



**HAL**  
open science

## Prélèvements et détection de légionelles aérosolisées au niveau d'une douche dans un établissement de santé

C. Landelle, D. Zmirou-Navier, Philippe Vanhems, M. Maurin, J.-M. Seigneurin, P. Hartemann, L. Mathieu

### ► To cite this version:

C. Landelle, D. Zmirou-Navier, Philippe Vanhems, M. Maurin, J.-M. Seigneurin, et al.. Prélèvements et détection de légionelles aérosolisées au niveau d'une douche dans un établissement de santé. *Hygiènes*, 2006, 14, pp.267-273. hal-00427986

**HAL Id: hal-00427986**

**<https://hal.science/hal-00427986v1>**

Submitted on 19 Jul 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Article original

**Prélèvements et détection de légionelles aérosolisées  
au niveau d'une douche dans un établissement de santé**

C. Landelle<sup>1,2,3</sup>, D. Zmirou-Navier<sup>1</sup>, P. Vanhems<sup>2</sup>, M. Maurin<sup>3</sup>, J.-M. Seigneurin<sup>3</sup>, P. Hartemann<sup>1</sup>, L. Mathieu<sup>4</sup>.

1- Département Environnement et Santé Publique, Université Henri Poincaré, INSERM ERI n°11 :[EP]<sup>2</sup>R, Nancy.

2- Département d'hygiène hospitalière, épidémiologie et prévention, Hôpital E. Herriot, Lyon.

3- Laboratoire de bactériologie-virologie, CHU Michallon, Grenoble.

4- Ecole Pratique des Hautes Etudes, INSERM ERI n°11:[EP]<sup>2</sup>R, Nancy.

**Correspondance :**

**L. Mathieu**

Département Environnement et Santé Publique, Ecole Pratique des Hautes Etudes, INSERM ERI n°11, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Téléphone : +33 (0)3.83.68.34.86

Fax : +33(0).83.68.34.89

Email : [laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr](mailto:laurence.mathieu@medecine.uhp-nancy.fr)

**Résumé :**

La contamination humaine par *Legionella* se produit par inhalation d'un aérosol formé à partir d'un milieu hydrique colonisé. La quantification des légionelles dans l'eau des réseaux est actuellement préconisée pour évaluer le risque de survenue de légionellose. Notre travail a consisté à évaluer différentes techniques de quantification des légionelles dans les aérosols. Quatre séries de prélèvements ont été effectuées au même point d'usage, dans un établissement de santé, sur une période de sept jours : deux prélèvements d'eau chaude (premier jet et fin de douche) et six prélèvements d'aérosols réalisés avec deux impacteurs en milieu liquide (Impinger

SKC), deux impacteurs sur gélose (MAS100®) et deux membranes de filtration. Les légionelles ont été quantifiées par culture sur gélose (méthode de référence) et par hybridation *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH). L'eau chaude contenait entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/L de *Legionella* sp. cultivables (essentiellement *Legionella pneumophila* SG 2 à 14). Aucune *Legionella* cultivable n'a pu être détectée dans les aérosols de douche. Par contre, la technique FISH associée à l'impaction en milieu liquide a permis la détection de 10 à 100 légionelles/L d'air. Les ratios des concentrations en légionelles dans l'eau et dans l'air varient de  $1,9.10^3$  à  $1,8.10^4$ . La technique FISH présente l'avantage d'être rapide (1 jour *versus* 10 jours pour la culture). Le couplage d'une collecte par impaction en milieu liquide et une détection par FISH permettrait un gain de temps important lors d'une investigation de cas et pourrait permettre de mieux caractériser l'exposition de population à l'agent *Legionella*.

**Mots clefs : Légionelles, Aérosol, Hybridation *in situ*, Culture, Impaction en milieu liquide**  
**Key words : Legionella, aerosols, In Situ Hybridization, Culture Techniques, Air Sampling**

En 1976, à Philadelphie, lors d'un congrès de l'American Legion comportant 4400 participants, 182 d'entre eux ont été atteints d'une pneumonie foudroyante d'étiologie inconnue. 141 personnes furent hospitalisées (81 %) et 29 décédèrent (16 %) (1). En janvier 1977, le « Center for Diseases Control » (CDC) d'Atlanta annonça la découverte par McDade et son équipe (2, 3) d'une nouvelle espèce bactérienne (*Legionella pneumophila*) responsable de cette « anadémie » (contamination multiple sans contamination inter humaine) appelée, compte tenu des circonstances « maladie des Légionnaires ». Plusieurs travaux ont ensuite montré que cette bactérie était également responsable d'une maladie antérieurement décrite, notamment à Pontiac en 1968 et responsable d'un syndrome pseudo-grippal, d'où le terme de Fièvre de Pontiac (4). Depuis, d'autres espèces appartenant au genre *Legionella* ont été identifiées et le terme de « légionelloses » est actuellement utilisé pour désigner toutes les infections dont elles sont responsables.

