

2m11.3270.4

Université de Montréal

**Acquisition de la maladie du Légionnaire suite à une
exposition domestique**

**Par
Annie Duchesne**

**Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences
(M. Sc.)
en microbiologie et immunologie**

Décembre 2004

© Annie Duchesne, 2004



W

4

U58

2005

V. 066

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé

**Acquisition de la maladie du Légionnaire suite à une exposition
domestique**

**présenté par
Annie Duchesne**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Dr Jocelyn Delorme
Président-rapporteur**

**Dr Michel Laverdière
Directeur de recherche**

**Dr Richard Gauthier
Membre du jury**

Résumé

La contamination du système de distribution de l'eau chaude domestique par *Legionella* représente un facteur de risque pour les cas de légionellose contractée dans la communauté. L'objectif de cette étude est de déterminer le risque réel d'acquisition de la maladie du Légionnaire associée avec la contamination domestique.

Tous les patients atteints de légionellose, documentée par une culture positive de juin 1998 à octobre 1999 et de juin 2002 à septembre 2004, sont éligibles à l'étude. Une recherche de *Legionella* par culture est effectuée sur les échantillons d'eau récoltés au domicile de chaque patient. Les souches cliniques et environnementales de *Legionella* sont comparées par des analyses d'immunofluorescence et d'agglutination. Les isolats jumelés par l'espèce et le sérotype sont caractérisés par électrophorèse à champ pulsé afin d'établir un lien épidémiologique entre eux.

Durant la période de surveillance de 58 mois, 17 patients avec des facteurs de risque et une culture positive ont été inclus dans l'étude. *Legionella* a été retrouvée dans l'environnement domestique de 6/17 patients (35%). Le profil génétique des isolats montre une similitude entre les souches cliniques et environnementales de 2 patients.

La contamination des systèmes de distribution domestique de l'eau représente une importante source de légionellose. Une intervention préventive des systèmes domestiques pour les patients avec des conditions médicales sous-jacentes devrait être étudiée.

Mots clés : maladie du Légionnaire, chauffe-eau électrique, PFGE

Summary

Contamination of domestic hot water systems by *Legionella* represents a potential risk factor and source of contamination for sporadic community-acquired Legionellosis (CAL) through aerosols created from their peripheral delivery systems. The objective of the current study was to determine whether the acquisition of sporadic CAL could be associated with contaminated domestic hot water systems.

All patients with sporadic culture-positive CAL from June 1998 to October 1999 and from June 2002 to September 2004 were eligible to the study. Cultures for *Legionella* were performed on water samples collected in each patient's home. The environmental *Legionella* isolates were paired and compared with the patient's initial respiratory specimen isolate by immunofluorescence/agglutination analysis. Matched isolates were further characterized by pulsed field electrophoresis in order to establish similarities between the isolates.

During this 58-months period, 17 patients with debilitating underlying diseases and culture-proven CAL were retrieved. *Legionella* was recovered from the hot water system in 6/17 patients' homes (35%). Genotyping of paired isolates showed similarity between the home isolates and the initial respiratory isolate in 2 patients.

Contaminated domestic hot water systems may represent an important source of contamination in sporadic CAL. Preventive interventions towards domestic water systems particularly in homes of patients with underlying risk factors for CAL should be further studied.

Key words: Legionnaires' disease, domestic electric hot water, PFGE

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xi
Chapitre 1 - Introduction	1
1.1 Introduction – La maladie du Légionnaire	1
1.1.1 Historique.....	1
1.1.2 Infection et symptômes	2
1.1.3 Traitement.....	2
1.2 <i>Legionella</i>.....	3
1.2.1 La bactérie	3
1.2.2 Écologie	6
1.3 Épidémiologie.....	10
1.3.1 Les populations concernées	10
1.3.2 Source et mode de transmission.....	10
1.3.3 Épidémiologie des légionelloses contractées dans la communauté.....	13
1.3.4 Acquisition de la maladie du Légionnaire suite à une exposition domestique	16
1.4 Hypothèse d'étude	18
1.5 Objectifs d'étude	18

Chapitre 2 – Méthodologie	19
2.1 Sélection des cas de légionellose.....	19
2.1.1 Critères d'inclusion.....	19
2.1.2 Critère d'exclusion	19
2.2 Repérage des cas de légionellose	19
2.2.1 Recrutement des patients	20
2.3 Rencontre avec le patient.....	21
2.3.1 Formulaire de consentement éclairé.....	21
2.3.2 Questionnaire épidémiologique.....	21
2.3.3 Échantillonnage	21
2.4 Procédés de traitement des échantillons d'eau.....	22
2.5 Jumelage entre les souches cliniques et environnementales	25
2.6 Comparaison du profil génétique	25
2.6.1 Électrophorèse à champ pulsé (PFGE)	25
2.6.2 Analyse de l'ADN par endonucléase de restriction (REA)	28
Chapitre 3 - Résultats	29
3.1 Les cas de légionellose	29
3.2 Caractéristiques démographiques.....	30
3.2.1 Distribution géographique des cas.....	30
3.2.2 Âge et sexe	31
3.2.3 Facteurs de risque	32
3.2.4 Statut socio-économique	33
3.2.5 Chauffe-eau domestiques.....	33
3.3 Recherche de <i>Legionella</i> dans l'eau résidentielle.....	33
3.3.1 Souches cliniques	33
3.3.2 Souches environnementales.....	34
3.3.3 Comparaison des souches cliniques et environnementales ..	34
3.3.4 Comparaison des profils génétiques.....	36

