 à 60 % des prélèvements réalisés dans les réseaux d'eau des hôpitaux, des hôtels, et des lieux d'habitation. Dans une étude anglaise du Public Health Laboratory Service, l'eau des tours aéroréfrigérantes est contaminée dans 54 % des cas [32].

1-3) Transmission

La transmission s'effectue par voie aérienne par inhalation d'eau contaminée diffusée en aérosol.

Aucun cas de transmission interhumaine n'a été rapporté.

D'autres modes de transmission sont possibles (ingestion), mais n'ont pas été prouvés [33].

1-4) Incubation

La durée d'incubation varie selon la forme clinique de la maladie. Elle peut aller de 5 heures à 3 jours pour la fièvre de Pontiac (habituellement 24 à 48 heures), à 2 à 10 jours pour la maladie des légionnaires (habituellement 5 à 6 jours) [34].

1-5) Facteurs de risque individuels

Les facteurs de risque de développer une légionellose sont les suivants :

- âge croissant,
- sexe masculin (sex-ratio M/F = 2,5),
- tabagisme,
- alcoolisme,
- immuno-dépression, cancer, diabète, corticothérapie,
- affections respiratoires chroniques.

11-6) la légionellose chez les animaux

Bien que les légionelles soient largement répandues dans le milieu extérieur, les légionelloses sont rares chez les animaux.

Expérimentalement, le rat, le cobaye, la gerbille, la souris, le hamster et le lapin sont sensibles après une inoculation par voie intrapéritonéale alors que la poule, la caille et le pigeon sont résistants. Des cobayes, utilisés comme animaux sentinelles et placés dans un système d'air conditionné contaminé, ont présenté des signes d'infections avec mise en évidence de *L. pneumophila* dans les poumons de quelques animaux.

Des enquêtes sérologiques, concernant le plus souvent un unique sérum, ont été réalisées chez des espèces domestiques (bovins, chevaux, porcs, moutons, chèvres, chameaux, chiens et lapins) ou sauvages (antilopes, buffles, wapitis, éléphants, hippopotame, zèbres, élans, lions, hyènes, alligators, divers primates, rongeurs) par fixation du complément, agglutination ou immunofluorescence.

Les animaux sauvages sont généralement séronégatifs alors que les résultats obtenus avec les animaux domestiques varient selon les études. En cas de séropositivité, les titres obtenus sont faibles et l'existence de réactions croisées n'est pas toujours exclue.

D'une manière générale, seul un faible pourcentage de bovins, de porcs, de petits ruminants, de lapins ou de chiens apparaissent séropositifs alors que les chevaux semblent plus fréquemment contaminés (plus de 30 p. cent des animaux peuvent être séropositifs). Toutefois, aucune souche du genre *Legionella* n'a été isolée chez le cheval et l'inoculation expérimentale, par voie intraveineuse ou par aérosol, d'une souche de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ou séro groupe 3 provoque des signes cliniques et histologiques modérés (fièvre et lymphopénie transitoires, légère adénopathie généralisée, quelques signes d'inflammation pulmonaire) mais la souche bactérienne ne peut être isolée du sang ou de l'appareil respiratoire. En revanche, les animaux présentent une séroconversion et les anticorps persistent au moins quatre mois.

En recherchant des légionelles par un test d'immunofluorescence indirecte, Boldur *et al.* (1987) ont obtenu un résultat positif sur 17 % des poumons de veaux autopsiés et sur 3 % des poumons de veaux prélevés à l'abattoir. Quinze tests ont été positifs pour *Legionella pneumophila*, sept pour *Legionella gormanii*, deux pour *Legionella bozemaniae* et un test a été positif à la fois pour *Legionella pneumophila* et pour *Legionella gormanii*.

Dans la discussion de leur article, les auteurs soulignent que certaines des réactions positives peuvent être dues à des communautés antigéniques croisées. A partir des poumons de deux veaux autopsiés, provenant de deux élevages différents, il a été possible d'isoler une souche de *Legionella pneumophila*. L'un des animaux ne présentait aucune lésion particulière à l'autopsie et l'autre était un animal cachectique atteint de péritonite sérofibrineuse. Les deux souches de légionelles ont été isolées à l'état pur des poumons mais une souche de *Salmonella* sp. et une souche de *Escherichia coli* K99 ont été isolées de l'intestin du premier animal et une souche de *Salmonella* Dublin a été isolée du foie et de la rate du deuxième veau. Boldur *et al.* soulignent que la mort des animaux ne semble pas due à une légionellose et ils n'excluent pas la possibilité d'une contamination, à partir du milieu extérieur, lors de la phase d'agonie.

En fait, **il semble qu'un unique cas d'infection animale ait été décrit**. Il concerne un veau de 20 jours mort après avoir développé des signes respiratoires. Les examens *post-mortem* ont révélé une pneumonie fibrineuse, localisée aux lobes

pulmonaires, la présence de macrophages et de neutrophiles dans la lumière alvéolaire, la présence d'un exsudat inflammatoire dans les bronchioles et la présence de nombreux bacilles dans les macrophages alvéolaires. Les examens bactériologiques ont permis d'isoler une souche de *L. pneumophila* séro-groupe 1 associée à quelques rares colonies de *Arcanobacterium pyogenes*. La source de contamination semble être du lait souillé par l'eau d'un bain-marie utilisé pour le réchauffage. En effet, l'eau du bain-marie contenait des *Naegleria* sp. et des *Acanthamoeba* sp.. *L. pneumophila* a été isolée des dépôts présents sur le fond de l'instrument. L'animal se serait infecté soit par voie respiratoire (inhalation de gouttelettes de lait) soit par voie digestive. Une contamination par voie respiratoire semble plus probable car elle explique la présence des lésions localisées aux lobes pulmonaires crâniens.

En conclusion, les légionelloses semblent excessivement rares chez les animaux à moins qu'elles ne soient pas diagnostiquées. En effet, les techniques nécessaires à l'isolement des *Legionella* sp. (Cf. *infra*) ne sont pas utilisées en routine par les laboratoires d'analyses vétérinaires. Toutefois, les résultats des examens sérologiques et les résultats de quelques études bactériologiques bien conduites ne plaident pas en faveur d'un rôle important des légionelles en pathologie animale. Une transmission d'individus à individus n'a jamais été observée si bien qu'un animal infecté ne devrait pas représenter un danger pour l'homme. Dans l'état actuel de nos connaissances, les légionelloses ne sont pas donc pas des zoonoses [35].

2) surveillance de la légionellose en France

La surveillance de la légionellose en France repose sur plusieurs systèmes complémentaires représentés sur la figure 9.

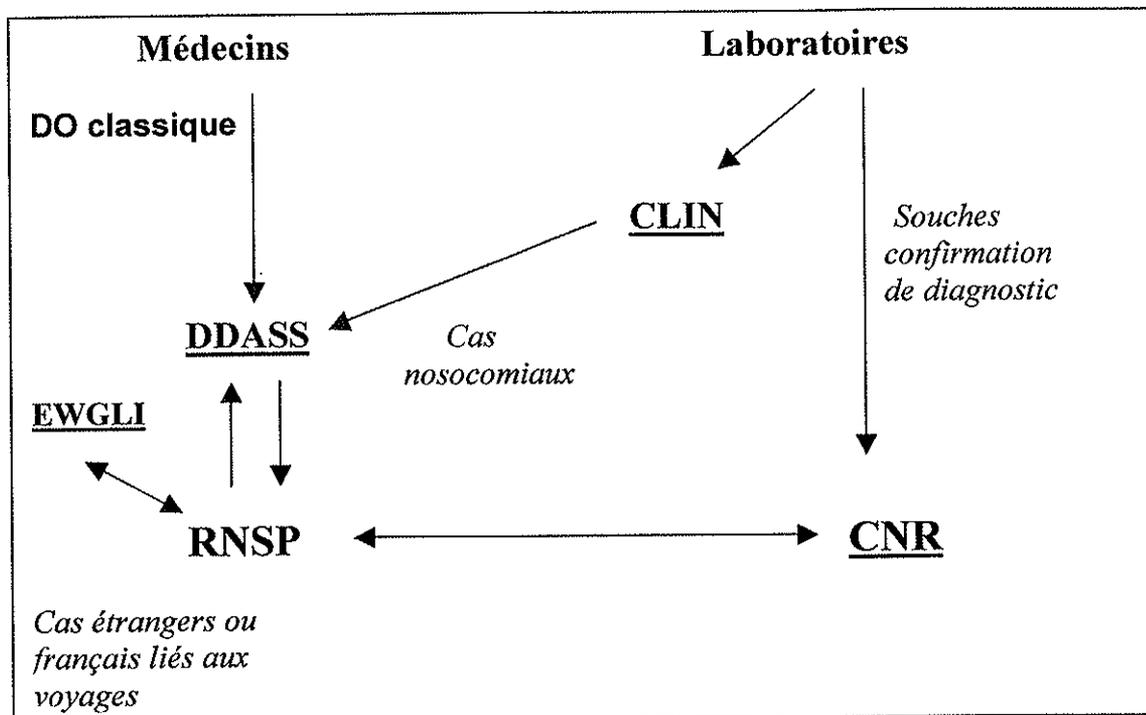


Figure 9 : Surveillance de la légionellose en France

2-1) Déclaration obligatoire (DO)

La déclaration obligatoire a pour objectif de suivre l'évolution de l'incidence, de détecter les cas groupés et d'orienter les mesures de prévention.

La déclaration se fait auprès des médecins inspecteurs de Santé Publique des DDASS par l'intermédiaire du formulaire de déclaration obligatoire décrit dans l'annexe 4.

Depuis le début de l'année 1996, ce système est coordonné au niveau national par le réseau National de Santé Publique. La performance de ce système est très médiocre, tant au niveau du taux de déclaration (estimé à 10 % en 1995) que de la qualité des informations recueillies. Des mesures d'amélioration de ce système ont été prises en 1997 :

- nouvelle définition de cas,
- nouvelle fiche de déclaration,
- amélioration du signalement des cas,
- et diversification des sources d'information.

2-2) Centre national de référence (CNR)

Le CNR des *Legionella*, nommé par le ministre chargé de la santé a des missions d'expertise biologique, d'entretien d'une collection bactérienne et d'une sérothèque, de fourniture d'antigènes de référence et de contribution à la surveillance épidémiologique. A ce titre, il reçoit des souches et des sérums accompagnés d'informations sur les cas ayant été diagnostiqués en laboratoire.

Le CNR assure également une expertise pour les souches isolées dans l'environnement. Ainsi, dans le cadre d'investigation de cas groupés, le CNR peut comparer, par des méthodes de typage moléculaire, les souches isolées chez les malades et dans l'environnement [36].

2-3) Comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN)

Ces comités sont chargés dans chaque établissement hospitalier de la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. Lors de l'investigation, de phénomènes épidémiques, les CLIN peuvent demander l'aide méthodologique des centres de coordination interrégionaux (CCLIN).

2-4) Réseau européen de surveillance des légionelloses acquises lors des voyages

A ces systèmes, s'ajoute un réseau européen de surveillance des légionelloses acquises lors des voyages (European Working Group for *Legionella* infections, **EWGLI**).

La France participe à ce réseau et, à ce titre, fournit et reçoit des informations sur les cas de légionelloses acquises lors de voyages en France ou à l'étranger.

2-5) Définition de cas

- Cas de légionellose

Les signes cliniques et/ou radiologiques de pneumopathie sont accompagnés de l'un des signes biologiques suivants.

Cas confirmé :

- identification de *Legionella* par culture ou par immunofluorescence directe dans un prélèvement clinique ;
- présence d'antigènes solubles de *Legionella* dans les urines ;
- augmentation des titres d'anticorps de quatre fois (soit deux dilutions) avec un deuxième titre minimum de 128.

Cas possible :

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

- Cas groupés de légionellose

Des cas sont dits groupés si au moins deux cas, sont survenus dans un intervalle de temps inférieur à six mois, chez des personnes ayant fréquenté un même lieu. Au moins un de ces cas doit être confirmé.

Si l'intervalle de temps entre les cas est supérieur à six mois, on parlera de cas liés qui ont une importance épidémiologique moindre que les cas groupés.

- Légionellose nosocomiale

L'origine nosocomiale peut être considérée comme certaine si le malade a séjourné dans un établissement pendant les dix jours précédant le début des signes cliniques.

L'origine nosocomiale peut être considérée comme probable si le malade a séjourné dans un établissement pendant au moins un jour dans les dix jours précédant le début des signes cliniques.

3) investigation d'un cas isolé de légionellose

Les objectifs de cette investigation vont être de confirmer le diagnostic, d'identifier les lieux fréquentés par le malade qui constituent une source potentielle d'infection, de rechercher d'autres cas dans l'entourage et de prendre des mesures systématiques de prévention (figure 10).

IV-3-1) Confirmation du diagnostic

La première étape doit vérifier la confirmation du diagnostic de légionellose. Pour les cas considérés comme possibles (c'est à dire n'ayant pas une augmentation significative des anticorps), il est nécessaire de s'assurer que l'intervalle entre les deux prélèvements sanguins est au moins égal à trois semaines. Si cet intervalle est plus court, il est souhaitable d'obtenir une nouvelle sérologie pour augmenter les chances de mettre en évidence une éventuelle séroconversion. Pour des cas récents, une confirmation rapide peut être obtenue par la recherche d'antigènes urinaires.

IV-3-2) Identification des expositions à risque

Il est nécessaire d'obtenir une description précise des lieux et dates de séjour du malade pendant les dix jours précédant le début des signes cliniques. Cette étape doit permettre de déterminer si la légionellose est d'origine nosocomiale ou communautaire. Dans ce dernier cas, il est important de rechercher la fréquentation de « lieux à risque », et la notion de voyage récent en France ou à l'étranger.