La contamination humaine par les légionelles se fait par inhalation d'aérosols formés à partir de milieux hydriques contaminés. La prévention actuelle de la légionellose repose notamment sur la quantification des légionelles dans les réseaux d'eau, par méthode de culture (Norme AFNOR NF T90-431 ; septembre 2003) (5). Toutefois, cette méthode est longue (dix jours), et ne donne pas forcément une bonne appréciation de la contamination de l'air par *Legionella*. Notre étude porte donc sur la mise au point d'une technique optimale de prélèvement et de

détection des légionelles aérosolisées permettant de mesurer cette contamination aérienne, et sur la comparaison de deux techniques (culture *versus* hybridation *in situ*), cette dernière technique permettant de rendre un résultat beaucoup plus rapidement, ce qui est essentiel pour identifier une source de contamination au cours d'une épidémie.

## **1- Matériel et méthodes**

### **11- Conditions générales de prélèvement**

Des prélèvements d'eau et d'aérosols ont été effectués au mois d'avril 2003 dans un pavillon d'un établissement hospitalier disposant d'un réseau d'eau mitigé, sur une douche utilisée quotidiennement et située à l'extrémité du réseau. Quatre séries de prélèvements ont été effectuées sur une semaine, trois à 11 heures du matin (J0, J+1 et J+7) après la douche des patients et un (J+5) a été effectuée à 5 heures 45, avant la douche des patients. Les légionelles ont été détectées par la méthode de référence : la norme AFNOR NF T90-431 (novembre 1993) (6) et en parallèle par une technique d'hybridation *in situ* (ou Fluorescence *in situ* hybridization ou FISH) adaptée des travaux de Manz *et al.* (7).

### **12- Prélèvements d'eau**

Un premier prélèvement d'eau a été réalisé dès la mise en fonctionnement de la douche dans un flacon stérile contenant du thiosulfate de sodium pour bloquer l'action oxydante d'un éventuel résidu de chlore dans l'eau. Il correspondait au « premier jet ». Ce premier prélèvement, fait sans flambage, à pression et température d'eau chaude maximum était de 300 mL environ. Deux ensemencements directs de 0,2 mL sur gélose GVPC (Glycine, Vancomycine, Polymyxine et Cycloheximide) ont été effectués. L'identification d'espèce et de séro groupe des légionelles isolées a été réalisée par immunofluorescence directe et sérotypage. La détection par hybridation *in situ* (8) a été réalisée sur les 300 mL restants. La douche était alors laissée en fonctionnement pendant 5 à 7 minutes. Un deuxième prélèvement de 1 litre d'eau, à la fin de la douche, était réalisé et la température de l'eau était mesurée. Cinq cents mL ont été utilisés pour la culture selon la norme AFNOR. Trois cents mL ont été filtrés et traités par hybridation *in situ*. La limite de détection de la norme AFNOR est de  $5.10^3$  légionelles/L d'eau quand l'eau estensemencée sans concentration préalable de l'échantillon. La limite de

détection pour l'hybridation *in situ* est de  $4,5 \cdot 10^3$  légionelles/L d'eau. La température de la pièce et l'hygrométrie étaient notées tout au long de la durée de la douche.

### **13- Prélèvements d'aérosols de douche**

Après les 5 à 7 minutes d'écoulement d'eau de la douche et un temps de repos de 1 à 2 minutes pour permettre la mise en œuvre des prélèvements d'air, trois types de biocollecteurs d'air, chacun en double, ont été mis en route simultanément.

#### **131- Impaction en milieu liquide**

Des appareils de type Impinger SKC permettent de collecter des aérosols bactériens selon le principe de l'impaction en milieu liquide. L'air est aspiré au travers d'un tube capillaire, puis propulsé tangentiellement à la surface d'un milieu liquide. Dans nos essais, le milieu liquide de recueil de l'échantillon d'air était constitué par 20 ml d'eau distillée stérile apyrogène. Les deux Impingers SKC étaient situés le plus proche possible du jet de la douche et les têtes de prélèvement orientées vers la douche. Pour des raisons pratiques et techniques, ces bioimpacteurs étaient situés sur une table, à 1 m du sol, à l'entrée de la cabine de douche de manière à homogénéiser les conditions de prélèvement d'un échantillonnage à l'autre. Deux prélèvements successifs de 10 minutes étaient effectués, avec changement du liquide de recueil entre les deux. Les Impingers SKC ne fonctionnent que à un débit de prélèvement fixe de 14,5 L/minute, soit un volume d'air prélevé de 145 L. Pour chaque échantillon, deux fois 0,2 mL ont été directement mis en culture sur gélose BCYE  $\alpha$  avec L-cystéine. Après incubation des géloses pendant 10 jours à  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , les colonies suspectes ont été comptées, repiquées, identifiées et sérotypées s'il s'agissait de légionelles. Le reste de l'échantillon était filtré sur membrane blanche en polycarbonate de porosité de 0,2  $\mu\text{m}$  et traité par hybridation *in situ*. La limite de détection théorique de la technique FISH dans ces conditions opératoires, i.e. un volume de liquide de recueil analysé de 18 mL et un volume d'air prélevé de 145L, est de 9 légionelles/L d'air.