Chapitre 4 – Discussion	38
4.1 L'étude.....	38
4.2 Analyse des résultats.....	39
4.2.1 Cas de légionellose.....	39
4.2.2 Caractéristiques démographiques	40
4.2.3 Chauffe-eau domestiques.....	41
4.2.4 Étiologie bactérienne	42
4.2.5 Contamination domestique	43
4.2.6 Liens épidémiologiques	44
Chapitre 5 – Conclusions	46
Chapitre 6 - Références	48
Chapitre 7 - Annexes	59

Liste des figures

Figure 1. Morphologie cellulaire de la bactérie <i>Legionella</i>	3
Figure 2. Schéma d'identification de <i>Legionella</i> sp.....	6
Figure 3. Infection des amibes par <i>Legionella</i>	8
Figure 4. Étapes de formation d'un biofilm.....	9
Figure 5. Aspiration de gouttelettes d'eau contaminées par <i>Legionella</i> ..	11
Figure 6. Incidence de la légionellose entre 1988 et 2000 au Canada ...	15
Figure 7. Incidence de la légionellose entre 1988 et 2000 au Québec ...	15
Figure 8. Représentation schématique d'un chauffe-eau électrique	22
Figure 9. Direction du champ électrique de l'électrophorèse conventionnelle (A) et de l'électrophorèse à champ pulsé (B).....	26
Figure 10. REA des souches clinique et environnementales du patient #2	36
Figure 11. PFGE des souches clinique et environnementales du patient #11.....	37

Liste des tableaux

Tableau I : Espèces du genre <i>Legionella</i>	4
Tableau II : Critères d'interprétation des profils génétiques obtenus par PFGE.....	28
Tableau III : Distribution géographique des cas de légionellose	30
Tableau IV : Âge et sexe des patients admis dans l'étude.....	31
Tableau V : Facteurs de risque retrouvés chez les patients admis dans l'étude	32
Tableau VI : Comparaison des souches cliniques et environnementales	35

Liste des sigles et abréviations

®	marque déposée
°C	degrés Celsius
µm	micromètre
ACES	acide N2-acétamido-2-amino-éthane-sulfonique
AMMIQ	association des médecins microbiologistes infectiologues du Québec
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
BCYE	milieu au charbon activé et à l'extrait de levures (Buffered Charcoal Yeast Extract)
CDC	centre de prévention et de contrôle des infections des États-Unis (Centers for Disease Control and Prevention)
CO ₂	dioxyde de carbone
g	gravité
Kb	kilopaires de bases
LLCM	laboratoire de lutte contre la maladie
LSPQ	laboratoire de santé publique du Québec
MADO	maladie à déclaration obligatoire
n/a	non-applicable
n/d	non-déecté
nm	nanomètre
PFGE	électrophorèse à champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
REA	analyse par endonucléase de restriction (Restriction-endonuclease Analysis)
rpm	rotation par minute
SP	espèce
TSA	agar tryptone au soja (Tryptic Soy Agar)

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Dr Michel Laverdière, mon directeur de maîtrise, qui a su me pousser au-delà de mes limites et m'a permis de vivre des expériences professionnelles très enrichissantes.

Ce projet de recherche n'aurait existé sans le soutien inestimable de nos collaborateurs :

Merci au Dr Jean Joly et au Laboratoire de santé publique du Québec.

Merci à Madame Louise Ringuette qui est dotée d'une grande gentillesse. Votre rigueur est un exemple pour moi.

Merci à toutes les Directions de santé publique qui ont accepté de participer à l'étude.

Mille mercis aux patients et à leur famille.

Une partie du soutien financier a été assurée par Hydro-Québec. Un merci particulier aux Drs Michel Plante et Guy Riendeau. Il est tellement stimulant de travailler avec des personnes qui croient à l'importance du projet.

Un merci très spécial à Madame Christiane Restieri. Madame Restieri est toujours disponible et tellement généreuse de ses connaissances. Vous m'avez beaucoup apporté.

Faire une maîtrise est un cheminement professionnel important, mais sans un environnement humain enrichissant ceci n'a plus vraiment de sens. Le département de microbiologie est un endroit où j'adore travailler. À tout le personnel, j'apprécie votre compagnie.

Finalement, mon plus grand merci va à Dave, une personne extraordinaire qui sait me faire rire comme nul autre.