1) Légionelloses nosocomiales :

Elles doivent faire l'objet d'une enquête par le comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN), si besoin en liaison avec le centre de coordination régional (CCLIN). Comme précédemment, on recherchera d'autres cas de légionellose confirmés ou possibles.

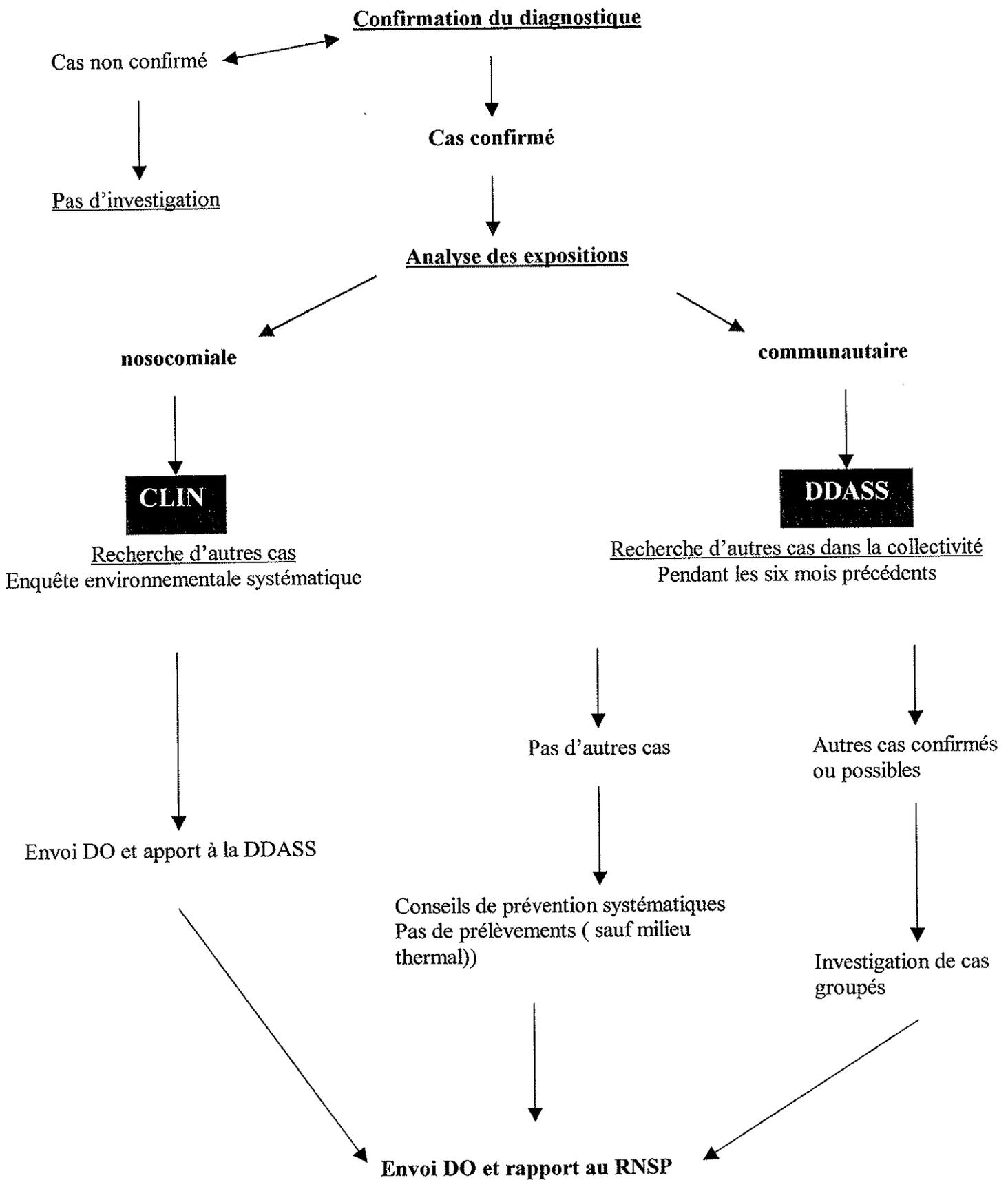


Figure 10 : Démarche d'investigation d'un cas isolé de légionellose [37].

Même si le cas est isolé, une étude environnementale est indispensable :

- rechercher une exposition à des soins « à risque » (humidificateurs d'oxygénothérapie, aérosols,...),
- vérifier la maintenance des réseaux d'eau chaude sanitaire et des éventuelles tours aéro-réfrigérantes avec l'ingénieur hospitalier,
- surveiller la contamination microbiologique du circuit d'eau chaude sanitaire desservant le circuit concerné,
- comparer les souches isolées chez le malade et dans l'environnement.

Un rapport de l'enquête devra être adressé à la DDASS pour compléter les données de déclaration obligatoire [38,39].

2) Légionelloses communautaires :

La survenue d'un cas isolé de légionellose, même s'il ne peut être attribué avec précision à une source de contamination devra faire l'objet de recommandations systématiques de prévention. Il est donc nécessaire pour chaque cas de recenser les expositions potentielles. En fonction du contexte, la réponse sera adaptée :

- **Cure thermale** : l'enquête environnementale doit être systématique avec un renforcement du contrôle analytique des eaux thermales de la station fréquentée. Il est également nécessaire de s'assurer que la source d'infection n'est pas extérieure à l'établissement (hôtel par exemple).
- **Milieu de travail** : une vérification de la maintenance des éventuelles tours aéro-réfrigérantes des systèmes de climatisation doit être effectuée. Une enquête sur l'utilisation du réseau d'eau chaude sanitaire est également nécessaire, de même que la vérification de la maintenance des installations.
- **A la suite d'un voyage** : ces cas représentaient environ 10 % des cas français déclarés entre 1987 et 1995. Le signalement par EWGLI des cas survenus chez les étrangers à la suite d'un séjour en France augmente la fréquence de cette situation. Il est fréquent de constater que les cas ont fréquenté plusieurs hôtels au cours de leur voyage, ce qui multiplie les sources potentielles d'infection ; il est donc important de se limiter aux établissements fréquentés dans les 2 à 10 jours précédant le début des

signes cliniques. Dans ces établissements, on veillera à l'application des « bonnes pratiques d'entretien d'un réseau d'eau chaude sanitaire » et à la vérification de la maintenance des éventuels tours aéro-réfrigérantes, bains à remous, et fontaines décoratives. Il n'est pas souhaitable de rechercher des *Legionella* dans l'environnement [30,38].

4) investigation épidémiologique de cas groupés

Cette investigation est la suite logique de l'étape précédente lorsque deux ou plusieurs cas ont été identifiés. Son objectif est d'identifier une source commune d'infection pour adapter les mesures de prévention.

L'étude épidémiologique des cas groupés de légionellose est habituellement assez complexe pour plusieurs raisons : cas relativement peu nombreux et fréquemment espacés dans le temps, confirmation du diagnostic souvent incomplète, multiplicité des expositions, difficultés à mesurer l'intensité et la durée des expositions.

4-1) Etude descriptive

- Définir et identifier les cas est la première étape de cette étude : il est préférable de se limiter aux cas confirmés ou possibles. Lorsque l'épidémie est récente, les cas possibles (c'est à dire ayant uniquement un titre élevé isolé) devraient faire l'objet d'une recherche d'antigènes urinaires.

Dans certaines circonstances, l'identification de cas de légionellose peut être associée à une augmentation de cas de pneumopathies en milieu communautaire : une augmentation significative peut être définie par une incidence supérieure à 2/1000 personnes sur une période de six mois et en milieu hospitalier, par une proportion de pneumopathies nosocomiales supérieure à 1 % des admissions.

Dans ce cas, il est nécessaire :

- ✓ d'éliminer une autre étiologie (grippe par exemple) ;
 - ✓ de réaliser une recherche d'antigène soluble urinaire chez les cas récents (moins de deux mois) ;
 - ✓ d'identifier les personnes ayant eu un prélèvement de sérum, quel qu'en soit le motif, à la phase aiguë de la maladie. Il faut alors obtenir le sérum correspondant (conservé normalement pendant un an par les laboratoires), obtenir un nouveau prélèvement sanguin au moment de l'enquête plus de trois semaines après le premier prélèvement et analyser les deux sérums dans le même laboratoire.
-
- Il est nécessaire ensuite de rechercher des dénominateurs de population dans la collectivité afin de pouvoir calculer des taux d'incidence, en particulier par âge et par sexe.

 - Il faut représenter graphiquement les distributions des cas dans le temps comme nous le montre la figure 6. Une représentation graphique de la distribution des cas dans l'espace est également très utilisée (figure 7), et permet de mettre en cause ou non un établissement ou une structure susceptible de relarguer dans l'atmosphère des légionelles (hôpitaux, fontaines, tours aéroréfrigérantes).

 - La dernière phase consiste à formuler des hypothèses : afin d'examiner ce que les malades peuvent avoir en commun, toutes leurs activités pendant les dix jours précédant leur maladie doivent être relevées méticuleusement : type de soins si cure thermale, n° de chambre dans les hôtels,... Ces hypothèses sur les sources d'infection peuvent être très difficiles à formuler, notamment lors de contamination en plein air par des tours aéroréfrigérantes [36].

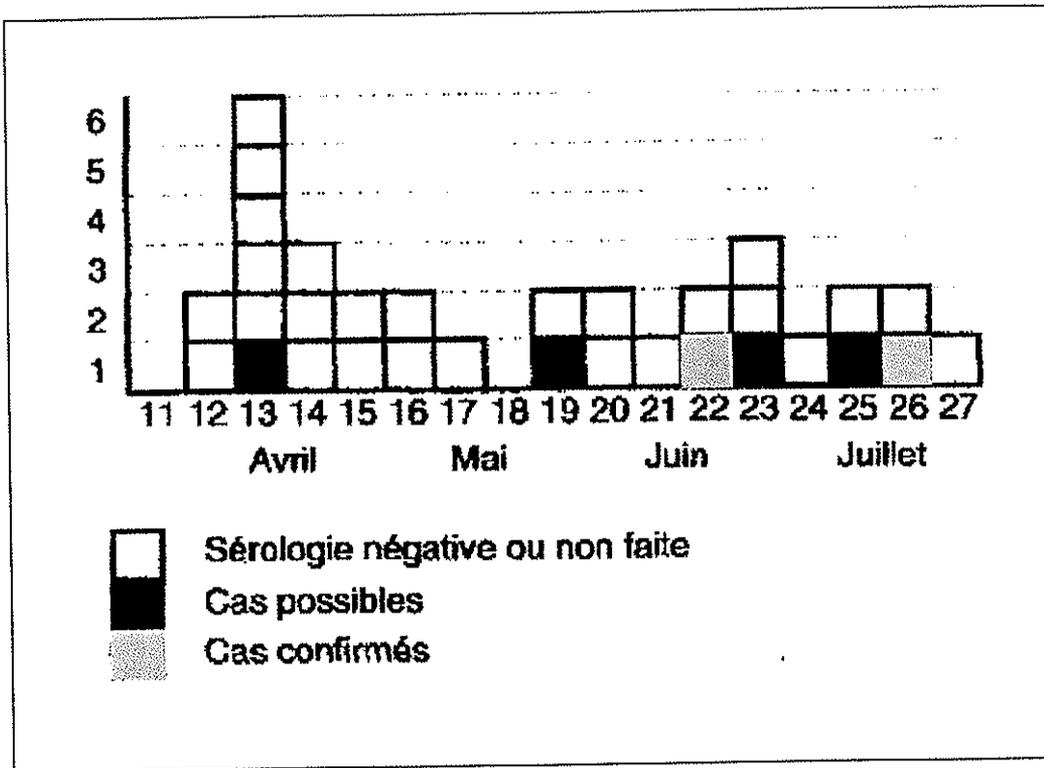


Figure 11 : Représentation temporelle des cas de pneumopathies.

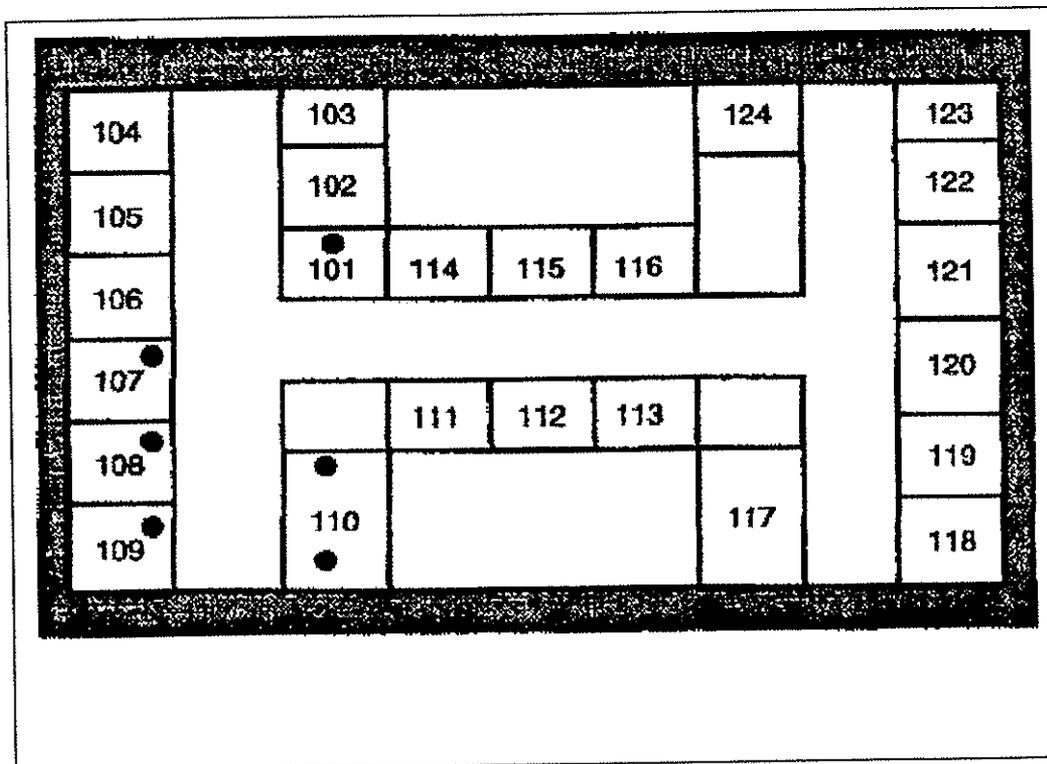


Figure 12 : Représentation spatiale des cas de pneumopathies (plan du service hospitalier).