#### **132- Impaction sur milieu solide**

Le MAS100<sup>®</sup> fonctionne sur le principe de l'impaction en milieu solide. L'air est aspiré et accéléré par passage au travers de trous (cribles). Les particules entraînées par le flux d'air

peuvent, suivant leur inertie, dévier des lignes de courant et venir s'impacter sur une surface placée au-dessous de la plaque perforée. Dans nos essais, cette surface est une gélose GVPC (9) spécifique des légionelles permettant d'évaluer directement la concentration des bactéries viables aérosolisées (en UFC/L d'air prélevé).

Trois prélèvements successifs de 250 L, 500 L et 1000 L d'air avec changement des milieux gélosés, ont été réalisés avec les deux appareils en parallèle et situés à 1 m du sol **dans les mêmes conditions que les Impingers SKC**. Les six géloses ont été incubées 15 jours à 37°C. Les colonies suspectes éventuelles ont été repiquées sur gélose BCYE avec L-cystéine et sur gélose BCYE sans L-cystéine pour permettre une identification du genre *Legionella*.

### **133- Filtration**

Deux filtres blancs en polycarbonate de 0,2 µm de porosité et 25 mm de diamètre disposés dans des cassettes de prélèvement spécifiques ont été connectés à deux pompes aspirantes. Ces filtres ont été situés à environ 50 cm du pommeau de la douche et fixés sur une des parois de la douche à 2 m du sol. Le prélèvement a duré de 30 minutes à 1 heure selon les essais. Le débit d'air étant de 10 L/min au maximum, le volume d'air prélevé au maximum pour chaque appareil était de 600 L. Les deux filtres ont été alors directement traités par hybridation *in situ*.

## **2- Résultats**

### **21- Conditions générales de prélèvement**

Les conditions de prélèvement des quatre séries d'essais ont été similaires. L'humidité relative avant le fonctionnement de la douche était comprise entre 32 et 50 % ; elle atteignait un pic à la fin de la douche (augmentation entre 23 et 56 % par rapport au taux initial) puis diminuait et revenait à sa valeur initiale au bout d'une heure de prélèvement. La température de la pièce augmentait progressivement tout au long de la génération de l'aérosol issu de la douche et l'on pouvait noter une augmentation de 1,5 à 4,4°C selon les essais. La température de l'eau de la douche était comprise entre 29 et 37°C.

### **22- Prélèvements d'eau**

Les résultats des prélèvements d'eau du premier jet et de ceux effectués en fin de douche obtenus par culture sont du même ordre de grandeur (entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/L en légionelles) sur toute la semaine. Les premiers prélèvements semblent néanmoins donner des résultats plus élevés que les deuxièmes (Tableau I). L'immunofluorescence directe et le sérotypage ont permis l'identification de *Legionella pneumophila* sérogroupes 2 à 14 dans des échantillons d'eau de la douche. Les mêmes prélèvements traités par hybridation *in situ* donnent également des résultats comparables (entre  $10^4$  et  $10^5$  légionelles/L) mais semblent indiquer une différence de concentration en légionelles moins marquée entre les prélèvements « premier jet » et ceux de « fin de douche ». Les résultats obtenus sont au moins dix fois supérieurs à la limite de détection de la technique ( $4,5 \cdot 10^3$  légionelles/ L d'eau). Ces techniques mettent en évidence un nombre légèrement plus important de *Legionella* (au maximum 1 log) entre la méthode d'hybridation *in situ* et la méthode par culture.

### **23- Prélèvements d'aérosols**

Aucune légionelle n'a pu être détectée par la méthode de culture lors des échantillonnages d'aérosols de douche par impaction en milieu liquide (Impinger SKC) ou par impaction sur milieux gélosés (MAS100®) (Tableau II).

#### **231- Impingers SKC**

L'ensemencement direct en duplicat des aérosols de douche prélevés par impaction en milieu liquide (Impinger SKC) sur gélose GVPC n'a pas permis de mettre en évidence de colonies de légionelles. L'analyse par hybridation *in situ* du milieu de recueil liquide a permis la mise en évidence de bactéries appartenant à la famille *Legionellaceae* du fait de l'utilisation de sonde oligonucléotidique spécifique (10). Les concentrations moyennes en légionelles aérosolisées étaient comprises entre 10 et 100 légionelles/L d'air. La limite de détection de cette technique est de 9 légionelles/L d'air. Le premier prélèvement d'air de 10 minutes montre globalement un nombre plus élevé de légionelles que le deuxième prélèvement de 10 minutes (Figure 1). Dans nos conditions opératoires, nos résultats sont du même ordre de grandeur tout en présentant des fluctuations journalières, sans toutefois révéler de différences entre les niveaux bactériens avant et après la douche des patients. Il semble exister une relation de proportionnalité entre le nombre de légionelles dans l'eau et dans l'air, à travers les quatre séries de manipulations (Figure 1). Le ratio entre la concentration de légionelles détectées par la

méthode d'hybridation *in situ* dans l'eau et celle détectées avec la même méthode dans l'aérosol varie de  $1,9.10^3$  à  $1,8.10^4$ .