Merci,

Annie Duchesne

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Introduction – La maladie du Légionnaire

1.1.1 Historique

La maladie du Légionnaire est une maladie récente qui a fait ses premières victimes au milieu du XX^{ième} siècle. La maladie porte le nom qu'on lui connaît suite à des événements survenus en 1976 à Philadelphie aux États-Unis. Une épidémie de pneumonie s'était en effet déclarée dans un hôtel où se tenait la 58^{ième} convention annuelle de la Légion Américaine **(20)**. Des 182 personnes touchées par cette épidémie, 147 (81%) ont été hospitalisées et 29 (16%) sont décédées. La pneumonie sera dorénavant nommée la maladie du Légionnaire ou légionellose. Après quelques mois de recherche, la bactérie en cause est caractérisée et le genre *Legionella* est établi en 1979 **(38)**. Cependant, des études subséquentes **(37,54)** ont démontré que le pathogène avait déjà été isolé en 1943, puis en 1947, mais n'avait pu être associé à aucune maladie infectieuse connue.

Les cas de légionellose relatés à Philadelphie en 1976 ne sont toutefois pas les premiers cas décrits. En effet, l'étude rétrospective de sérums récoltés lors d'une épidémie ayant eu lieu en 1965 a révélé une séroconversion¹ à *Legionella* **(57)**. L'épidémie en question a touché un hôpital psychiatrique de Washington D.C. où 81 personnes ont présenté les symptômes de la maladie.

¹ La séroconversion désigne l'apparition dans le sang d'anticorps spécifiques aux antigènes d'un pathogène spécifique.

1.1.2 Infection et symptômes

Les symptômes provoqués par une infection à la bactérie *Legionella* se distinguent par 2 types de présentations cliniques : la fièvre de Pontiac et la maladie du Légionnaire.

➤ La fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac est une affection rare qui, après 1 à 2 jours d'incubation, provoque les symptômes suivants : fièvre, toux sèche, maux de tête, myalgie, malaise et vertige **(64)**. La fièvre de Pontiac s'apparente beaucoup à la grippe. Ce qui la distingue particulièrement de la maladie du Légionnaire est l'absence d'atteinte pulmonaire.

➤ La maladie du Légionnaire

La maladie du Légionnaire est la forme la plus sévère des deux maladies. La période d'incubation varie entre 2 et 10 jours. Les premiers symptômes qui apparaissent sont non spécifiques et peuvent impliquer de la fièvre (38,5°C et plus), des malaises, de la myalgie, de l'anorexie et des maux de tête **(18,27,46,64)**. La radiographie des poumons montre un infiltrat. La toux qui accompagne la maladie peut être sèche ou avec expectorations. De plus, des nausées et des douleurs abdominales ont été observées dans 10 à 20% des cas **(64)**.

1.1.3 Traitement

La légionellose se traite par antibiothérapie et l'antibiotique le plus souvent utilisé est l'érythromycine **(64)**. L'érythromycine fait partie de la classe des macrolides qui sont des agents bactériostatiques qui agissent sur l'ARN ribosomal (ARNr). La liaison de la molécule aux ribosomes a pour conséquence directe d'empêcher la synthèse des protéines **(63)**.

1.2 *Legionella*

1.2.1 La bactérie

La bactérie *Legionella* est le seul membre de la famille des *Legionellaceae*. Le genre compte à ce jour 48 espèces et plus de 70 sérogroupes (18). Malgré le grand nombre d'espèces, seulement 42% sont reconnues comme des pathogènes humains (tableau I). L'espèce la plus connue, *Legionella pneumophila* est responsable de 90% des cas de légionellose (18,27,64). *L. pneumophila* possède 14 sérogroupes dont 1, 4 et 6 qui sont les plus impliqués dans les infections humaines (64).

Legionella est un bâtonnet de 0,3 à 0,9 µm de large et 2 à 20 µm de long. La grande variation dans la longueur s'explique par le caractère pléomorphique de la bactérie. Étant une bactérie intracellulaire facultative, *Legionella* sp. se présente sous forme de coccobacille dans les tissus et les sécrétions. En culture, la bactérie prend une forme beaucoup plus allongée, presque filamenteuse (figure 1). Elle est Gram négatif, ne forme pas de spore et possède un à deux flagelles monopolaires.



Source : Dominique St-Pierre, LSPQ

Figure 1. Morphologie cellulaire de la bactérie *Legionella*

Tableau I
Espèces du genre *Legionella*

Pathogènes humains	Non pathogènes humains
<i>L. pneumophila</i>	<i>L. adelaidensis</i>
<i>L. anisa</i> ^a	<i>L. beliardensis</i>
<i>L. birminghamensis</i> ^a	<i>L. brunensis</i>
<i>L. bozemanii</i> ^a	<i>L. cherrii</i> ^a
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. drozanskii</i>
<i>L. dumoffii</i> ^a	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. erythra</i> ^a	<i>L. fallonii</i>
<i>L. feeleeii</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. gormanii</i> ^a	<i>L. genomospecies</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. gratiana</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. gresilensis</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. israelensis</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. londoniensis</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. lytica</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. parisiensis</i> ^a	<i>L. natarum</i>
<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. tucsonensis</i> ^a	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. wadsworthii</i> ^a	<i>L. rowbothamii</i>
	<i>L. rubrilucens</i>
	<i>L. santicrucis</i>
	<i>L. shakespearei</i>
	<i>L. spiritensis</i>
	<i>L. steigerwaltii</i>
	<i>L. taurinensis</i>
	<i>L. waltersii</i>
	<i>L. worsleiensis</i>