4-2) Etude analytique

Il ne suffit pas d'observer fréquemment un facteur d'exposition chez les malades, encore faut-il qu'il soit moins fréquemment observé chez les personnes non-infectées pour pouvoir mettre ce facteur en cause. On est donc amené à comparer les cas à des cas témoins [38].

Cette étape peut nécessiter une aide méthodologique disponible en fonction du contexte, dans les structures suivantes : CCLIN, cellules inter-régionales d'épidémiologie (CIRE), RNSP.

L'étude analytique doit respecter les points suivants :

- Sélection de témoins : les témoins doivent avoir eu la possibilité d'être exposés à la source de contamination et ne doivent pas avoir eu de signes cliniques de pneumopathie.
- Hypothèses testées, questionnaires : le questionnaire est identique pour les malades et les témoins ; il doit détailler toutes les hypothèses formulées et être suffisamment précis sur les dates et durées d'exposition.
- La comparaison des expositions entre les cas et les témoins fait appel au calcul d'odds ratios (ou rapports de cotes) et à des tests statistiques. La puissance de ces tests risque d'être très limitée lorsque le nombre de cas est faible.

4-3) Discussion

Depuis 1997, le nombre de cas déclarés de légionelloses ne cesse d'augmenter. L'amélioration des méthodes de diagnostic, une meilleure approche de la maladie ainsi qu'une meilleure adhésion des cliniciens à la déclaration obligatoire peuvent expliquer cette tendance, cependant, ce nombre de cas reste inférieur au nombre de cas estimé par des études d'exhaustivité.

Il est important de continuer à sensibiliser les cliniciens à l'intérêt de la déclaration obligatoire. Tout cas de légionellose devrait être signalé à la DDASS sans délai,

conformément au décret 99-363 qui précise les modalités de transmission des données des maladies à déclaration obligatoire.

Un fait marquant de l'année 2001 est la diminution significative du nombre de cas. Ceci peut refléter l'impact des mesures prises par les établissements de santé pour contrôler le risque « légionelle », et l'impact de la responsabilisation sur un plan juridique de ceux-ci.

Un manque de recul certain nous empêche toutefois de tirer les conclusions de cette baisse. Il reste en effet à déterminer s'il s'agit d'une tendance qui va se répercuter sur les années suivantes, ou s'il s'agit d'une diminution ponctuelle.

V) Pathologie

1) manifestations cliniques

Cliniquement, les infections chez l'homme évoluent sous trois formes différentes.

1-1) La maladie des légionnaires,

La légionellose peut revêtir un aspect aigu lobaire pouvant ressembler à une pneumonie lobaire à pneumocoque. Elle présente souvent un aspect alvéolo-interstitiel et parfois interstitiel pur. Elle peut alors être confondue avec une pneumonie atypique à *Mycoplasma*, à *Chlamydiae*, à *Coxiella burnettii* ou à virus.

Après quelques jours d'évolution d'une pneumonie, il n'est pas toujours facile cliniquement de distinguer une pneumonie à pneumocoque d'une pneumonie atypique, notamment à *Legionella*. Le point clinique le plus important est le mode d'installation des symptômes les premier jour. En effet, la pneumonie à pneumocoque a presque toujours un début très brutal en quelques heures, alors que les pneumonies atypiques, incluant la légionellose, ont un début habituellement plus progressif, s'installant sur deux à trois jours. Certains signes peuvent orienter vers le diagnostic de légionellose, en particulier, la survenue de troubles neurologiques et digestifs.

Les premiers symptômes sont donc la survenue d'une pneumopathie s'apparentant à un syndrome pseudo-grippal dont le début est progressif : sensation de malaise, céphalées, myalgies, altération de l'état général, frissons, fièvre (la température dépassant 40°C chez plus de la moitié des malades), toux, hémoptysie, douleur thoracique, dyspnée, nausées.

Des troubles digestifs surviennent par la suite : diarrhée, vomissements, douleurs abdominales ; ainsi que des troubles neurologiques : confusion, désorientation, léthargie, hallucinations, dépression, délire, obnubilation, coma.

Les complications qui peuvent survenir par la suite sont l'apparition d'abcès pulmonaires, d'une insuffisance respiratoire, d'une hypotension, une bradycardie. On note également un risque de coagulation intravasculaire disséminée, de microangiopathies et d'insuffisance rénale.

En l'absence de traitement antibiotique adapté, le taux de mortalité est important, il atteint 20 %.

1-2) La fièvre de Pontiac

Cette pathologie est beaucoup plus bénigne puisqu'elle se manifeste par un simple syndrome pseudo grippal guérissant spontanément en 2 à 5 jours.

1-3) Les légionelloses extra-pulmonaires

Elles sont rares mais très graves. Elles concernent principalement le cœur (myocardite, péricardite, endocardite), l'appareil digestif (péritonite, colite nécrosante, pancréatite), l'appareil musculaire (rhabdomyolyse), le système nerveux ou l'œil (rétinite).

2) mise en place d'un traitement

La détermination de la sensibilité *in vitro* aux antibiotiques ne peut être réalisée selon les normes standardisées classiques. En effet, la présence de charbon et d'extraits de levure dans les milieux de culture ainsi que l'acidité des milieux (pH 6,9) a un effet inhibiteur sur certains antibiotiques ; le temps de génération étant long, la lecture ne peut s'effectuer avant 48 heures d'incubation. De plus, il existe des discordances entre les résultats obtenus *in vitro* et l'efficacité des traitements ce qui s'expliquerait, au moins partiellement, par la localisation intracellulaire des légionelles dans les macrophages.

Pour toutes ces raisons, **la réalisation en routine d'un antibiogramme n'est pas conseillée.**

Principe du traitement antibiotique

Sans signe de gravité, le traitement antibiotique est le plus souvent probabiliste par rapport aux pathogènes supposés, *Legionella* étant couverte par la stratégie thérapeutique antibiotique recommandée dans les pneumonies,

Le choix du traitement antibiotique repose sur la connaissance de l'activité des antibiotiques, sur l'épidémiologie microbienne générale et locale et sur le terrain. Il est généralement ambulatoire. En cas de légionellose confirmée, le traitement fait habituellement appel aux macrolides, parfois à d'autres classes d'antibiotiques.

Le choix des molécules antibiotiques pour le traitement des infections extra-pulmonaires ne diffère pas de celui de la maladie des légionnaires.

Choix des antibiotiques et de leurs associations

Les **macrolides** représentent le traitement de référence de la légionellose. L'érythromycine est le traitement historique. Son efficacité est basée sur l'expérience clinique bien que des problèmes de tolérance soient à prendre en considération tels que :

- intolérance digestive,
- interactions médicamenteuses nombreuses,
- intolérance veineuse, nécessité d'un grand volume de perfusion.

Divers macrolides s'avèrent efficaces sur les *Legionella*. Il existe une étroite corrélation entre les constantes d'affinité des macrolides et des streptogramines et leur CMI sur les *Legionella*. Les macrolides récents (azithromycine, roitamycine, roxithromycine, clarithromycine) ont des CMI plus basses.

Les travaux sur cultures cellulaires ont permis de vérifier leur bonne pénétration cytoplasmique et leur concentration dans les vacuoles phagocytaires. Les macrolides inhibent la multiplication intracellulaire des bactéries à de faibles concentrations [41,42,43].

Les **fluoroquinolones** peuvent également être utilisées dans le traitement des formes sévères. Elles sont généralement prescrites chez les sujets

immunodéprimés, notamment chez le transplanté d'organe, en raison de l'absence d'interférence avec la ciclosporine, en association ou non.

Les fluoroquinolones présentent des CMI très basses (0,03 à 0,12 mg/L pour la cirpofloxacinine ; 0,06 à 0,5 mg/L pour la norflxacine et 0,1 à 1 mg/L pour la péfloxacinine). Leur bonne concentration cellulaire et pulmonaire leur confère, selon les travaux et les molécules, une activité équivalente, voire même supérieure à celle de l'érythromycine et égale à celle de la rifampicine [44].

Un pouvoir bactéricide intracellulaire a été démontré pour l'ofloxacinine et la cirpofloxacinine à des concentrations respectives de 0,001 et 0,01 mg/L.

L'activité de la **rifampicine** sur Legionella est apparue dès les premiers travaux. In vitro, elle a les CMI les plus basses même si elle est inactivée dans les milieux de culture spécifiques de Legionella, en particulier par le charbon. In vivo, sa supériorité démontrée dès 1978 sur œuf embryonné ou chez le cobaye [45] a été confirmée quels que soient le modèle expérimental et la voie d'inoculation utilisés. Cependant, si elle a toujours l'efficacité optimale, lors d'études comparatives, certains antibiotiques comme la ciprofloxacinine, l'ofloxacinine et la roxithromycine parviennent à l'égaliser.

En raison de l'apparente facilité d'obtention in vitro de résistants, la rifampicine n'est pas recommandée en monothérapie. Elle doit être utilisée en association, classiquement avec l'érythromycine mais également avec les fluoroquinolones (ciprofloxavine, ofloxacinine, lévofloxacinine). La combinaison de ces antibiotiques est réservée au traitement des formes sévères et/ou des sujets immunodéprimés.

Son utilisation doit être prudente chez le greffé car la rifampicine risque de favoriser le rejet du greffon en diminuant l'activité immunosuppressive de la ciclosporine et des corticoïdes.

L'association d'antibiotiques lors d'une bithérapie est utilisée pour le traitement des formes sévères, mais sans preuve de supériorité. L'association érythromycine + rifampicine constitue le traitement historique de référence. L'association fuoroquinolone + rifampicine ne bénéficie pas de la même documentation historique, de même que l'association macrolide+fuoroquinolone qui est elle aussi employée [46].

Stratégie thérapeutique

Le choix thérapeutique dépend de la sévérité de la maladie et du terrain (tableau 5) comme la présence ou non de troubles hépatiques, digestifs, ou d'interférences médicamenteuses. Les voies d'administration injectable ou orale peuvent être utilisées ; le choix dépend de la gravité de la pathologie et de l'existence de troubles digestifs ou non qui induisent le recours à la forme injectable même s'ils sont mineurs.

Les doses peuvent varier en fonction de la gravité de la légionellose et de la pathologie sous-jacente. Les doses moyennes sont indiquées dans le tableau 6. La durée de traitement est habituellement de 14 à 21 jours chez l'immunocompétent ; elle peut être allongée à 30 jours chez l'immunodéprimé ou dans les formes sévères [47].

Gravité / terrain	CHOIX ANTIBIOTIQUE
Gravité légère à modérée	Macrolide : érythromycine, clarithromycine, dirithromycine, josamycine, roxythromycine, spiramycine Ou Fluoroquinolone : ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine
Gravité élevée et/ou immunodépression	Association éventuelle de deux antibiotiques au sein des trois types de molécules suivantes ; <ul style="list-style-type: none">▪ Erythromycine, spiramycine (IV)▪ Fluoroquinolones(ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine)▪ rifampicine

Tableau 5 : Choix d'un antibiotique selon la gravité de la légionellose et l'état de santé du patient.

antibiotiques	posologie
Erythromycine	IV : 1 g 3 à 4 fois/j VO : 1 g 3 fois/j
clarithromycine	VO : 500 mg 2 fois/J
dirithromycine	VO : 500 mg en une prise par jour
josamycine	VO : 1 g 2 fois/j
roxithromycine	VO : 150 mg 2 fois/j
spiramycine	IV : 1,5 M UI 3 fois/j VO : 6 à 9 M UI/j en 2 à 3 prises
ciprofloxacine	IV : 400 mg 2 à 3 fois/j VO : 500 à 750 mg 2 fois/j
lévofloxacine	IV ou VO : 500mg en 1 à 2 prises par jour
ofloxacine	IV ou VO : 400 à 800 mg en 2 à 3 prises par jour
rifampicine	IV ou VO : 20 à 30 mg/kg en 2 prises par jour

Tableau 6 : Posologies des antibiotiques utilisés dans le traitement de la légionellose.

Traitement antibiotique prophylactique

La section des maladies transmissibles du Conseil supérieur d'hygiène publique de France émet l'avis suivant :

L'antibioprophylaxie de la légionellose n'étant actuellement justifiée par aucun argument scientifique, elle ne saurait être mise en oeuvre à titre systématique devant la présence de légionelles dans l'eau. Cependant, en cas d'épidémie de légionellose nosocomiale, en sus des mesures de décontamination du réseau et de protection des patients contre l'exposition, une antibioprophylaxie par un macrolide peut se concevoir chez les sujets à risque [48].

VI) Outils de gestion du
risque
« légionelle »

1) maîtrise de la prolifération bactérienne environnementale

1-1) Mesures techniques préventives

Dans le meilleur des cas, des mesures relativement simples permettent, dans une large mesure, d'éviter la contamination de l'eau par les légionelles.