### **232- MAS100®**

Aucune légionelle n'a été détectée après mise en culture directe des géloses prélevées et ré-isolement des colonies sur milieu spécifique (BCYE- $\alpha$  avec L-cystéine). Les boîtes comportaient néanmoins de nombreuses colonies de bactéries correspondant à des *cocci* et des bacilles à Gram positif. Des moisissures ont également envahi progressivement les boîtes de Pétri.

### **233- Filtres**

Au maximum 9 légionelles pour 536 Litres d'air prélevés ont été détectées par hybridation *in situ*. Ce n'est qu'à partir de 400 litres d'air prélevés que des légionelles commençaient à être visualisées par hybridation *in situ*.

## **3- Discussion**

### **31- Conditions générales de prélèvement**

Les conditions opératoires de prélèvements ont été reproduites à l'identique entre les quatre essais réalisés *in situ*. Il est logique de constater que des paramètres tels que l'hygrométrie et la température de l'air ambiant dans la pièce d'étude varient car ce ne sont pas des paramètres contrôlables dans un établissement de santé utilisé quotidiennement par des patients. Il est également nécessaire de préciser que nos conditions d'aérosolisation n'ont pas tenu compte de la présence de brise jet. Une personne sous une douche représente un obstacle et permet que les particules d'eau se brisent, et que des particules de plus petites tailles, aérosolisables et même inhalables se créent. La présence d'un mannequin sous la douche pour des essais futurs est donc envisagée.

### **32- Prélèvements d'eau**



Lors de cette étude, le nombre de légionelles présentes au point d'usage de cet établissement reste du même ordre de grandeur sur toute la semaine d'échantillonnage. Il s'agit d'un établissement fort contaminé, notamment du fait de la configuration du réseau d'eau (réseau étendu et présence de zone de stagnation) et de la température de l'eau chaude distribuée ([mitigeur en production](#)). Comme constaté par de nombreuses études, les légionelles présentent dans un réseau d'eau chaude y ont trouvé un environnement favorable et le colonisent (11-14). [Dès l'obtention des premiers résultats, l'établissement a été averti et des mesures correctives ont été mises en place \(choc thermique, purge, suppression du mitigeur en production\) comme le préconise la circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22/04/2002](#) (15).

Certains auteurs ont noté que la production d'un aérosol contaminé au niveau d'une arrivée d'eau se faisait essentiellement à partir des bactéries contenues dans l'eau située entre l'extrémité de cette arrivée et la valve du robinet (12). Le premier jet à l'ouverture d'un robinet peut donc être plus concentré en *Legionella* que le reste du jet d'eau, et ce d'autant plus après stagnation d'une nuit. Un prélèvement au premier jet simule en partie l'exposition d'un sujet au moment où il commence sa douche alors qu'un prélèvement effectué après flambage et purge du premier jet est plus représentatif de la qualité globale du réseau d'eau. Le moment du prélèvement influence donc fortement la quantification des *Legionella*, donc la caractérisation de l'exposition et la perception du risque lié à la présence de ces bactéries. La douche prélevée dans cet établissement est majoritairement contaminée par des *Legionella pneumophila* de séro groupe 2 à 14 (identifiées par culture), compte tenu de leur proportion importante par rapport au nombre total de *Legionella* mis en évidence par hybridation *in situ*. La différence entre les prélèvements premier jet et fin de douche concernant le nombre de *L. pneumophila* séro groupe 2-14 (obtenu par culture sur gélose) et le nombre de *Legionella*.sp. (obtenu par hybridation *in situ*) peut être expliqué par une perte de la cultivabilité des bactéries (16) et la présence de légionelles non cultivables (17-20).

### **33- Prélèvements d'aérosols**

#### **331- Impingers**

De manière concomitante à la culture, méthode de référence, la technique d'hybridation *in situ* ciblant les ARN ribosomiaux des bactéries a été aussi utilisée pour déterminer la contamination en légionelles de nos échantillons d'aérosols. La détection de bactéries du genre *Legionella* par hybridation *in situ* proposée pour estimer une activité physiologique de la cellule (7, 21), est

supérieure à la détection par culture. Cette technique est spécifique à 72 % du fait de l'emploi de sondes nucléiques complémentaires d'une séquence d'ARN appartenant aux *Legionellaceae* et sensible à 67 % (22). L'utilisation de cette méthodologie a été sollicitée car plusieurs auteurs ont rapporté la détection de légionelles alors qu'elles étaient incapables de croître sur milieu gélosé (légionelles viables non cultivables) (18, 19, 23, 24). Cependant, la lecture des résultats obtenus par hybridation *in situ* est difficile du fait d'une intensité de fluorescence des légionelles hybridées faible indiquant que les légionelles aérosolisées présentent probablement un nombre faible de ribosomes, en particulier du fait de leur état physiologique, comme cela a déjà été suggéré pour d'autres bactéries environnementales (25-28). Mais il faut préciser que la méthodologie FISH peut détecter les bactéries mortes ou en train de mourir mais ayant un pool d'ARN ribosomiaux encore suffisant pour être détecté par microscopie, aussi bien que les vivantes (20).