Basé sur la référence 18

^a Espèces auto-fluorescentes sous ultraviolet (365 nm)

La croissance de *Legionella* est fastidieuse et requiert la présence de L-cystéine (sauf pour *L. oakridgensis* et *L. spiritensis*), de α -kétoglutarate et de fer (64). Le milieu solide « buffered charcoal yeast extract » (BCYE) (Quélab, Canada) répond habituellement à ces exigences nutritives. Sur ce milieu de culture, la bactérie donne des colonies rondes et régulières de couleur grise avec des contours verdâtres ou rosés. Certaines espèces sont fluorescentes sous rayons ultraviolets (tableau I). Observées sous la lumière oblique d'un microscope stéréoscopique, les colonies ont un aspect de verre brisé très caractéristique. Les particularités de croissance de *Legionella* fournissent une clé simple d'identification (figure 2).

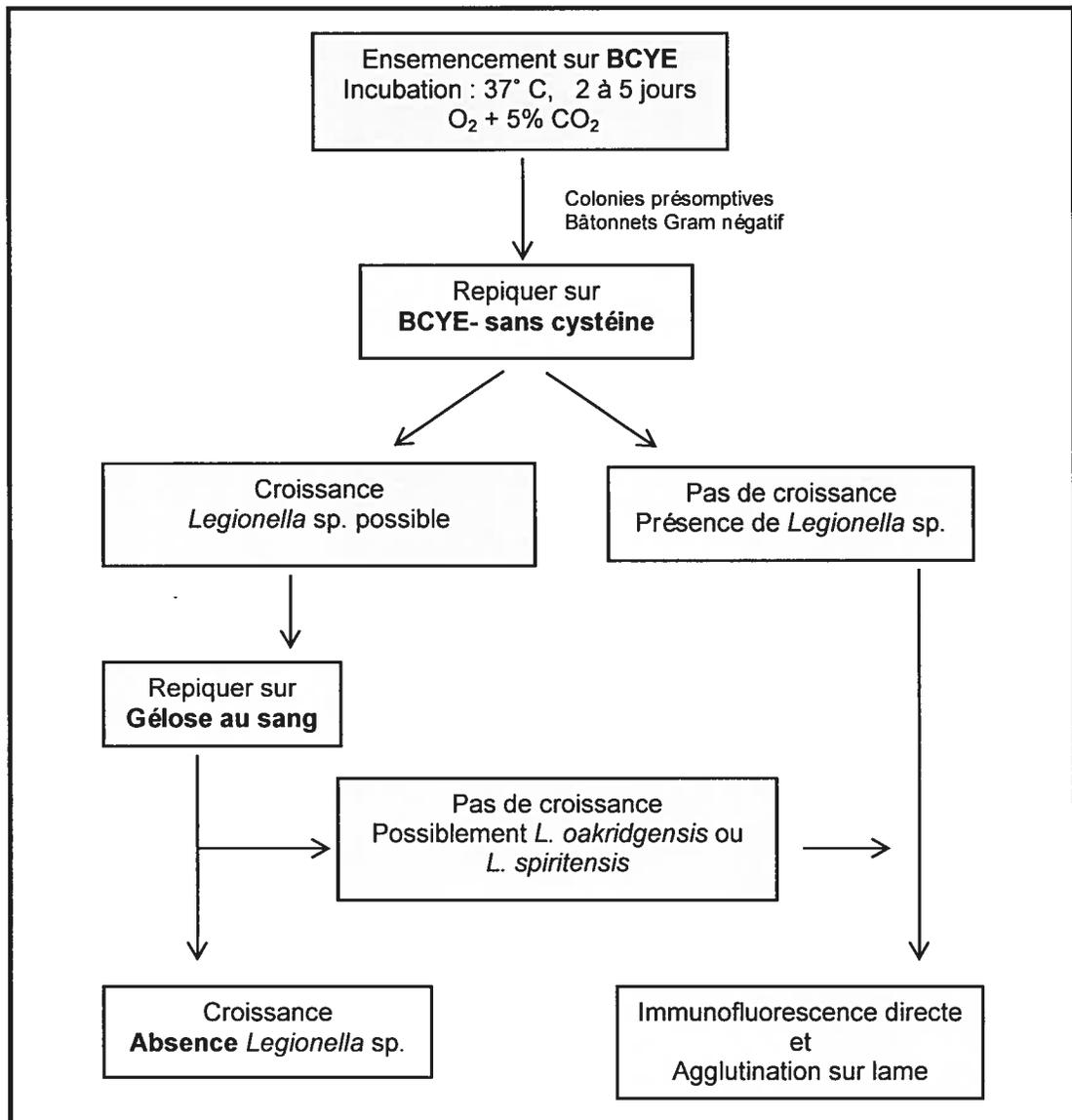


Figure 2. Schéma d'identification de *Legionella* sp.