On peut se référer aux recommandations publiées en 1989 et partiellement révisées en 1994 par un groupe de travail de l'Office Fédéral de la Santé Publique. Comme les légionelles ne survivent pas au-delà de 60° C, on peut prévenir la contamination des circuits en maintenant l'eau chaude à une température supérieure à 60° C dans tout le système, par exemple dans un bâtiment neuf.

L'application de cette mesure simple se heurte malheureusement à plusieurs obstacles: dans certains hôpitaux, les circuits d'eau sont anciens et comportent souvent des zones où l'eau peut stagner, avec également de grandes distances entre les réservoirs d'eau chaude et les robinets. Ainsi, différentes études relèvent que la température de l'eau chaude aux points de sortie situés relativement loin des réservoirs d'eau chaude sont bien en dessous des 50° C recommandés.

Ce n'est donc pas un hasard si des études rapportent des cas de pneumonies à légionelles ont été observés dans les services les plus éloignés des réservoirs, alors qu'ils sont rarement observés dans les services proches de ceux-ci.

Dès l'apparition de cas de pneumonies nosocomiales à légionelles, des mesures doivent être prises pour tenter de prévenir des cas ultérieurs. Les mesures de décontamination doivent être instaurées, en se basant sur les résultats des analyses des circuits d'eau.

1-2) Mesures à court terme (annexes 1 et 2)

Pour réduire le risque immédiat, il faut élever la température de l'eau jusqu'à 70°-80° C durant trois jours et ouvrir quotidiennement les robinets dans les services concernés pendant 30 minutes.

Goetz et Yu [37] recommandent de vidanger au préalable tous les réservoirs d'eau chaude, de les nettoyer et d'effectuer une décontamination au chlore (100 ppm durant 12 à 14 heures). En appliquant cette méthode appelée "superheat and flush", il faut être attentif à ce que la température de l'eau aux points de sortie soit au minimum égale à 60°C. A la fin de la procédure, des frottis et des prélèvements d'eau doivent être effectués à des endroits représentatifs. En cas de résultats positifs, la procédure doit être répétée jusqu'à l'obtention d'une décontamination documentée. Ensuite le risque d'une nouvelle contamination peut être minimisé en assurant une température minimale de 60° C aux points de soutirage d'eau.

1-3) Mesures à long terme et mesures complémentaires

1) chloration

On peut également détruire les légionelles dans l'ensemble du système en augmentant la concentration en chlore (l'eau de javel) dans l'eau. L'effet est cependant peu sûr en raison des problèmes d'injection du chlore dans les réseaux d'eau, et du choix de la quantité de chlore à injecter pour avoir le meilleur rapport : efficacité sur les légionelles / action corrosive minimale du chlore sur le réseau d'eau. (cf annexe 2).

Il semblerait que l'utilisation de bioxyde du chlore ClO₂ puisse résoudre en partie ces problèmes. Cette nouvelle technique possède néanmoins elle aussi des inconvénients tels que le coût d'utilisation et une faible rémanence. Le manque de recul sur cette méthode constitue également un frein à son utilisation (cf annexe 3).

2) ozonisation

De nouveaux procédés font appel à l'ozonisation centrale de l'eau chaude avec inactivation distale de l'ozone par un traitement aux rayons UV, permettant de détruire la totalité des bactéries et des protozoaires passant dans la cellule.

Le problème majeur non maîtrisé par la désinfection UV est l'absence de rémanence dans les installations. Ainsi, un biofilm, situé quelques dizaines de cm après la lampe UV ne sera pas affecté, sauf production, au niveau de la cellule de sous-produits oxydants (radical hydroxyle par exemple) (annexe 4).

3) utilisation d'électrodes cuivre argent

On peut également recourir à l'utilisation d'électrodes de cuivre et d'argent qui produisent des ions en présence d'un champ électrique. Ces ions chargés positivement se fixent sur des molécules de la paroi bactérienne chargées négativement. Ceci entraîne des troubles de la perméabilité de la paroi et une dénaturation des protéines conduisant à la mort cellulaire. Quelques publications rapportent les expériences faites avec des systèmes commercialisés utilisant ce procédé [29], à Pittsburgh a pu montrer dans une étude contrôlée, que ce système conduisait à une diminution du pourcentage de 50% à 0,8% de prélèvements positifs alors que, dans les bâtiments voisins, où ce procédé n'était pas appliqué, la proportion de prélèvements positifs restait au-dessus de 60%.

L'application continue du procédé entraîne l'élimination des légionelles après 4 mois. Après l'arrêt du procédé, le système d'eau restera exempt de légionelles durant encore 2 mois. Une étude de Selenka et al. de Bochum,[33], a également démontré une diminution de la charge en légionelles dans l'installation d'eau chaude en appliquant le même système (Tarn-Pure). Cependant, contrairement à Yu, ils n'ont observé qu'une élimination partielle des légionelles.

L'analyse microbiologique quantitative de l'eau montre cependant une diminution très significative de la concentration en germes, avec des valeurs au-dessous de 1000 CFU/ml.

Ce procédé a différents avantages et inconvénients. Comparé à une augmentation périodique de la température "superheat and flush", l'installation de ce système occasionne des coûts supplémentaires substantiels. Des contrôles périodiques de la concentration en cuivre et en argent de l'eau, et des analyses microbiologiques sont indispensables pour documenter son efficacité. Les charges d'entretien du système (nettoyage régulier des électrodes) dépendent de la qualité de l'eau.

L'avantage essentiel du système est une économie d'énergie à long terme. Si l'ionisation devait permettre une élimination efficace des légionelles dans le système d'eau, le maintien d'une température de 50° C dans les lieux de sortie périphériques ne serait alors plus nécessaire.

4) Conclusions et recommandations pratiques

Dans la plupart des hôpitaux, la pneumonie nosocomiale à légionelles est vraisemblablement sous-diagnostiquée, même si elle reste une infection relativement rare. Il est important d'être vigilant pour reconnaître précocement les épidémies.

La procédure résumée dans les tableaux 6 et 7 est recommandée.

Dans les institutions où il n'a pas été enregistré d'infections nosocomiales durant les 12 à 24 mois précédents, il est raisonnable de n'effectuer ni saisie prospective de l'infection ni screening microbiologique du système d'eau. Le service technique doit en revanche assurer une température de l'eau chaude de 50° C au minimum dans tous les secteurs du système (central 60° C, points de sortie 50° C).

Les systèmes d'ionisation (Cu/Ag) représentent une alternative, en particulier pour les hôpitaux où la centrale thermique se situe à une grande distance des points de soutirage périphériques [49].

Méthodes	Quand ?	Commentaires
Maintien d'une température minimale de 60° C dans le réseau d'eau chaude (50° C au minimum en périphérie)	Lors de la mise en exploitation du système	Contrôles périodiques de la température (par exemple chaque année) à des lieux de prélèvements représentatifs
Ionisation (Cu/Ag)	Lors de la présence de légionelles dans le système d'eau ou comme installation standard (alternative à la désinfection thermique)	Premières expériences positives. Enjeu lors de longue distance entre la centrale et les points d'écoulements d'eau en périphérie
Recherche des légionelles dans le système d'eau	Lors de l'apparition d'infections nosocomiales	Risque élevé d'infections nosocomiales ultérieures en cas de présence de légionelles dans >30% des prélèvements
Rinçage du réseau d'eau chaude (70°-80° C) durant 3 jours consécutifs (superheat & flush)	Lors de l'apparition d'infections nosocomiales par <i>Legionella</i> sp. et présence d'une contamination significative du système	Contrôles microbiologiques ultérieurs indispensables, à répéter éventuellement.
Ozonification, UV	Mesures de réserve, applicables dans des circonstances particulières	Entretien relativement coûteux. Les UV n'ont qu'un effet local et des contaminations distales sont possibles
Filtre aux points de soutirage	Lors de survenues locales fréquentes d'infections nosocomiales par <i>Legionella</i> sp.	Entretien coûteux, fréquents changements, efficacité locale uniquement

Tableau 7: Prévention et éviction de la contamination du système d'eau par *Legionella* sp.

Pneumonies nosocomiales à légionelles dans les douze derniers mois

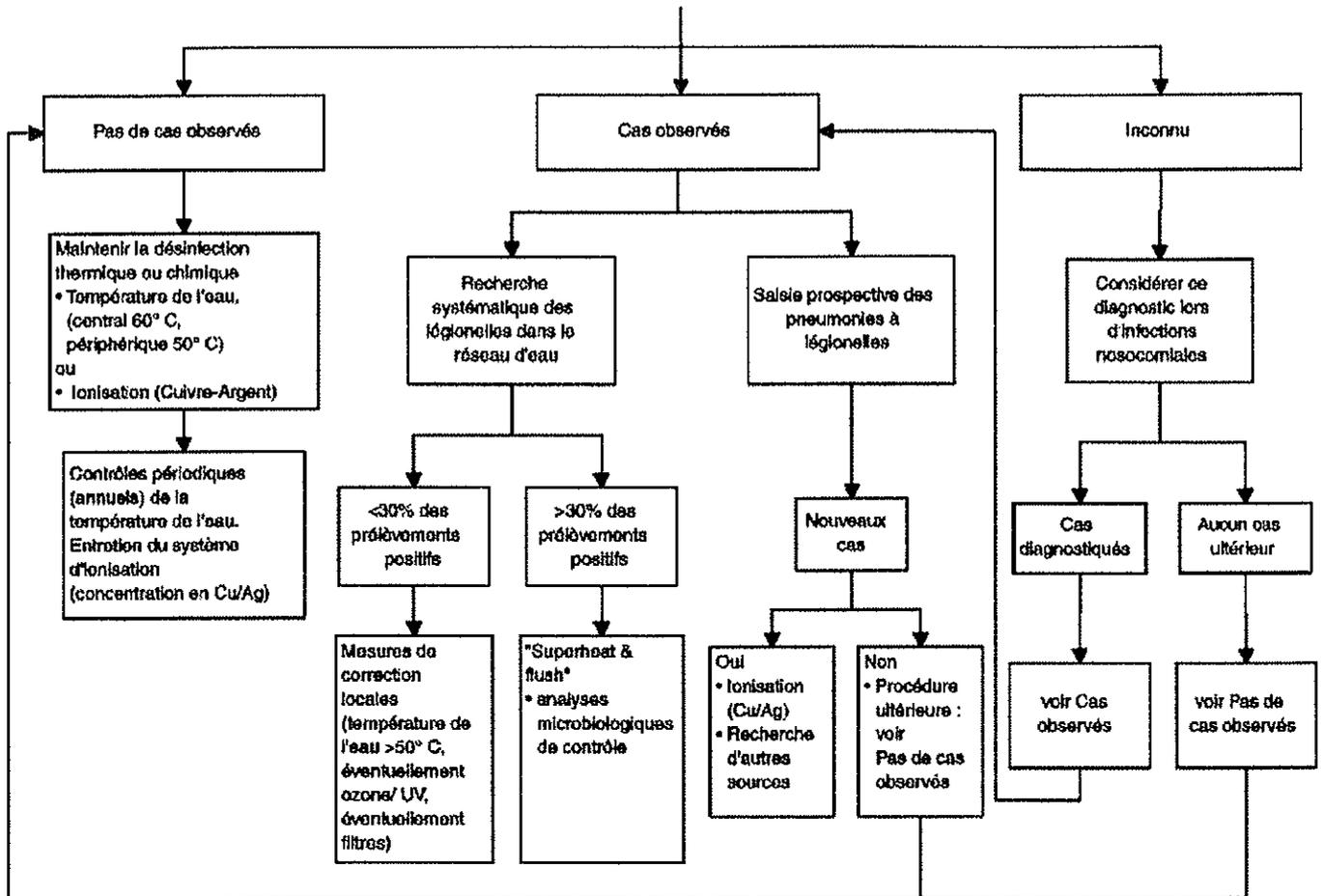


Tableau 8 : Approche rationnelle de la prévention des pneumonies nosocomiales à légionelles.

Dès l'apparition de pneumonies nosocomiales à légionelles, une enquête épidémiologique et des mesures correctrices doivent être entreprises. Cela comprend également la recherche de facteurs de risque et de déficiences dans l'entretien des appareils, comme énumérés dans les tableaux 1 et 2. Parallèlement, l'étendue de la contamination du système par *Legionella sp.* doit être évaluée par des analyses microbiologiques systématiques d'échantillons d'eau et de frottis des robinets dans les différents services de l'hôpital. Un laboratoire de référence, mandaté par l'Office Fédéral de la Santé Publique, pourrait alors exécuter ces

analyses. Si des *Legionella sp.* sont retrouvées dans plus de 30% des prélèvements effectués dans l'hôpital ou dans un service donné, il existe une augmentation significative du risque de nouveaux cas nosocomiaux chez les patients à risque.

Une fois les prélèvements effectués, il convient de rapidement rincer les installations avec de l'eau très chaude (70°-80°C) durant plusieurs jours consécutifs. Dans les services à risque, on peut envisager l'installation de filtres terminaux comme mesure immédiate. Le résultat de ces mesures doit être évalué par des analyses microbiologiques de contrôle. Dans les hôpitaux universitaires, ce sont en général les laboratoires des divisions d'hygiène hospitalière qui effectuent ces analyses.

Enfin, une surveillance clinique prospective doit documenter si le problème est maîtrisé. En cas de contamination persistante et significative du système d'eau (>30% des prélèvements positifs), des mesures techniques supplémentaires doivent être prises en considération comme par exemple la ionisation (Cu/Ag) [50], l'utilisation de l'ozone et/ou de rayons UV, dans certaines zones à risque (degré de contamination élevé, patients avec maladies de base). Dans certaines circonstances, l'installation de réservoirs d'eau chaude qui soient plus proches des robinets contaminés par les légionelles peut permettre de résoudre le problème [51].