L'absence de légionelles cultivables après collecte par impaction en milieu liquide (Impinger SKC), alors qu'elles sont présentes dans l'eau de douche, peut s'expliquer par un trop faible volume d'aérosol collecté (i.e. 145 L), l'existence de légionelles viables non cultivables ou actives non cultivables (19), le stress de dessiccation lors de l'aérosolisation et de la collecte conduisant à une perte de la cultivabilité des bactéries aérosolisées (12, 29, 30). Par ailleurs, certaines souches de *L. pneumophila* ne sont pas cultivables sur milieu BCYE $\alpha$  avec L-cystéine (31).

Les dix premières minutes de recueil permettent de détecter des légionelles par hybridation *in situ* alors que le second prélèvement de 10 minutes donne des concentrations moindres voir nulles en légionelles. Sur la base des travaux de Dennis (13) et Tervieza (32), un prélèvement de 15 minutes, pour permettre de collecter un nombre optimal de légionelles peut être préconisé. Les résultats obtenus lors de ces essais préliminaires sont sans doute également influencés par la nature du milieu de recueil des légionelles : l'eau distillée stérile apyrogène (33). Des essais relevés dans la littérature montrent que le milieu de recueil a une importance sur la collecte des bactéries de l'air. Ainsi pour les légionelles, quelques études indiquent que le bouillon BYE permet de récupérer plus de légionelles comparativement à d'autres milieux testés (14, 24).

Nos résultats semblent indiquer une relation entre les légionelles dans l'eau et dans l'air, qui fluctuent de la même façon selon les jours et les heures de prélèvement. Cependant, des essais supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir mettre en évidence et quantifier le cas échéant ou infirmer une relation entre les légionelles dans l'eau et dans l'air. A notre connaissance, aucune donnée n'existe dans la littérature sur les taux de transfert eau/air pour les légionelles. Le nombre de légionelles cultivables dans l'eau rapporté au nombre de légionelles cultivables

dans l'aérosol nous permet d'obtenir un chiffre correspondant à la réduction du nombre de légionelles lors du passage de l'eau à l'air, qui varie selon les études de  $1,5 \cdot 10^6$  à  $7,2 \cdot 10^8$ . Lors d'une étude d'Ishimatsu (24), des souches de *L. pneumophila* séro groupe 1, 3 et 6 ont été retrouvées dans les prélèvements d'eau d'une tour aérorefrigérante. La concentration moyenne des légionelles cultivables était de  $1,2 \cdot 10^6$  UFC/L. Une UFC de *L. pneumophila* séro groupe 6, dont le profil de migration électrophorétique après PCR était identique à celui des souches retrouvées dans l'eau a été mise en évidence avec les Impingers ; le ratio de légionelles cultivables eau/air était de  $7,2 \cdot 10^8$ . Breiman (14) a effectué des dosages de légionelles simultanément dans l'eau du réservoir et l'air du panache d'une tour aérorefrigérante lors de l'investigation d'une épidémie de maladie des Légionnaires survenue dans une maison de retraite de Los Angeles en 1988. Il retrouvait plus de  $9 \cdot 10^6$  UFC/L dans l'eau du réservoir et  $2,3$  UFC/L d'air. La réduction du nombre de légionelles cultivables après aérosolisation était donc de  $3,9 \cdot 10^6$ . Une étude anglaise a réalisé des détections simultanées de *L. pneumophila* dans l'eau et dans l'aérosol produit par une douche. Les analyses ont mis en évidence des concentrations de l'ordre de  $10^3$  UFC/L dans l'eau et  $6,67 \cdot 10^{-4}$  UFC/L d'air, soit un ratio de légionelles cultivables entre l'eau et l'air de  $1,5 \cdot 10^6$  (13). Bien que les durées et volumes de prélèvements d'air, les milieux de recueil des Impingers SKC, les milieux d'ensemencement des légionelles ainsi que la méthode de détection des légionelles soient différentes par rapport à nos conditions expérimentales, nos résultats semblent prometteurs puisque la réduction de la concentration de légionelles mesurées par hybridation *in situ* pendant le passage de l'eau lors du premier jet à l'air varie dans notre étude de  $1,9 \cdot 10^3$  à  $1,8 \cdot 10^4$ .