1.2.2 Écologie

On retrouve la bactérie *Legionella* dans la plupart des plans d'eau douce naturels tels que les lacs et les rivières (19). *Legionella* est résistante à la chloration, donc elle survit au traitement et s'infiltré dans les systèmes de distribution d'eau potable. Conséquent, on la retrouve dans les

réservoirs d'eau douce artificiels comme les chauffe-eau et les tours de refroidissement **(15)**.

Legionella se multiplie à une température variant entre 25° et 40°C avec une valeur optimale de 35°C. Elle peut cependant survivre à des températures allant de 0° à 63°C.

La combinaison particulière de facteurs de croissance que nécessite la bactérie (L-cystéine, α -kétoglutarate et fer) est rarement retrouvée dans l'eau. Lorsqu'elle est présente, les bactéries à croissance plus rapide en compétition avec *Legionella* seront favorisées. Dans ces circonstances, l'accumulation de sédiments et la présence simultanée de bactéries comme *Flavobacterium* et *Pseudomonas* sera bénéfique pour *Legionella* car ils représentent une source de cystéine ou de substitut métabolique **(49)**.

Chez l'humain, la bactérie survit dans les macrophages en inhibant la fusion du phagosome aux lysosomes. Cette stratégie lui évite une exposition au contenu toxique du lysosome et lui permet de se propager chez l'hôte infecté. Dans l'environnement, *Legionella* vit en association avec des protozoaires (figure 3) **(10,42)**. Plus spécifiquement, la bactérie se multiplie dans 13 espèces d'amibes et 2 espèces de ciliés **(2)**. L'intérieur des protozoaires permet la prolifération de la bactérie car elle y trouve les nutriments essentiels à sa croissance et une protection contre les agressions de l'environnement **(41)**.

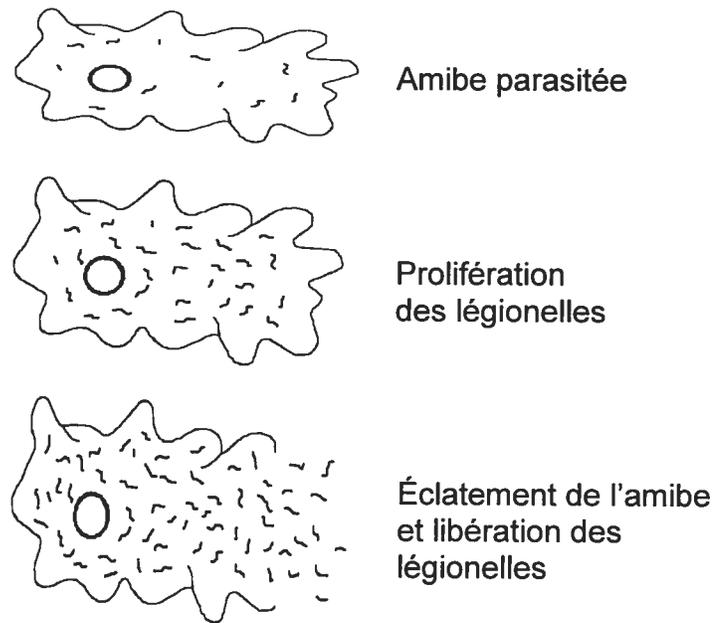
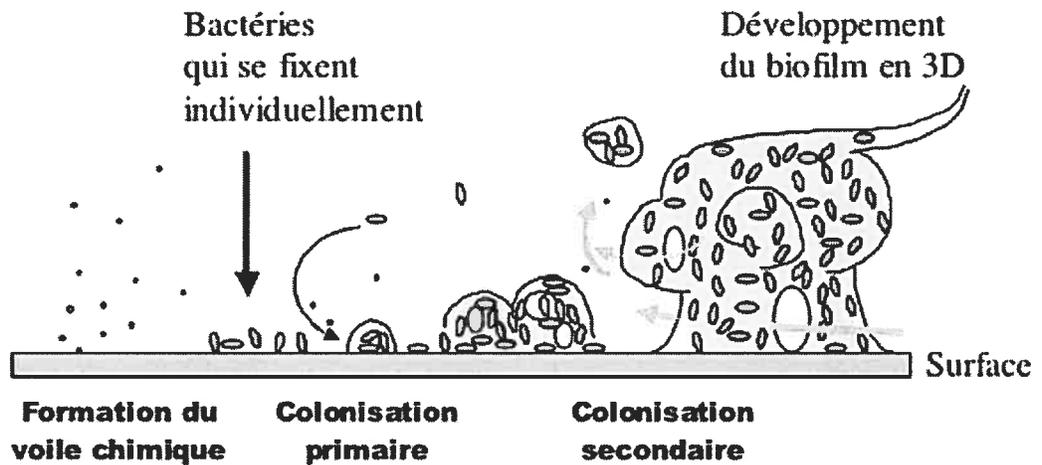


Figure 3. Infection des amibes par *Legionella*

Dans l'environnement, la bactérie peut se retrouver dans les biofilms. Les biofilms sont un autre mode de survie employé par la bactérie afin d'assurer sa protection et d'obtenir une source constante de nutriments. Ces associations sont d'une telle importance pour la survie de la bactérie que certaines études suggèrent que la bactérie ne pourrait survivre seule dans l'environnement **(41)**.