2) Réglementation – recommandations

Les actions des pouvoirs publics vis à vis du risque lié aux légionelles se basent, d'une part sur la surveillance épidémiologique, d'autre part sur des actions de contrôle et de prévention.

2-1) Recommandations de portées générales

1) circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose

La circulaire incite, dans une première partie, les professionnels de santé à mieux diagnostiquer les cas puis à les déclarer et favorise, dans une deuxième partie, la

mise en œuvre de bonnes pratiques sanitaires. Elle est constituée de différents volets :

- Le renforcement du dispositif de surveillance de la légionellose ;
- la définition des grandes lignes de la prévention en l'absence de cas (prévention primaire) ;
- la description des étapes de l'investigation lors de la déclaration d'un cas (prévention secondaire). Elle comporte une fiche de déclaration d'un cas de légionellose et un guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose.

La circulaire comprend en outre différentes fiches techniques à destination des responsables des établissements recevant du public et notamment des établissements de santé explicitant les mesures d'entretiens préventifs et curatifs dans les différentes installations à risque. Elles sont présentées par thème : les circuits d'eau chaude sanitaire, les systèmes de climatisation et les tours aéro-réfrigérantes, les bains à remous ou les bains à jets [52].

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

Dans les mois qui ont suivi la diffusion de la circulaire du 24 avril 1997, plusieurs épisodes de cas groupés de légionelloses nosocomiales et communautaires, dont l'épidémie parisienne de l'été 1998, ont continué à être mis en évidence. Cette nouvelle circulaire en tire les conséquences et renforce les dispositions de la circulaire précédente. Dans sa première partie, elle rappelle que, si le producteur d'eau du réseau public est soumis à une double obligation de moyens et de résultats en ce qui concerne le respect des exigences de qualité auxquelles doit répondre l'eau destinée à la consommation humaine, il est de la responsabilité des gestionnaires d'établissements de santé de vérifier et de garantir sa qualité aux points d'usage. Les responsables de ces établissements sont appelés à mettre en œuvre les moyens suivants :

- Acquérir une meilleure connaissance de leur réseau (synoptique, plan),

- assurer un entretien régulier du réseau de l'établissement conformément aux prescriptions de la circulaire du 24 avril 1997,
- mettre en œuvre une surveillance de la contamination des réseaux par la recherche de légionelles en des points critiques des installations de distribution,
- formaliser les procédures d'utilisation de l'eau pour les soins et pour la désinfection des dispositifs médicaux,
- rechercher systématiquement la légionelle lors de la survenue d'une pneumopathie chez un patient hospitalisé.

La deuxième partie de la circulaire s'adresse aux responsables des établissements recevant du public et comportant des installations à risque. Il leur est rappelé d'assurer un bon entretien des installations conformément à la circulaire du 24 avril 1997, d'évaluer la qualité de cet entretien au moins une fois par an par des prélèvements en vue de la recherche de légionelles et de renforcer le contrôle en cas de prélèvements positifs et lors de la survenue de cas de légionelloses [53].

2-2) Réglementation relative aux tours aéroréfrigérantes

A la suite de l'épidémie de l'été 1998, le préfet de Paris a édicté le 26 avril 1999 un arrêté préfectoral fixant des prescriptions aux tours de refroidissement dépendant de la rubrique 1920 de la nomenclature des installations classées. Cet arrêté impose notamment des règles d'entretien, de maintenance et de suivi des tours. Il fixe également différents niveaux d'intervention en fonction des concentrations en légionelles mesurées dans les prélèvements, à savoir :

- au delà de 10^3 UFC/l de *Legionella* dans l'eau, mise en œuvre des mesures nécessaires pour abaisser la concentration en *Legionella* en dessous de ce seuil,
- à partir de 10^5 UFC/l :
 - ✓ arrêt du fonctionnement du système de refroidissement,

- ✓ information de l'inspection des installations classées et de la direction des affaires sanitaires et sociales de Paris,
- ✓ vidange, nettoyage, désinfection avant remise en service.

Se basant sur les travaux développés à Paris, une circulaire a été adressée par le ministre de l'environnement aux préfets le 23 avril 1999. Il leur a été demandé de modifier ou d'ajouter par arrêtés préfectoraux les prescriptions applicables aux installations de pulvérisation d'eau dans un flux d'air dans les zones d'habitation dense ou à proximité de populations particulièrement sensibles.

Un modèle d'arrêté préfectoral, joint à la circulaire, fixe les règles de maintenance et de suivi des installations, de même que de conception et d'implantation des nouvelles installations. Il précise notamment différents niveaux d'intervention en fonction des concentrations en légionelles mesurées dans les prélèvements :

- à partir de 10^3 UFC/l, un contrôle doit être mis en œuvre,
- à partir de 10^5 UFC/l, les installations doivent être arrêtées, pour vidange et nettoyage.

Ainsi, le modèle d'arrêté peut-il être intégré de deux manières à la réglementation locale :

- installations soumises à déclaration (puissance absorbée comprise entre 50 kW et 500kW). Elles sont soumises aux prescriptions générales édictées par le préfet du département (arrêté commun aux installations soumises à déclaration). Il est alors possible de compléter cet arrêté existant par un arrêté comportant des prescriptions générales concernant les tours aéroréfrigérantes après avis du conseil départemental d'hygiène,
- installations soumises à autorisation (puissance absorbée supérieure à 500 kW). Elles sont soumises à des prescriptions particulières par un arrêté préfectoral d'autorisation propre à chacune des installations. Il est alors possible de renforcer au cas par cas ces prescriptions par des prescriptions complémentaires [54].

2-3) réglementation relative aux établissements thermaux

Comme suite à l'avis émis par l'Académie nationale de médecine sur une demande d'autorisation d'utilisation de l'eau, il est apparu nécessaire de réexaminer les éléments de gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans ce type d'établissements en saisissant le conseil supérieur d'hygiène publique de France. Ce dernier a délivré en 1999 des recommandations relatives à la gestion du risque microbien dans les établissements thermaux et a notamment proposé de nouveaux critères de qualité de l'eau, des règles de surveillance et de contrôle de sa qualité, ainsi que des principes pour l'entretien des réseaux d'eau en détaillant les différents traitements préventifs et curatifs applicables selon leur nature et leur conception.

Sur la base de ces recommandations, le ministère de l'emploi et de la solidarité a édicté l'arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 relatif au contrôle des sources d'eaux minérales. Considérant l'usage thérapeutique qui est fait des eaux dans ce type d'établissement, cet arrêté préconise des concentrations en légionelles inférieures aux seuils de détection à tous les points d'usage pour les soins.

2-4) Réglementation relative à la protection des travailleurs

Le décret n° 94-352 du 4 mai 1994 fixe les règles particulières de prévention et de protection des travailleurs contre les risques résultant d'une exposition à des agents biologiques. Les agents biologiques sont classés en quatre groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent :

- Groupe 1 : un agent biologique du groupe 1 n'est pas susceptible de provoquer une maladie chez l'homme,
- Groupe 2 : un agent biologique du groupe 2 peut provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; sa propagation dans la collectivité est improbable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace (exp : *Chlamydia pneumoniae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori*, ...),

- Groupe 3 : un agent biologique du groupe 3 peut provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; il peut présenter un risque de propagation dans la collectivité, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace (exp : *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium leprae*, *Yersinia pestis*...),
- Groupe 4 : un agent biologique du groupe 4 provoque des maladies graves chez l'homme et constitue un danger sérieux pour les travailleurs ; il peut présenter un risque élevé de propagation dans la collectivité ; il n'existe généralement pas de prophylaxie ni de traitement efficace (Aucune bactérie ne présente à ce un niveau de risque 4).

Legionella sp. et *L. pneumophila* sont classées dans le groupe 2.

Notons que la légionellose ne peut, à ce jour, bénéficier d'une reconnaissance au titre des tableaux des maladies professionnelles. Les cas graves, survenus chez les salariés, peuvent être soumis au comité régional de reconnaissance des maladies professionnelles au titre de l'alinéas 4 de la loi de reconnaissance des maladies professionnelles [55].

**VII) La légionellose :
aspects juridiques**

1) un principe général de responsabilité

La responsabilité des établissements de santé, hôtels ou tout autre établissement recevant du public peut être engagée du fait de cas de contaminations imputables à leurs installations de climatisation ou d'eau chaude sanitaire.

- Responsabilité du gardien

Cette responsabilité repose d'abord sur l'article 1384-1 du code civil, qui les rend responsables des dommages causés par les installations dont ils ont la garde, sauf cas de force majeure. Il est bien évident que l'émission d'aérosols contaminés engage automatiquement la responsabilité du gardien des installations, celui-ci ayant beaucoup de mal à invoquer des cas de force majeure ou une cause étrangère exonératoire.

- Responsabilité pour faute

La responsabilité de ces mêmes exploitants peut être engagée sur le fondement des articles 1382 et 1383 du code civil, en raison de leurs fautes dans l'entretien de leurs installations. En effet, le risque de légionellose étant connu, il appartient à tous les exploitants de prendre des mesures pour éviter une prolifération bactérienne.

Ils doivent tout d'abord, justifier avoir respecté la réglementation concernant l'entretien des réseaux d'eau et la prévention du risque lié aux légionelloses. Les règles générales d'hygiène applicables à toutes les installations de distribution d'eaux sont d'ailleurs définies par un décret N° 95-363 du 5 avril 1995.

Selon la circulaire DGS 98/771 du 30 décembre 1998, le gestionnaire d'un établissement de santé doit vérifier et garantir la qualité d'eau destinée à la consommation

- ✓ en assurant un entretien régulier du réseau de l'établissement,
- ✓ en recherchant les légionelles au moins une fois par an sur des prélèvements effectués sur tous les réservoirs, les ballons d'eau, les points d'usage et les autres installations à risques,

- ✓ en formalisant les procédures d'utilisation de l'eau pour les soins et la désinfection des dispositifs médicaux,
- ✓ en recherchant systématiquement une légionellose lors de la survenue d'une pneumopathie chez un patient hospitalisé.

Dans les établissements recevant du public et les installations à risque (tour aéroréfrigérantes, bains à remous, etc...), les moyens de prévention sont un bon entretien de ces installations conformément aux dispositions de la circulaire du 24 avril 1997. Et en l'absence de ces dispositions, l'évaluation de la qualité de cet entretien au moins une fois par an, par prélèvements soumis à la recherche des légionelles.

Dés lors, la responsabilité d'un exploitant sera engagée dès qu'il ne pourra justifier avoir assuré l'entretien de ces installations à risques dans les conditions précitées.

2) les infections nosocomiales

Sur le plan juridique, la légionellose contractée en milieu hospitalier est considérée comme une infection nosocomiale.

Les infections sont dites nosocomiales lorsqu'elles sont acquises pendant le séjour hospitalier et qu'elles n'étaient ni présentes, ni en incubation au moment de l'admission. Nous verrons que la définition purement médicale de l'infection nosocomiale et sa définition médico-légale ne se recoupent pas exactement. Il apparaît de plus en plus choquant pour le grand public que l'hôpital, qui est par définition le lieu où l'on soigne, puisse être à l'origine d'une infection autonome pour le patient.

C'est la raison pour laquelle les actions en justice liées à l'existence d'une infection nosocomiale sont de plus en plus nombreuses étant entendu que la responsabilité médicale en général est devenue un sujet très sensible et très médiatique.

L'émergence du risque nosocomial, au-delà de sa dangerosité propre, pourrait creuser encore le fossé qui existe déjà entre le patient et l'hôpital car ce risque n'a pas figure humaine. Il est partout et nulle part, il est difficile à caractériser, il fait peur.

La position de la jurisprudence administrative

Il est vrai qu'en la matière, le conseil d'état présume la faute du centre hospitalier lorsqu'une infection nosocomiale est découverte dans ses locaux mais autorise ce dernier à apporter la preuve de ce qu'il a mis en œuvre pour éviter la contamination.

La jurisprudence administrative en matière de responsabilité médicale a beaucoup évolué depuis quelques années. Elle est successivement passée de **l'exigence de la faute lourde à la faute simple** pour déclarer certains cas l'hôpital **responsable sans faute** dans des cas de mise en œuvre d'une technique nouvelle non imposée par les circonstances (arrêt GOMEZ) ou en cas de risque pour le patient dont l'existence est connue et la réalisation exceptionnelle et entraînant un préjudice particulièrement important pour ce dernier (arrêt BIANCHI). Les arrêts GOMEZ et BIANCHI précités constituent néanmoins des jurisprudences d'exception qui doivent être appréciées comme telles.

Par contre, en matière d'infection nosocomiale, et ce depuis 1988, le conseil d'état présume la faute dans l'organisation de service public hospitalier. Il s'agit là d'une position de principe qui ne subit pas d'interprétation restrictive. La présomption est simple et non irréfragable ce qui signifie qu'elle supporte la preuve contraire.

L'arrêt fondateur en la matière est l'arrêt COHEN du 9 décembre 1988.

- En 1976, Monsieur COHEN subit une sacroradiculographie et une cure de hernie discale. Il est alors atteint par une infection méningée compliquée d'une lésion de la moelle dorsale. Il subit finalement une paralysie des membres inférieurs de l'abdomen et de la partie basse du tronc soit 80 % d'IPP.
- Le conseil d'état a estimé qu'aucune faute lourde médicale, notamment en matière d'asepsie, ne peut être reprochée aux praticiens qui ont exécuté cet

examen et cette intervention... Toutefois, le fait qu'une telle infection ait pu néanmoins se produire révèle d'une faute dans l'organisation ou le fonctionnement du service hospitalier à qui incombe de fournir au personnel médical un matériel et des produits stériles.