### **332- MAS100®**

Parmi les nombreux milieux gélosés disponibles, les géloses GVPC ont été sélectionnées au vu de la mise en évidence de légionelles cultivables à proximité d'un bassin de boues activées d'une station d'épuration (34) et lors d'une épidémie de fièvre de Pontiac dont la source était une tour aérorefrigérante (35). Dans notre étude, aucune légionelle n'a pu être mise en évidence par impaction directe sur une gélose de type GVPC. La présence de moisissures a gêné la lecture par leur extension rapide. La présence de flore interférente sur la détection par culture de légionelles aérosolisées a précédemment été décrite (19, 24). Les résultats obtenus ainsi que les limites de certains biocollecteurs concordent avec ceux recensés dans la littérature. L'étude d'Ishimatsu, qui a utilisé conjointement un impacteur sur milieu solide (impacteur d'Andersen à six étages, appareil fonctionnant selon le même principe que le MAS et constitué d'une

succession de boîtes étagées, chacune collectant des particules aérosolisées de diamètre décroissant au cours de la progression de l'aérosol dans l'impacteur), et un impacteur en milieu liquide (Impinger) pour déterminer la contamination d'un panache de tour aérorefrigérante n'a pu conclure que sur les résultats issus de l'Impinger. Ceux issus de l'impaction directe sur milieu gélosé se sont avérés ininterprétable du fait de la présence d'une flore fongique interférente, et ce malgré la présence d'un antifongique dans le milieu de recueil (24).

Pour étudier la transmission par aérosol des légionelles présentes dans l'eau, Bollin (12) a prélevé des échantillons d'eau de robinet et de douche, des écouvillons de pommes de douche et de robinetterie et des prélèvements d'aérosol grâce à des bioimpacteurs d'Andersen. Ces résultats ont montré d'une part des coefficients de réduction très disparates d'un site à l'autre au sein du même réseau et d'autre part que ceux-ci ( $3 \text{ à } 8.10^7$ ) sont en moyenne plus élevés que ceux des Impingers (12). L'impossibilité manifeste de détecter des légionelles par la méthode d'impaction sur milieu solide (gélose) peut également être attribuée à la dessiccation de ces bactéries ainsi qu'au traumatisme de l'impaction, facteurs pouvant altérer la cultivabilité des légionelles (29). Il serait sans doute intéressant de travailler avec des milieux gélosés contenant des antifongiques et d'en évaluer l'influence sur la détection des légionelles. Les essais pourraient également être effectués avec un milieu spécifique des bactéries à Gram négatif car la plupart des isolats récoltés sont des bactéries à Gram positif, bactéries présentes dans l'air (36).

### **333- Filtres**

Bien qu'utilisée pour la collecte de micro-organismes aéroportés (37), à notre connaissance aucune publication ne porte sur la collecte de légionelles d'aérosol par filtration. Ceci peut s'expliquer probablement par des performances de collecte qui semblent faibles pour la filtration comparativement à l'impaction ou à l'impingement (32). Par ailleurs, le stress occasionné par l'aérosolisation et la collecte sur un filtre sec a sans aucun doute contribué à la perte importante de légionelles, même avec une détection des bactéries par hybridation *in situ*. Dans ces essais, la filtration apparaît comme le moyen de collecte le plus létal pour les bactéries et les légionelles en particulier, comme cela a déjà été observé dans quelques études (38, 39).

## **4- Conclusion**

Nos essais de prélèvement et de détection de légionelles aérosolisées à partir d'une douche contaminée ont permis la mise en évidence de légionelles. Pour le prélèvement d'aérosol, l'impaction en milieu liquide paraît être la méthode la plus efficace pour collecter des légionelles. Seule la technique d'hybridation *in situ* a permis la détection de légionelles à partir d'un aérosol. De plus cette technique s'effectue en un jour alors que la culture nécessite un délai de dix jours. La détection par hybridation *in situ* ne permet cependant pas de déterminer la viabilité des légionelles et la culture demeure nécessaire pour déterminer l'espèce, le sérotype et la viabilité des légionelles isolées. Le couplage de la technique de FISH à la culture permettrait un gain de temps important lors d'une investigation de cas de légionellose et pourrait permettre de mieux caractériser l'exposition de population à l'agent *Legionella*.

**Tableau I.** Résultats des quatre manipulations aux jours 0, 1, 5 et 7 (J0, J1, J5 et J7). Concentrations en légionelles cultivables (UFC/L) et en légionelles détectées par hybridation *in situ* (bactéries-FISH/L) dans les échantillons d'eau de douche prélevés au premier jet et après 7 minutes d'écoulement d'eau (fin de douche). Les chiffres entre parenthèses correspondent aux intervalles de confiance à 95% (norme NF EN ISO 62 22 (juillet 1999) (40))

-UFC : Unité Formant Colonies ; ND : non déterminé.