Définition du biofilm

Les **biofilms** sont des écosystèmes microbiens maintenus dans une matrice de polymères qui adhère sur toutes surfaces inertes ou biologiques (plomberie, unités soins dentaire, bouche, etc.). Les populations microbiennes se regroupent en microcolonies (figure 4) et forment des canaux où les nutriments circulent. C'est la structure du biofilm en elle-même qui permet d'assurer à l'écosystème une protection contre les multiples menaces exogènes. Les biofilms représentent un problème dans certaines infections chroniques et persistantes chez l'humain car ils diminuent l'efficacité des antibiotiques (14).



Source : référence 66

Figure 4. Étapes de formation d'un biofilm

1.3 Épidémiologie

1.3.1 Les populations concernées

Les populations les plus atteintes par la maladie du Légionnaire sont habituellement les personnes d'âge moyen et avancé (moyenne d'âge d'environ 55 ans) (27). De plus, les hommes sont davantage touchés par la maladie que les femmes (18,35). Outre ces particularités, d'autres conditions sont propices au développement de la maladie (27, 67) :

- le tabagisme,
- les maladies respiratoires chroniques,
- le diabète et,
- le déficit du système immunitaire relié à certaines conditions médicales.

Donc, une fois exposé à la bactérie, le développement de la maladie dépend de la condition de santé générale de la personne.

1.3.2 Source et mode de transmission

Le mode de transmission de la maladie est demeuré inconnu jusqu'en 1980. La première association entre l'eau potable et la légionellose a eu lieu lorsque la bactérie retrouvée chez deux patients d'une même chambre d'hôpital a été retrouvée dans l'eau d'une douche de l'unité de soins (60). L'eau, sous forme d'aérosol, est le véhicule de transmission de la maladie (figure 5). La bactérie doit atteindre les poumons pour provoquer la maladie, donc l'ingestion d'eau contaminée ne représente aucun risque. De plus, la transmission personne à personne n'a jamais été démontrée. La légionellose n'est pas une maladie contagieuse (47).

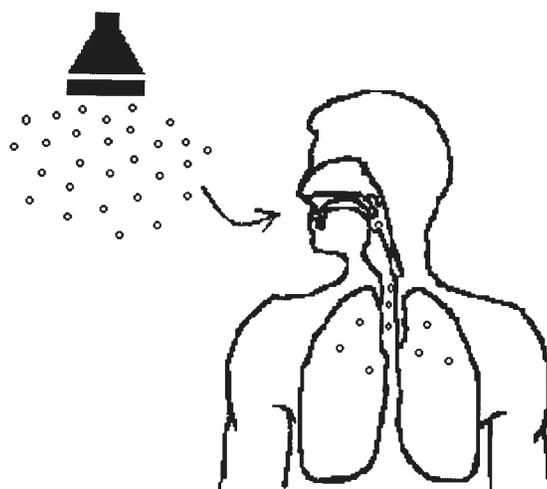


Figure 5. Aspiration de gouttelettes d'eau contaminées par *Legionella*

L'eau contaminée est vaporisée en fines gouttelettes par des structures telles que les robinets, les têtes de douche, les fontaines, les spas et les systèmes de climatisation. Cette eau contaminée prend sa source dans des réservoirs d'eau qui favorise la prolifération de *Legionella* notamment dans les chauffe-eau domestiques et les tours de refroidissement (1,2,15,32,50). La colonisation de ces réservoirs est favorisée par plusieurs facteurs : la résistance de *Legionella* à la chloration (46), la température de l'eau (1,32,49,61), l'accumulation de sédiments (49,61) et la présence de bactéries, de protozoaires et de biofilms (10,41,58).

➤ Colonisation domestique

Deux études réalisées dans la ville de Québec ont démontré un taux de colonisation des chauffe-eau domestiques de 31% (2,23). Une étude similaire menée à Pittsburgh aux États-Unis montre que 38% des chauffe-eau électriques et 6% des chauffe-eau à l'huile sont colonisés par la bactérie (32). Un taux de contamination équivalent a été retrouvé dans les résidences de Chicago (4).

Ces études ont établi une corrélation entre la contamination par *Legionella* et le type de chauffe-eau. En effet, les chauffe-eau électriques sont propices à la colonisation par *Legionella* tandis que les chauffe-eau à l'huile et au gaz le sont beaucoup moins. Ce qui distingue particulièrement ces types de chauffe-eau est surtout la position des dispositifs chauffant dans le réservoir. Dans le cas des chauffe-eau électriques, les éléments sont latéraux et situés entre 15 et 20 cm du fond tandis que les chauffe-eau au gaz naturel et à l'huile sont chauffés directement par le bas (23). Dans la partie basse des chauffe-eau électriques, l'eau est moins chaude (30° à 40°C pour un chauffe-eau ajusté à 60°C), ce qui favorise la prolifération de la bactérie. Donc, la présence de la bactérie dans ces systèmes est directement reliée à la température de l'eau.