La présomption de faute est notamment réaffirmée par un arrêt MAALEM du 14 Juin 1991 :

- En 1977, monsieur MAALEM subit une exploration chirurgicale de l'œil droit à l'occasion de laquelle il contracte une infection de l'os frontal.
- Le conseil d'état décide que rien ne permettant de présumer qu'un patient ait été porteur d'un foyer infectieux avant une opération chirurgicale, l'introduction accidentelle d'un germe microbien dans l'organisme lors de l'intervention révèle une faute dans l'organisation ou le fonctionnement du service hospitalier et engage la responsabilité de celui-ci envers la victime pour les conséquences dommageables de l'infection.

Cette position est confirmée à plusieurs reprises par un arrêt MUSSET du 19 février 1990 :

- En 1980, Monsieur MUSSET subit une arthrographie à l'occasion de laquelle il contracte un staphylocoque doré alors que du matériel stérile à usage unique avait été utilisé.
- Le conseil d'état décide que le fait qu'une telle infection ait pu se produire alors que ni le rapport d'expertise, ni aucune autre pièce ne font état que monsieur MUSSET ait pu être porteur de ce germe avant l'intervention révèle une faute dans l'organisation de fonctionnement du service hospitalier.

La jurisprudence a simplement édicté une présomption de faute qui renverse la charge de la preuve et qui n'interdit pas à l'hôpital de tenter d'établir qu'il n'a pas commis de faute. Dans cette perspective, l'hôpital doit pouvoir produire tous les éléments écrits relatifs aux précautions et les méthodes déployées dans le service

destinées à lutter contre les infections non seulement le jour de l'opération mise en cause, mais également d'une façon habituelle. Il est donc important qu'à tout moment un centre hospitalier puisse présenter un dossier complet relatif aux méthodes de stérilisation et aux dispositifs mis en place en interne pour contrôler voir éradiquer les infections nosocomiales, tâche organisée et coordonnée par le CLIN.

En cas de contentieux, et en cas de suspicion d'infection nosocomiale, le CLIN doit permettre à l'établissement hospitalier d'établir une défense de fond : la preuve que la sensibilisation de tous, au sein de l'hôpital, aux problèmes des infections nosocomiales doit être apportée. Dans le cas d'une procédure judiciaire, l'établissement doit également être capable de retracer les processus de stérilisation en justifiant de chacune de ses étapes.

Son mode de gestion de répartition du matériel à usage unique doit également être établi de façon plus générale, l'établissement doit réfléchir aux informations susceptibles d'établir que l'établissement de soin a pris toutes les précautions techniques possibles pour éviter une infection nosocomiale, dans le cas particulier étudié par les juges.

3) Le risque pénal

Le risque pénal va également en augmentant. Les médecins ou l'équipe dirigeante d'un établissement peuvent en être victimes en cas d'infection nosocomiale, mais également l'établissement lui-même comme le prévoit la nouvelle version du code pénal.

Les infractions susceptibles d'être visées en matière d'infection nosocomiale sont :

- **le délit d'homicide involontaire,**
- **le délit d'atteinte involontaire à l'intégrité de la personne du patient,**
- **le délit de mise en danger d'autrui.**

Cette dernière infraction doit attirer l'attention puisque pour la première fois une imprudence devient punissable même sans avoir produit un résultat dommageable. En effet, les personnes exerçant dans un hôtel public ou privé qui expose un patient à un risque d'infection nosocomiale par la violation manifestement délibérée d'une obligation particulière de sécurité ou de prudence, sans pour autant que la contamination ait lieu, commettent le délit précité.

Des poursuites ont d'ailleurs été engagées devant plusieurs juridictions de France qui ont abouti à des condamnations de médecins et d'établissements. En effet depuis le premier mars 1994 ; une victime peut déposer une plainte pénale à l'encontre d'un établissement de santé public ou privé. Cette responsabilité est prévue par l'article 121-2 du nouveau code pénal dans les termes suivants :

« les personnes morales, à l'exclusion de l'état, sont responsables pénalement selon les distinctions des articles 121-2 à 121-7 et dans les cas prévu par la loi ou le règlement, des infractions commises pour leur compte, par leurs organes ou représentants... la responsabilité pénale des personnes morales n'exclut pas celle des personnes physiques, auteurs ou complices des mêmes faits ».

En matière d'infection nosocomiale, un établissement de santé peut avoir sa responsabilité pénale mise en cause sur le fondement des délits d'homicides involontaires à l'intégrité de la personne, ou de risque de mort ou de blessure causée à autrui par la violation manifestement délibérée d'une obligation particulière de sécurité ou de prudence imposée par la loi.

Le même code pénal a prévu des sanctions spécifiques pour les établissements pénalement condamnés. Il s'agit essentiellement :

- d'une peine d'amende dont le taux maximum peut être égal au quintuple de celui prévu pour les personnes physiques par la loi qui réprime l'infraction reprochée,
- l'interdiction définitive ou pour cinq ans ou plus d'exercer l'activité considérée,

- le fermeture de l'établissement,
- l'affichage de la décision rendue sous diverses modalités.

Les personnes morales ont d'ailleurs désormais leur propre casier judiciaire.

On peut se demander enfin si le directeur d'un établissement public peut être pénalement mis en cause en matière d'infection nosocomiale et cette question amène naturellement celle de la possibilité pour les directeurs de se prévaloir d'une délégation de responsabilité en la matière.

La responsabilité pénale pourrait également être mise en cause du fait des délits de pollution de l'air (loi n° 61-842 du 2 août 1961) ou de l'eau (loi 64-1245 du 16 décembre 1964).

C'est dans le domaine des établissements de santé qu'il était naturel que les malades contaminés recherchent, au premier chef, leur responsabilité pénale en cas d'infection nosocomiale.

C'est ainsi que le 16 octobre 1998, le parquet de Tarbes a décidé d'ouvrir une information judiciaire pour homicide involontaire à l'encontre de l'hôpital de cette même ville en raison de deux décès imputables à la légionellose.

A peine inauguré, le système d'eau chaude sanitaire de l'hôpital Georges Pompidou a été à l'origine de plusieurs cas de légionelloses, apportant de graves dysfonctionnements, ce qui ouvre la porte à des recherches de responsabilité pénale, non seulement de l'établissement, mais des constructeurs et installateurs.

Les investigations après l'identification en Ille et Vilaine de 18 cas de légionelloses, dont cinq mortels, orientent l'origine de la contamination vers des tours aéroréfrigérantes du centre de Rennes, dont les exploitants se trouvent donc en première ligne d'une recherche de responsabilité pénale.

Enfin, la présence de ces bactéries sont à présent beaucoup mieux détectées et explique de nombreuses pathologies dont l'origine restait inconnue au cours des dernières années.

Face à la multiplication des cas de légionelloses, liées à celle des installations collectives de climatisation (centres commerciaux, bureaux, hôtels, hôpitaux, salles de sport, ...) il appartient aux professionnels de redoubler de vigilance dans la prévention, et la désinfection régulière des installations à risque, notamment en respectant la réglementation en vigueur [56,57].

VIII) CONCLUSION

Au terme de ce travail, nous pouvons dire que *Legionella* est une bactérie atypique, tant au niveau de son développement, qu'au niveau de l'expression de sa pathogénicité.

La présence de ce germe dans les réseaux d'eau doit être surveillée et contrôlée afin d'éviter une prolifération de la bactérie, en particulier en milieu hospitalier où elle peut être impliquée dans la survenue d'infections nosocomiales environnementales.

L'identification et la déclaration des cas de légionellose sont également des éléments très importants qui vont participer à maîtriser le développement de ce germe.

Actuellement, la légionellose est une maladie qui est encadrée par de nombreux organismes (CLIN, EWGLI, DDASS,...). Cet encadrement constitue une opportunité à saisir pour engager une démarche qualité en matière de gestion des risques liés à l'eau. En effet, s'occuper des légionelles revient plus largement à s'occuper de la qualité du réseau d'eau et ne doit pas faire oublier les autres germes aquaphiles (*Pseudomonas* et apparentés, *Aeromonas*...) qui peuvent aussi poser problèmes en terme de contamination du réseau d'eau et d'infections humaines.

IX) ANNEXES

ANNEXE I - Traitement Thermique

Cette méthode de désinfection ne s'applique pratiquement que sur des réseaux d'eau chaude sanitaire (ECS).

En effet, sur les circuits de refroidissement avec tour aéroréfrigérante, la température est beaucoup trop élevée pour le matériel (garnissage de la tour,...). Il existe toutefois des tours spéciales avec un corps d'échange et un séparateur de gouttes stable à une température de 70 °C (matériaux genre ABS par exemple).

Dans le cas d'une éradication faisant suite à un développement soudain de *L. pneumophila* dans un système, l'éradication thermique peut se justifier en tenant compte des contraintes suivantes :

- ✓ Une température supérieure à 60° inhibe le développement de *Legionella*,
- ✓ Des études ont montré que les temps nécessaires pour réduire la population de *Legionella* d'une puissance de 10 à 45°C, 50°C, 60°C et 70°C ont respectivement de 2500, 380, 5 et 1 minute.

▪ **Methodologie**

Avant d'effectuer la désinfection, il faut respecter les points suivants :

- ✓ Tout le circuit hydrique, y compris les organes hydrauliques tels que les joints doivent supporter une température élevée (ex : faire attention aux canalisations en acier galvanisé),
- ✓ les réservoirs et la robinetterie doivent être nettoyés, détartrés et désinfectés,
- ✓ il faut identifier et neutraliser les mitigeurs durant l'opération pour avoir une température élevée au niveau des robinets,
- ✓ les bras morts doivent être éliminés ou purgés.

Au cours de la réalisation du choc thermique :

- ✓ Le personnel et les patients sont informés de l'élévation de température afin d'éviter tout risque de brûlure : mise en place de panneaux signalétiques,
- ✓ la température dans les réservoirs doit être suffisante pour obtenir 70 °C à la sortie des robinets (si cette température ne peut être obtenue ou maintenue, il faut privilégier une autre méthode de désinfection),

- ✓ tous les robinets et les douches de l'établissement sont purgés pendant 30 minutes,
- ✓ la température de sortie de l'eau est vérifiée en différents points.

Avant la remise en service du réseau, les températures de distribution sont vérifiées.

▪ Avantages / inconvénients

Le principal intérêt de cette méthode est qu'elle ne nécessite aucun équipement spécifique pour sa mise en œuvre. De plus la diminution de la concentration en légionelles est obtenue rapidement.

Toutefois, une élévation de la température de l'eau à 70°C expose les utilisateurs à un risque de brûlure, et les canalisations à un risque de détérioration et d'entartrage par précipitation du carbonate de calcium. La principale difficulté est de garder une température élevée dans tous les points du réseau.

Le coût de cette méthode est important du fait d'une mobilisation importante de personnel.

▪ Approches nouvelles

Le développement des **rubans chauffants** offre des possibilités nouvelles. En effet des fabricants proposent des rubans capables d'assurer une température défavorable aux *Legionella* y compris dans les réseaux isolés desservant les points de soutirage.

En **asservissant le chauffage** il est possible d'assurer la température idéale au point de soutirage ou de chauffer les canalisations critiques à 70-75°C durant quelques minutes et d'éradiquer thermiquement les bactéries. L'asservissement pourra isoler temporairement la distribution de l'eau [58].

ANNEXE 2 - Chlore / eau de javel

C'est la technique la plus utilisée en France et dans le monde.

- **Methodologie**

Avant d'effectuer la désinfection, il faut respecter les points suivants :

- ✓ Il faut s'assurer que le circuit peut supporter un taux élevé de désinfectant. La nature des matériaux et l'état du réseau (corrosion) doivent être vérifiés,
- ✓ les réservoirs et la robinetterie doivent être nettoyés, détartrés et désinfectés,
- ✓ il faut identifier et neutraliser les mitigeurs durant l'opération pour avoir une température élevée au niveau des robinets,
- ✓ il faut disposer d'un plan complet du réseau avec identification de tous les points d'usage.

Au cours de la réalisation du choc thermique :

- ✓ Une pompe doseuse est installée, le point d'injection est situé en aval d'un dispositif anti-retour,
- ✓ le temps de contact et la dose de produit utilisé doivent être déterminés et respectés. Un temps de contact de 24 heures pour 15 mg/l de chlore libre ou 12 heures pour 50 mg/l est souvent utilisé,
- ✓ le désinfectant doit atteindre tous les points d'usages (robinets et douches),
- ✓ le réseau doit être rincé abondamment à la fin du temps de contact,
- ✓ le réseau peut être remis en service lorsque les taux respectent la réglementation (chlore < 0,2 mg/l d'eau).

- **Avantages / inconvénients**

Une fois le réseau équipé de pompes doseuses, cette méthode est plus facile à mettre en œuvre et présente un moindre coût que la méthode de désinfection thermique.

Toutefois il y a plus d'échecs et de problèmes que de succès avec la chloration en raison des points suivants :

- ✓ A cause de son instabilité, l'eau de javel peut être décomposée par de nombreuses impuretés, la lumière et la chaleur,
- ✓ selon le pH de l'eau on a plus ou moins d'acide hypochloreux (figure 13), beaucoup plus actif en désinfection. Demander 2 à 3 mg/l de chlore libre dans un réseau d'eau chaude sanitaire, sans imposer un minimum d'acide hypochloreux ne peut conduire qu'à des échecs dans certains cas. De même, l'équilibre entre les 2 formes dépend de la température de l'eau,
- ✓ L'eau de javel corrode fortement. Cette corrosion est accentuée par:
 - l'adoucissement partiel de l'eau. Chlorer une eau qui est passée sur un adoucisseur ne peut que conduire à une catastrophe en terme de corrosion, non seulement sur l'acier mais aussi l'acier galvanisé, voire le cuivre,
 - le chauffage de l'eau,
 - les surdosages. A 20 voire 50 mg/l de chlore libre, lors d'un nettoyage, on aura des dégâts majeurs dans les réseaux. Un suivi des nettoyages avec des coupons de corrosion s'impose,
 - le caractère alcalin de l'eau de javel peut conduire à un entartrage au point d'injection [59].