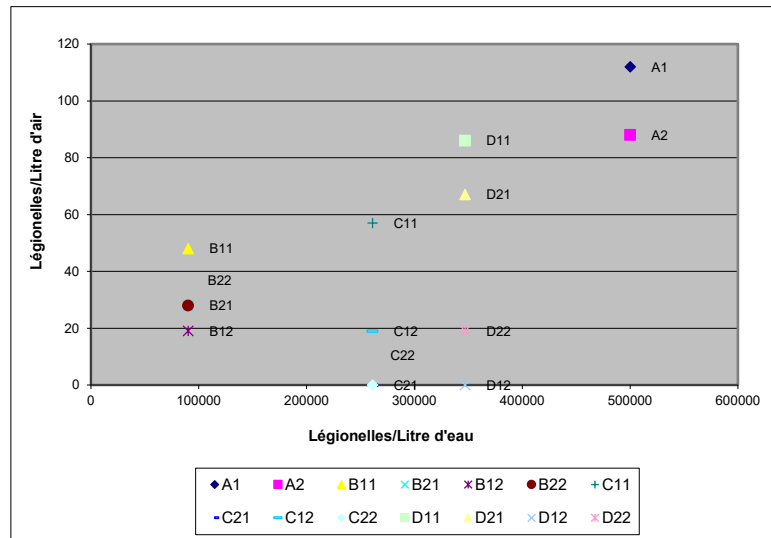
	Concentrations			
	Légionelles cultivables (UFC/L <sub>eau</sub> )		Légionelles hybridées (Bactéries-FISH/L <sub>eau</sub> )	
Prélèvements	1 <sup>er</sup> jet	Fin douche	1 <sup>er</sup> jet	Fin douche
J0	1,25.10 <sup>5</sup> (7,5.10 <sup>4</sup> -1,8.10 <sup>5</sup> )	6,7.10 <sup>3</sup> (5,6.10 <sup>3</sup> -7,9.10 <sup>3</sup> )	5.10 <sup>5</sup>	2,9.10 <sup>5</sup>
J1	6,5.10 <sup>4</sup> (2,5.10 <sup>4</sup> -1.10 <sup>5</sup> )	ND	9.10 <sup>4</sup>	7,2.10 <sup>4</sup>
J5	9.10 <sup>4</sup> (4,5.10 <sup>4</sup> -1,4.10 <sup>5</sup> )	1,7.10 <sup>4</sup> (1,4.10 <sup>4</sup> -2.10 <sup>4</sup> )	2,6.10 <sup>5</sup>	3,6.10 <sup>4</sup>
J7	2,5.10 <sup>4</sup> (0-5,5.10 <sup>4</sup> )	1.10 <sup>4</sup> (8,7.10 <sup>3</sup> -1,15.10 <sup>4</sup> )	3,5.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>5</sup>

**Tableau II.** Résultats des quatre manipulations aux jours 0, 1, 5 et 7 (J0, J1, J5 et J7). Concentrations en légionelles cultivables (UFC/L), en bactéries autres cultivables (UFC/L) et en légionelles détectées par hybridation *in situ* (bactéries-FISH/L) dans les aérosols de douche. Les chiffres entre parenthèse correspondent aux intervalles de confiance à 95% (norme NF EN ISO 62 22 (juillet 1999) (40)). Les chiffres obtenus pour les prélèvements d'air correspondent aux moyennes de deux prélèvements.

L'impinger A donne les résultats du premier prélèvement de 10 minutes, l'impinger B donne les résultats du deuxième prélèvement successif de 10 minutes. Les résultats Impinger correspondent à des prélèvements de 145 L d'air.

UFC : Unité Formant Colonies ; ND : non déterminé.

Prélèvements	Concentration			
	Légionelles cultivables (UFC/L <sub>air</sub> )	Autres bactéries cultivables (UFC/L <sub>air</sub> )	Légionelles hybridées (Bactéries-FISH/L <sub>air</sub> )	
J0	Impinger A	0	2	100
	MAS 250L	0	6	ND
	MAS 500L	0	6	ND
	MAS 1000L	0	16	ND
	Filtre	ND	ND	1 dans 400L d'air
J1	Impinger A	0	2	37
	Impinger B	0	1	24
	MAS 250L	0	32	ND
	MAS 500L	0	27	ND
	MAS 1000L	0	22	ND
	Filtre	ND	ND	3 dans 510 L d'air
J5	Impinger A	0	2	29
	Impinger B	0	53	10
	MAS 250L	0	32	ND
	MAS 500L	0	46	ND
	MAS 1000L	0	34	ND
	Filtre	ND	ND	8 dans 536 L d'air
J7	Impinger A	0	0	77
	Impinger B	0	0	10
	MAS 250L	0	25	ND
	MAS 500L	0	24	ND
	MAS 1000L	0	27	ND
	Filtre	ND	ND	0 dans 320 L d'air



**Figure 1-** Relation entre le nombre de *Legionella pneumophila* exprimé en UFC/L d'eau (identification par culture) et le nombre de légionelles/L d'air (identification par Hybridation *in situ*) sur les quatre jours de prélèvement. A1 correspond aux premières 10 minutes de prélèvement de l'impinger au jour J0. A2 correspond aux 10 minutes suivantes de prélèvement de l'impinger au jour J0. B11 et B21 correspondent aux deux résultats obtenus pour les deux impingers en parallèle lors des premières 10 minutes de prélèvement au jour J+1. B12 et B22 correspondent aux deux résultats obtenus pour les deux impingers en parallèle lors des deuxièmes 10 minutes de prélèvement au jour J+1. C11 et C21 idem que B11 et B21 pour le jour J+5. C12 et C22 idem que B12 et B22 pour le jour J+5. D11 et D21 idem pour jour J+7. D12 et D22 idem pour le jour J+7.