Dans 44% des cas de contamination des réservoirs d'eau chaude, la présence de *Legionella* est également détectée dans les sorties périphériques où l'eau est susceptible d'être vaporisée (robinets et têtes de douche) (2).

➤ Colonisation des hôpitaux

La contamination des systèmes de distribution de l'eau dans les hôpitaux du Québec a aussi été évaluée dans le cadre d'une étude provinciale (1). Cette étude démontre la présence de la bactérie *Legionella* dans 57 hôpitaux sur 84 (68%). Dans une étude similaire réalisée aux États-Unis, 9 hôpitaux sur 15 (60%) étaient colonisés par la bactérie *Legionella* (61).

En plus des différents facteurs qui favorisent la croissance de *Legionella* dans l'eau potable, le système de tuyauterie des hôpitaux étant très complexe, certains points du réseau de distribution sont moins exposés à la circulation de l'eau (eau stagnante) et ainsi favorise le développement

d'importants foyers de colonisation. En effet, le mouvement de l'eau dans la tuyauterie empêche l'accumulation de sédiments et la formation de biofilms.

➤ Colonisation des tours de refroidissement

Les tours de refroidissement sont des installations que l'on retrouve dans les grands immeubles comme les hôtels et les hôpitaux. Ces tours utilisent l'eau comme système de refroidissement dans différentes installations comme c'est le cas des systèmes de climatisation. Ce type d'installation a souvent été impliqué dans des épidémies de légionellose car il représente un moyen de dissémination très rapide. Les gouttelettes d'eau contaminées par la bactérie *Legionella* sont générées par les tours de refroidissement, site de la colonisation. Via le système de ventilation, ces gouttelettes contaminées sont aéroportées dans tout l'immeuble (73).

Très peu d'études ont été réalisées sur l'étendue de la colonisation dans les tours de refroidissement en Amérique du Nord. À titre indicatif, une étude effectuée au Japon montrait dernièrement que 46% des tours de refroidissement étaient contaminées par la bactérie *Legionella* (53).

1.3.3 Épidémiologie des légionelloses contractées dans la communauté

La plupart des cas de légionellose sont des cas isolés (cas sporadiques) qui surviennent l'été et au début de l'automne (19,35). Dans la décennie des années 80' aux États-Unis, 11% des cas de la maladie ont été associés à des éclosions (35) et la plupart étaient nosocomiaux. On distingue, en effet, les cas de légionellose selon qu'ils soient acquis en milieu hospitalier (8,22,27,34,44) ou dans la communauté. La pneumonie contractée dans la communauté est associée, entre autres, à des hôtels (7,20,22,24,27) mais aussi à l'environnement domestique (29,30,50,52).

L'incidence et la sévérité de la maladie dépendront de l'importance de l'exposition et l'état du système de défense des personnes exposées.

Plusieurs pays ont un système de surveillance des cas de légionellose. Pour la plupart, ces systèmes sont passifs. Pour cette raison, les données actuelles sur le nombre de cas de la maladie sont probablement sous-évaluées.

Le CDC des États-Unis rapporte qu'entre 1980 et 1998, le nombre de cas de légionellose était de 356 par an **(68)**.

En 1996, la France comptait 80 cas de légionellose pour un taux de 0,13 cas par 100 000 de population. En 2000, le nombre de cas avait quintuplé (0,73 cas/ 100 000 habitants). Cette augmentation rapide des cas de légionellose est due à un renforcement du système de surveillance **(69)**.

Au Canada, la légionellose est une maladie à déclaration obligatoire (MADO). Le plus grand nombre de cas enregistrés entre 1988 et 2000 est de 102 cas en 1992 (0,36 cas/100 000 habitants) **(70)**.

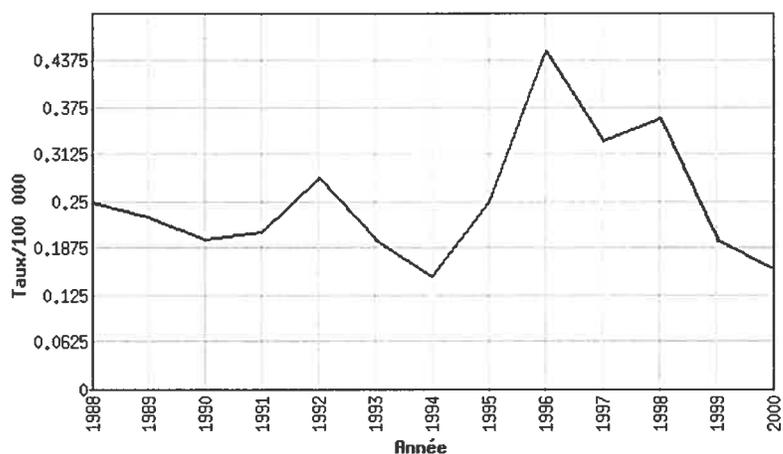


Source : référence 70

Figure 6. Incidence de la légionellose entre 1988 et 2000 au Canada

Depuis 1998, le nombre de personnes infectées au Canada semble être à la baisse avec seulement 44 cas en 2003 (0,15 cas/100 000) (12).