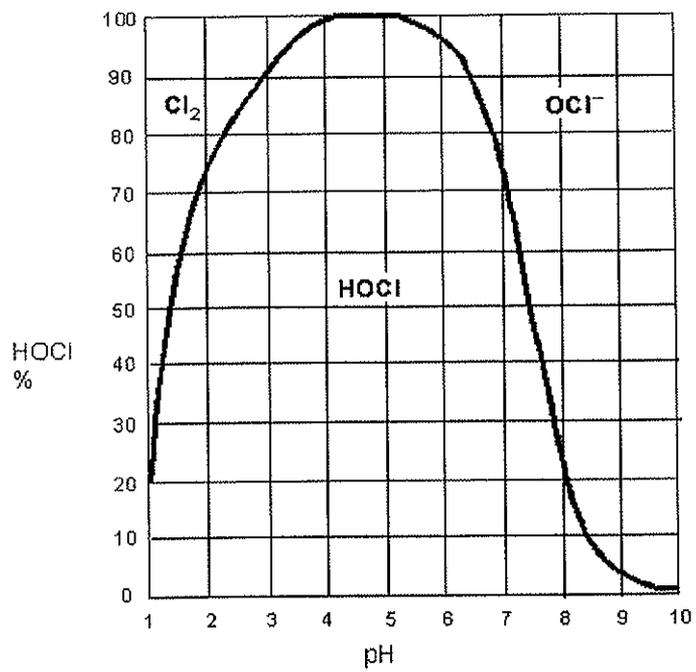


Figure 13 : Courbe de dissociation de l'acide hypochloreux en fonction du pH.

ANNEXE 3 - Bioxyde de chlore ClO₂

Le bioxyde de chlore est probablement une technique d'avenir dans la lutte contre *Legionella*. Il est fabriqué, le plus souvent par action de l'acide chlorhydrique sur du chlorite de sodium dans un générateur spécifique. La molécule est agréée sur l'eau potable.

La méthodologie de mise en œuvre de cette méthode est identique à celle de la désinfection par l'eau de javel.

▪ **Avantages / inconvénients**

Le tableau qui suit fait ressortir les principaux avantages et inconvénients de ce produit.

Avantages	Inconvénients
autorisation pour l'eau potable	rémanence faible
molécule non ionique pénétrant bien dans le biofilm	installation de préparation complexe
performance en désinfection	prix plus élevé que l'eau de javel
produit très bien adapté pour les nettoyages	dosage d'emploi à définir
moins de corrosion que l'eau de javel à performance identique	Manque de recul
produit fortement implanté dans certains pays ayant une antériorité sur la France (Grande Bretagne)	

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des caractéristiques du traitement de l'eau par le bioxyde de chlore.

Cette technologie est promise à un grand avenir pour les installations de moyenne et de grande taille [59].

ANNEXE 4 - OZONISATION

Cette technique est capable de détruire, sans ajout de produits chimiques, la totalité des bactéries passant dans la cellule.

Les UV sont utilisés pour contrôler le taux de bactéries contenus dans l'eau. Les systèmes générateurs d' U.V actuellement disponibles ne nécessitent le remplacement de la lampe qu'après une utilisation continue de 300 jours. Aux systèmes UV conventionnels, on peut ajouter la nouvelle technologie des UV pulsés. En présence de fortes intensités UV mais pulsées, et balayant le spectre des UV, on arrive à détruire, avec une consommation énergétique moindre les bactéries.

Un capteur peut être installé à l'intérieur de la lampe pour mesurer l'intensité des UV et détecter un incident ou prévenir l'utilisateur de l'usure de la lampe. Les détecteurs indiquent la perte d'efficacité et la nécessité de réaliser la maintenance telle que le nettoyage de la lampe ou bien son remplacement.

▪ Avantages / inconvénients

Cette technologie est très performante contre les légionelles et les protozoaires qui leurs servent d'hôte (amibes). Ainsi récemment, le traitement UV a été retenu pour désinfecter les rejets d'une tour de refroidissement dans le milieu naturel. Les rayonnements UV n'ont pas d'effet sur les caractères physicochimiques de l'eau (pH, l'odeur, composition).

Le problème majeur non maîtrisé par la désinfection UV est l'absence de rémanence dans les installations. Ainsi, un biofilm, situé quelques dizaines de cm après la lampe UV ne sera pas affecté, sauf production, au niveau de la cellule de sous-produits oxydants (radical hydroxyle par exemple). Pour un maximum d'efficacité, il est nécessaire de garder propre le système UV et le circuit d'eau.

Cependant la couleur, la turbidité et la composition chimique de l'eau peuvent interférer avec la transmission des UV, si bien qu'il est conseillé de déterminer l'absorbance des UV par l'eau à traiter avant d'installer l'équipement UV.

Les bactéries pouvant être protégées par les matières en suspension, il est donc recommandé de coupler à l'utilisation des UV un système approprié de filtration de l'eau (par exemple filtration sur sable).

En outre les dommages créés par les UV peuvent être sensiblement réversibles chez *Legionella* et d'autres bactéries si l'intensité des UV est trop faible. Ceci est dû aux mécanismes de réparation enzymatiques tels que ceux qui se produisent dans l'obscurité (réparation dans l'obscurité) et aux expositions aux lumières vives, incluant la lumière du soleil (photo réactivation).

▪ **Recommandations :**

Il est souhaitable de coupler un appareil UV avec :

- un filtre,
- une technique rémanente utilisée à temps partiel (cuivre-argent, chlore, brome, bactéricide de synthèse..).

ANNEXE 5 : Le biofilm

Au sens strict du terme, le biofilm désigne un dépôt d'origine essentiellement biologique qui se forme dans les canalisations d'eau. D'aspect muqueux, il se compose de micro-organismes devenus adhérents par sécrétion de polymères et/ou de macromolécules (exopolysaccharides) et d'exoenzymes. Toutes les bactéries de l'eau peuvent se trouver dans les biofilms, mais également leurs prédateurs, des champignons, des levures, des algues,...



Figure 14 : photographie d'un biofilm au microscope électronique [3].

Le phénomène principal de formation du biofilm est lié aux possibilités des micro-organismes de s'adapter aux conditions de survie difficiles (rugosité du matériau, présence d'un dépôt minéral, corrosion) et par la conception du réseau (zone de stagnation, présence de bras morts ...).

L'existence du biofilm a plusieurs conséquences pratiques :

- il constitue un moyen de survie très efficace des micro-organismes ;
- en cas de variation importante de la pression ou du débit dans un réseau, il représente un risque de relargage massif des micro-organismes ;

- il rend inefficace les désinfectants qui ne peuvent atteindre que la couche superficielle du biofilm, laissant intacts les micro-organismes inclus dans le biofilm ;
- il réduit l'activité des désinfectants oxydants (chlore, acide peracétique) qui sont en partie consommés par les matières organiques qui le constituent. Pour toutes ces raisons, il est impératif de réaliser un nettoyage minutieux des surfaces des réservoirs et des canalisations d'eau (physique par brossage ou chimique par un agent détartrant) avant toute opération de désinfection.
- Par extension on appelle aussi biofilm les dépôts muqueux formés sur les endoscopes ou les sondes après leur utilisation.

**ANNEXE 6 : formulaire de déclaration
obligatoire**

Questionnaire à retourner
à la DDASS de :

LEGIONELLOSE

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

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

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

CARACTERISTIQUES DU PATIENT Initiale du nom _____ Prénom _____

Date de naissance |____|____|____| Sexe M F Code postal du domicile _____
Profession : _____

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

Evolution : Guérison Encore malade Décès si oui, date décès
|____|____|____|

CONFIRMATION DU DIAGNOSTIC

	Pos	Ilég	Non effectué
Culture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Immuno. directe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antigène soluble urinaire	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sérologie	
1er prélèv. Date	2ème prélèvement Date
Titre 1 :	Titre 2 :
<input type="checkbox"/> En cours <input type="checkbox"/> Non effectué	<input type="checkbox"/> En cours <input type="checkbox"/> Non effectué

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

Figure 15 : Fiche de déclaration obligatoire – recto.

FACTEURS FAVORISANTS

Hémopathie ou cancer Corticothérapie Autres immunosuppresseurs
 Tabacisme Diabète Autres préciser :

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

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

Indiquer précisément les lieux (ville, pays) et types d'hébergement (adresse)

Voyage, hôtel, camping... Oui Non du |__|__|__| au |__|__|__| _____
 du |__|__|__| au |__|__|__| _____
 du |__|__|__| au |__|__|__| _____

Piscine, jacuzzi.. Oui Non préciser _____
 Autre exposition Oui Non préciser _____

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

Oui Non Si oui, préciser :

MEDECIN DECLARANT

Date de déclaration |__|__|__|

Nom : _____ Adresse : _____

Tél : _____ Signature et tampon

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

Figure 16 : Fiche de déclaration obligatoire – verso.

**ANNEXE 7 - Fiche de suivi d'un cas de
légionellose -**

Nom : Prénom : né le :

Adresse

Hospitalisé du : au : service(s)

Evolution :

Diagnostic :

Ag urinaire le

Culture :

Prélèvement : date :

Sérologie :

Premier prélèvement

date :

Deuxième prélèvement date :

Hospitalisations antérieures :

facteurs de risque :

Commentaires :

Figure 17 : Exemple de fiche de suivi d'un cas de légionellose.

BIBLIOGRAPHIE

1 - Desenclos J. C. - Les Progrès de la surveillance et de la prévention de la légionellose. - *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2002, 30-31, 149.

2 - Biomagazine. - Legionellose : épidémies ou cas isolés ?.[en ligne]. – disponible sur :

http://www.cite-sciences.fr/francais/ala_cite/expo

(consulté le 11/10/2002)

3 - Mounier M., DENIS F. - La légionellose. - *Actualités pharmaceutiques*, 2001, 397, 15-16.

4 - Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinon G., Vargues R. – Legionella pneumophila : pouvoir pathogène et habitat. In : Bactériologie médicale : techniques usuelles. – Paris : Simep éd., 197, 170-171.

5 - Decludt B., Guillotin L., Van Gastel B., et al. - Foyer épidémique de légionelloses à Paris en juin 1998.- *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 1999, 21, 83-85.

6 - Campese C., Decludt B. - Les legionelloses déclarées en France en 1999. - *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2000, 52, 235-237.

7 - Sciences et avenir. - La légionellose .[en ligne]. – disponible sur :

<http://www.sciencesetavenir.com/tempsfort/p664/a19551.html>

(consulté le 05/08/2002)

8 - Société CI 3S. – Dossier légionellose .[en ligne]. - Disponible sur :

<http://sante99online.fr/magazine/article.asp?id=27865>

(consulté le 10/09/2002)

9 - Lattimer G., Ormsbee R. A. - Legionnaires'disease. - Neu H. C., Whelton A., William J. D. Ed., Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, 1981, 250 p.

10 - Chen J. R., Miller T. E. - Legionnaires' disease : Nickel levels. - *Science*, 1977, 196 : 906-908.

11 - European mineralogy museums. – Légionellose, historique .[en ligne]. – Disponible sur :

http://euromin.w3sites.net/Nouveau_site/histoire/20eme/20_4f.htm

(consulté le 05/06/2002)

12 - Committee on Interstate and Foreign Commerce, House of Representatives. - For the purpose of discussing the causative factors of the "Legionnaires' Disease." . - Hearing before the Subcommittee on Consumer Protection and Finance, Ninety-Fourth congress, Nov. 23-24, 1976. (Serial N° 94-159). - U.S. government Printing Office, Washington, D.C.

13 - Kaar D. E., Bibb W. F., Moss C. W. - Isoprenoïd quinones of the genus *Legionella*. - *J Clin Microbial*, 1982 ; 15 : 1044-1048.

14 - Société de bactériologie systématique et vétérinaire. – Legionella. [en ligne]. – disponible sur :

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/II/legionella.html>

(consulté le 12/10/2002)

15 - Georges J. R., Pine L., Reeves M. W., Harrel W. K. - Amino acid requirement of *L. pneumophila*. - *J. Clin Microbial*, 1980 ; 11: 286-291.

16 - Serveur des Ministères et Administrations du Grand-Duché de Luxembourg. – Caractéristiques microbiologique et écologiques des légionelles .[en ligne]. – Disponible sur :

http://www.etat.lu/MS/INSP_SAN/legion2.html

(consulté le 20/10.2002)

- 17 - Flesher A. R., Ito S., Mansheim B. J., Kasper D. L. - The cell envelope of the legionnaires' disease bacterium; morphologic and biochemical characteristics. - *Ann Intern Med*, 1979, 90 : 628-630.
- 18 - Moss C. W., Weaver R. E., Dees S. B., Cherry W. B. - Cellular fatty acid composition of isolates from legionnaires' disease. - *J Clin Microbiol*, 1977, 6 : 140-143.
- 19 - Belyi Yu F., Tartakovskii I. S., Vertiev Yu V., Prosorovskii S. V. - Signal transduction in eukaryotic cells and intracellular parasitism of Legionella. - *Biomed Sci*, 1991 ; 2(6) : 551-556.
- 20 - Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. - Manuel de bactériologie clinique volume 2. - Paris, éditions scientifiques Elsevier, 1992 : 1063-1082.
- 21 - Ehret W., Ruckdeschel G. - Membrane proteins of Legionellaceae 1. Membrane proteins of different strains and serogroups of *L. pneumophila*. - *Zbl Bakt Hyg* 1985, A259: 433-445.
- 22 - Bortner C. A., Miller R. D., Arnold R. R. - Effects of amylase on in vitro growth of *L. pneumophila*. - *Infect Immun* 1983, 41 : 44-45.
- 23 - Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Montiel H. - Bactériologie Clinique, 2^{ème} édition. - Paris, marketing édition, 1992 : 306-312.
- 24 - Formica N., Yates M., Beers M., Carnie J., Hogg G., Ryan N., Tallis G. - The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. - *Epidemiol Infect*, 2001 Oct, 127(2) : 275-280.
- 25 - Singleton P. - Bactériologie, 4^{ème} édition. - Paris, Dunod édition, 1999 : 375-377.
- 26 - Institut international supérieur de formation des cadres de santé (Hôpitaux de Lyon). – Legionella et légionelloses : bioformation. [support de formation], 12-13 octobre 1999.