## Références bibliographiques

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, *et al.* Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297(22): 1189-1197.
2. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, *et al.* Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 1977; 297(22): 1197-1203.
3. Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, *et al.* Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol* 1981; 114(3): 337-347.
4. Glick TH, Gregg MB, Berman B, *et al.* Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 1978; 107(2): 149-160.
5. AFNOR. Norme AFNOR T90-431. Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. In : Normalisation française. AFNOR, Paris, Septembre 2003.
6. AFNOR. Norme AFNOR T90-431. Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. In : Normalisation française. AFNOR, Paris, Novembre 1993, 175-189.
7. Manz W, Amann R, Szewzyk R, *et al.* *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 1995; 141(Pt 1): 29-39.
8. Declerck P, Verelst L, Duvivier L, *et al.* A detection method for *Legionella spp* in (cooling) water: fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) on whole bacteria. *Water Sci Technol* 2003; 47(3): 143-146.
9. OFSP. Légionelles et légionellose. Office Fédéral de la Santé Publique, Berne, 1999, 1-31.
10. Grimm D, Merkert H, Ludwig W, *et al.* Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(7): 2686-2690.
11. Collectif. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionelloses. Circulaire DGS n°97/311. *BEH* 1997; 20-22: 1-11.



12. Bollin GE, Plouffe J, Para MF, *et al.* Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50(5): 1128-1131.
13. Dennis PJ, Wright AE, Rutter DA, *et al.* *Legionella pneumophila* in aerosols from shower baths. *J Hyg (Lond)* 1984; 93(2): 349-353.
14. Breiman RF, Cozen W, Fields BS, *et al.* Role of air sampling in investigation of an outbreak of legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. *J Infect Dis* 1990; 161(6): 1257-1261.
15. [DGS/DHOS. Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n°2002/243 du 22/04/2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé. 2002, Non parue au Journal Officiel. p. 35.](#)
16. Ohno A, Kato N, Yamada K, *et al.* Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot Spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(5): 2540-2547.
17. Hussong D, Colwell RR, O'brien M, *et al.* Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *BioTechnology* 1987; 5: 947-950.
18. Steinert M, Emody L, Amann R, *et al.* Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(5): 2047-2053.
19. Nystrom T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol* 2001; 176(3): 159-164.
20. Villarino A, Bouvet OM, Regnault B, *et al.* Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res Microbiol* 2000; 151(9): 755-768.
21. Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2000, 2(12): 1523-1535.
22. Buchbinder S, Trebesius K, Heesemann J. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(3-4): 241-245.
23. Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, *et al.* Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(9): 3585-3588.

24. Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, *et al.* Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. *Ann Occup Hyg* 2001; 45(6): 421-427.
25. Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59(5): 1354-1360.
26. Ramos C, Molbak L, Molin S. Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(2): 801-809.
27. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59(1): 143-169.
28. Delong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 1989; 243(4896): 1360-1363.
29. Wang Z, Reponen T, Grinshpun SA, *et al.* Effect of sampling time and air humidity on the bioefficiency of filter samplers for bioaerosol collection. *J Aerosol Sci* 2001; 32: 661-674.
30. Griffiths WD, Stewart IW, Reading AR, *et al.* Effect of aerosolization, growth phase and residence time in spray and collection fluids on the culturability of cells and spores. *J Aerosol Sci* 1996; 27: 803-820.
31. Bornstein N, Fleurette J. *Legionella*. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Manuel de bactériologie clinique*. Elsevier, Paris, 1992, 1061-1087.
32. Terzieva S, Donnelly J, Ulevicius V, *et al.* Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(7): 2264-2272.
33. Pascual L, Perez-Luz S, Amo A, *et al.* Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. *Can J Microbiol* 2001; 47(4): 341-347.
34. Stampi S, Zanetti F, Crestani A, *et al.* Occurrence and seasonal variation of airborne gram negative bacteria in a sewage treatment plant. *New Microbiol* 2000; 23(1): 97-104.
35. Friedman S, Spitalny K, Barbaree J, *et al.* Pontiac fever outbreak associated with a cooling tower. *Am J Public Health* 1987; 77(5): 568-572.
36. Gorny RL, Dutkiewicz J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9(1): 17-23.

37. Pillai SD, Ricke SC. Bioaerosols from municipal and animal wastes: background and contemporary issues. *Can J Microbiol* 2002; 48(8): 681-696.
38. Duchaine C, Thorne PS, Meriaux A, *et al.* Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(6): 2775-2780.
39. Durand KT, Muilenberg ML, Burge HA, *et al.* Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann Occup Hyg* 2002; 46(1): 113-118.
40. AFNOR. Norme AFNOR NF EN ISO 62 22. Dénombrement des micro-organismes revivifiables. Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé. *In* : Normalisation française. AFNOR, Paris, Juillet 1999.