27 - Teissie J., Eynard N., Vernhes M. C., Benichou A., Ganeva V., Galutzov B., Cabanes P. A. - Recent biotechnological developments of electropulsation. – *Bioelectrochemistry*, 2002 Jan, 55(1-2) : 107-112.

28 - Gaillard J. L., Berche P., Simonet M. - Bactériologie, bactéries des infections humaines. - Paris, médecine-sciences édition, 1998 : 244-250.

29 - La page biologie. - Recherche des légionelles .[en ligne]. – Disponible sur :
<http://pascal.def.chez.tiscali.fr/Legionella.htm>
(Consulté le 16/10.2002)

30 - Portail de l'institut Pasteur. – Légionellose. [en ligne]. – Disponible sur :
<http://www.pasteur.fr/infosci/biblio/internet/dossiers/legionellose.html>
(consulté le 10.02.2003)

31 - Institut national de recherche scientifique. – Légionellose. [en ligne]. – Disponible sur :
http://www.irns.fr/produits/revues_dmttap/TC64.html
(Consulté le 10/03/2002)

32 - Colbourne J. S., Dennis P. J. - Distribution and persistence of Legionella in water systems. - *Microbiol Science*, 1985 ; 2(2) : 40-43.

33 - Selenka et al. – Bochum. - *Hyg. Med.* 1995, 20: 292-302.

34 - Lafranchi. – Légionellose. [en ligne]. – Disponible sur :
<http://lake.lafranchi.free.fr/page2.html>
(Consulté le 12 / 15/2002)

35 - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire. – Légionellose chez les animaux .[en ligne]. – Disponible sur :
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/11/legionella.html>
(Consulté le 18/02/2002)

36 - Le caducée. - La sous-déclaration de la légionellose en France .[en ligne]. – Disponible sur :

<http://www.caducee.net/DossierSpecialises/infection/legionellose/legionellose2.asp#epidemiologie>

(Consulté le 05/11/2002)

37 - Goetz A., Yu V. L. - Nosocomial Legionella infection. Hospital Epidemiologie and Infection Control. – C. G. Mayhall, Herausgeber. William & Wilkins, 1996 : 388-399.

38 - CHU de Rouen. – Legionellose. [en ligne]. – Disponible sur :

<http://www.chu-rouen.fr/ssf/pathol/legionellose.html>

(consulté le 08/08/02)

39 - Sabria M., Yu V. - Hospital-acquired legionellosis : solutions for a preventable infection. - *Lancet Infect Disease*, 2002 Jun ; 2(6) : 368-373.

40 - Nardonne A., Decludt B. - Evaluation épidémiologique du système de surveillance de la légionellose en 1998. - *Rapport InVS*, décembre 2000 : 43 p.

41 - Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé. – Légionellose, pathologie, traitement. [en ligne]. – Disponible sur :

<http://agmed.sante.gouv.fr>

(Consulté le 24/09/2002)

42 - Decludt B., Perrocheau A., Cerase-Feurra V. - Les légionelloses déclarées en France en 1997. - *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 1997, 6, 21-22.

43 - Dunn C. J., Barradell L. B. - Azithromycin. A review of its pharmacological properties and use as 3-day therapy in respiratory tract infections. - *Drugs.*, 1996 Mar ; 51(3) : 483-505.

44 - Bornstein N. – Activité comparée des antibiotiques sur les legionella. – *La lettre de l'infectiologie*, mai 1995, tome X, (8-9), 323-324.

45 - Fraser W, Tsai t f, orenstein w et al. - Legionnaire's disease : description of an epidemic of pneumonia. - N Engl J Med 1977 ; 297 : 1118 –1197.

46 - Roig J., Carreres A., Domingo C. - Treatment of Legionnaires' disease. Current recommendations. – *Drugs*, 1993 Jul ; 46(1) : 63-79.

47 –laboratoire d'analyse médicale Lanfranchi. - La maladie du légionnaire. [en ligne]. – Disponible sur :

<http://labo.lanfranchi.free.fr/page2.html>

(Consulté le 10/12/2002)

48 - Direction générale de la santé. – Le point sur : légionellose.

<http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/legionellose/index.htm>

(mise à jour mai 2002) (consulté le 31/08/2002)

49 - Goetz A., Yu V. - Nosocomial Legionella infection. In : Hospital Epidemiology and Infection Control / ed. C. G. Mayhall. – Baltimore : William & Wilkins, 1996 : 388-399.

50 - Yu. - *Lancet* 1983, 2: 307-310.

51 - Hambidge A. - Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques. - *Health Estate*, 2001 Jun ; 55(6) : 23-25.

52 - Ministère de l'emploi et de la solidarité. Direction générale de la santé. - Circulaire DGS n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose.

53 - Ministère de l'emploi et de la solidarité . Direction générale de la santé. - Circulaire n°98-771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans les bâtiments recevant du public.

54 - Hubert B. et al. - Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose. - *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 1997 ; (20-22) : 83-105.

55 - Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Section des eaux. Section des milieux de vie. Section des maladies transmissibles. – Gestion du risque lié aux légionelles. [document] juillet 2001, 64 p.

56 - MOREAU J. - La responsabilité pénale des établissements publics de santé et le nouveau Code pénal. - *L'actualité juridique du droit administratif*, 20 sept. 1995 : 620

57 - Segard J. F. – La légionellose : aspects juridiques. In : Symposium legionella : gestion du risque, contrôle et normalisation, jeudi 6 septembre 2001, Institut Pasteur de Lille. – [Lille : Institut Pasteur, 2001].

58 - anmteph. – Etat des lieux. [en ligne]. – Disponible sur :

<http://anmteph.chez.tiscali.fr/legio.pdf>

(consulté le 10/01/03)

59 - L'Encyclopédie Médicale – Légionellose. [en ligne]. Disponible sur :

<http://www.legionellose.com/>

(consulté le 24/09/02)

60 - Campese C., Decludt B. - Les légionelloses déclarées en France en 2001. - *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2002, 30-31, 150-151.

Table des matières

I- INTRODUCTION	-6-
II- HISTORIQUE	-9-
1) Evénements	-10-
2) Identification de l'agent infectieux	-12-
2-1) <u>Les agents toxiques considérés</u>	-13-
2-2) <u>Théorie du nickel carbonyle</u>	-14-
2-3) <u>Théorie du phosgène</u>	-15-
2-4) <u>Autres agents toxiques</u>	-16-
3) Cause réelle de la maladie du légionnaire	-16-
III- LA BACTERIE ET SON DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	-19-
1) Taxonomie	-20-
2) Caractéristiques bactériologiques et exigences métaboliques	-22-
2-1) <u>Caractères bactériologiques</u>	-22-
2-2) <u>Caractères métaboliques et facteurs de croissance</u>	-26-
2-3) <u>Structure antigénique</u>	-27-
3) techniques d'identification	-28-
3-1) <u>Culture et isolement</u>	-30-
3-2) <u>Immunofluorescence directe</u>	-32-
3-3) <u>Recherche des antigènes urinaires</u>	-34-
3-4) <u>Techniques de biologie moléculaire</u>	-35-

1- PCR	-35-
2- Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	-37-
3- Ribotypie	-39-
<u>3-5) Sérodiagnostique</u>	-43-
<u>3-6) Comparaison des méthodes de diagnostic de la légionellose</u>	-44-
4) Recherche de légionelles dans l'environnement	-45-
4-1) Lieux de prélèvements	-45-
4-2) Modalités de prélèvements	-46-
4-3) Modalités de transport	-47-
4-4) Méthodes d'analyse	-47-
4-5) Seuils admissibles	-48-
4-6) Comparaison de souches	-48-
IV- EPIDEMIOLOGIE	-50-
1) Caractéristiques épidémiologiques	-51-
<u>1-1) Fréquence</u>	-51-
<u>1-2) Réservoir</u>	-52-
<u>1-3) Transmission</u>	-53-
<u>1-4) Incubation</u>	-53-
<u>1-5) Facteurs de risques individuels</u>	-54-
<u>1-6) La légionellose chez les animaux</u>	-54-
2) Surveillance de la légionellose en France	-56-
<u>2-1) Déclaration obligatoire</u>	-57-
<u>2-2) Centre national de référence</u>	-58-
<u>2-3) Comité de lutte contre les infections nosocomiales</u>	-58-
<u>2-4) Réseau européen de surveillance des légionelloses acquises lors des voyages</u>	-58-
<u>2-5) Définition de cas</u>	-59-
1- Cas de légionellose	-59-
2- Cas groupés de légionellose	-59-

3- Légionellose nosocomiale	-59-
3) Investigation d'un cas isolé de légionellose	-60-
3-1) <u>Confirmation de diagnostique</u>	-60-
3-2) <u>Identification des expositions à risque</u>	-60-
1- légionellose nosocomiale	-60-
2- légionellose communautaire	-62-
4) Investigation épidémiologique de cas groupés	-63-
4-1) <u>Etude descriptive</u>	-63-
4-2) <u>Etude analytique</u>	-66-
4-2) <u>Discussion</u>	-66-
V- PATHOLOGIE	-68-
1) Manifestations cliniques	-69-
1-1) <u>La maladie des légionnaires</u>	-69-
1-2) <u>La fièvre de Pontiac</u>	-70-
1-3) <u>Les légionelloses extra-pulmonaires</u>	-70-
2) Mise en place du traitement	-70-
VI- OUTILS DE GESTION DU RISQUE	
« LEGIONELLE »	-75-
a. Maîtrise de la prolifération bactérienne	
environnementale	-76-
1-1) <u>Mesures techniques préventives</u>	-76-
1-2) <u>Mesures à court terme</u>	-77-
1-3) <u>Mesures à long terme, et mesures complémentaires</u>	-77-
1- Chloration	-77-
2- Ozonisation	-78-
3- Utilisation d'électrodes en cuivre-argent	-78-

4- Conclusion – recommandations pratiques	-79-
---	------

2) Réglementation – Recommandations -82-

2-1) Recommandations de portées générales -82-

1- Circulaire DGS n°97/311 du 24 avril relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose -82-

2- Circulaire n°98-771 du 31 décembre 1998 relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans les bâtiments recevant du public -83-

2-2) Réglementations relatives aux tours aéroréfrigérantes -84-

2-3) Réglementations relatives aux établissements thermaux -86-

2-4) Réglementations relatives à la protection des travailleurs -86-

VII- LA LEGIONELLOSE : ASPECTS

JURIDIQUES -88-

1) Le principe général de responsabilité -89-

2) Les infections nosocomiales -90-

3) Le risque pénal -93-

VIII- CONCLUSION -97-

IX- ANNEXES -99-

- Annexe I : Traitement thermique de l'eau -100-
- Annexe II : Traitement au chlore/eau de javelle de l'eau -103-
- Annexe III : Traitement au bioxyde de chlore de l'eau -107-

▪ Annexe III : Traitement au bioxyde de chlore de l'eau	-107-
▪ Annexe IV : Traitement de l'eau par ozonisation	-109-
▪ Annexe V : Le biofilm	-112-
▪ Annexe VI : Formulaire de déclaration obligatoire	-115-
▪ Annexe VII : Exemple de fiche de suivi d'un cas de légionellose	-118-

X- BIBLIOGRAPHIE -120-

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 313

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

BRY (Gaël). – Gestion du risque légionelle.

Université de Limoges, 2003. 132 p.

RESUME :

La légionellose est une infection respiratoire provoquée par des bactéries du genre *Legionella*. Ce germe est un bacille Gram négatif vivant dans l'eau dont la température optimale de prolifération se situe entre 25°C et 45°C. On peut le trouver dans tous les milieux aquatiques naturels ou artificiels, notamment dans les systèmes de distribution de l'eau sanitaire. Reconnue pour la première fois en 1976, la légionellose a été impliquée depuis dans de nombreux foyers épidémiques hospitaliers ou communautaires. Les infections qui peuvent être occasionnées par les légionelles sont de deux formes. L'une a un caractère bénin et est appelée fièvre de Pontiac, l'autre est une infection pulmonaire grave, entraînant le décès dans un peu plus de 20 % des cas, elle est appelée maladie du légionnaire. Dans ces deux formes, la transmission se fait par inhalation de fines gouttelettes d'eau ou aérosols (taille < 5 µm) contenant des légionelles.

La réduction du risque lié à cette bactérie repose avant tout sur un bon entretien des circuits et des installations d'eau, en particulier d'eau chaude, notamment dans les établissements de santé, les établissements thermaux et les bâtiments recevant du public.

DISCIPLINE : Bactériologie

MOTS CLES :

- légionellose
- surveillance
- prévention
- établissement de soins
- déclaration obligatoire