Au Québec, entre 1988 et 2003, le nombre de cas déclaré annuellement varie de 11 à 33 ce qui équivaut à des taux de 0,15 à 0,45 par 100 000 habitants.



Source : référence 70

Figure 7. Incidence de la légionellose entre 1988 et 2000 au Québec

D'après des études de surveillance active, le nombre de cas de légionellose est nettement supérieur aux données actuelles.

Dans une première étude réalisée sur les pneumonies contractées dans la communauté demandant une hospitalisation en Ohio, 3% étaient des cas de légionellose pour un taux de 7 cas par 100 000 habitants (35). Une autre étude réalisée dans des conditions similaires en France montre que 20% des pneumonies contractées dans la communauté sont causées par la bactérie *Legionella pneumophila* (5).

Suite à ces études, la CDC estime qu'il y aurait en réalité entre 8000 et 18 000 personnes (3,2 à 7,2 cas/ 100 000 habitants) atteintes par la maladie chaque année aux États-Unis (68). *L. pneumophila* serait un des trois pathogènes les plus fréquents dans les pneumonies contractées dans la communauté et la CDC estime que seulement 3% des cas sporadiques de légionellose seraient correctement diagnostiqués (64).

Considérant que le taux de pneumonies à *Legionella* contractées dans la communauté requérant une hospitalisation est de 7 par 100 000 habitants, le nombre réel de cas de légionellose au Québec serait d'environ 500 cas par an.

1.3.4 Acquisition de la maladie du Légionnaire suite à une exposition domestique

La présence de la bactérie *Legionella* dans les systèmes de distribution de l'eau potable est maintenant un fait bien établi, mais le risque d'acquisition qui s'y rattache demeure incertain.

L'étude de Chicago (4), mentionnée plus haut, révélait un taux de contamination des résidences de 32%. Cette même étude montrait également qu'aucun des locataires des logements et des maisons

colonisés n'avait développé des anticorps contre *L. pneumophila*. Tous ces locataires étaient immunocompétents.

Suite à l'investigation de l'environnement de patients atteints par la maladie, une étude réussie à faire le lien entre la contamination de l'environnement domestique et l'acquisition de la maladie (50). Vingt patients de Pittsburgh atteints d'une pneumonie à *Legionella* contractée dans la communauté ont été enrôlés dans cette étude. La bactérie a été retrouvée dans l'environnement domestique de 8 patients sur 20 (40%). Les souches cliniques et environnementales ont été comparées par une technique d'anticorps monoclonaux puis par analyse des sites de restriction.

1.4 Hypothèse d'étude

La présence de la bactérie *Legionella* sp. dans les chauffe-eau et les systèmes de distribution d'eau domestiques représente un risque potentiel d'infection chez les sujets à risque.

1.5 Objectifs d'étude

Étant donné le grand nombre de chauffe-eau domestiques colonisés par la bactérie *Legionella* et le peu de cas associés à cette contamination, l'objectif de cette étude est de déterminer les risques réels d'acquisition de la maladie du Légionnaire après une exposition dans l'environnement domestique.

Objectifs spécifiques:

- ✓ Repérer les cas de légionellose documentés par une culture positive et qui surviennent dans la province de Québec,
- ✓ Détecter la présence de la bactérie *Legionella* sp. dans l'eau de la résidence des patients admis dans l'étude,
- ✓ Établir un lien entre les souches cliniques et environnementales par comparaison des profils génétiques.

Chapitre 2 – Méthodologie

Ce projet d'étude a préalablement fait l'objet d'une approbation par le Comité de la Recherche et le Comité d'Éthique de la Recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont.

2.1 Sélection des cas de légionellose

Toutes les pneumonies à *Legionella* sp. qui sont survenues dans la province de Québec étaient éligibles à l'étude.

2.1.1 Critères d'inclusion

Pour être admis dans l'étude, les cas devaient répondre à certains critères :

- a) pneumonie contractée dans la communauté,
- b) culture des sécrétions respiratoires qui démontre la présence de *Legionella* sp.,
- c) propriétaire du chauffe-eau domestique,
- d) âgé de 18 ans et plus.

2.1.2 Critère d'exclusion

Les patients dont les symptômes ont débuté après un séjour en milieu hospitalier de 72 heures et plus ont été exclus de l'étude.

2.2 Repérage des cas de légionellose

Une collaboration étroite avec le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ), nous a permis de répertorier les cas de légionellose

contractée dans la communauté qui sont survenus au Québec de juin 2002 à octobre 2004.

Afin de consolider notre réseau de communication et de le rendre plus rapide, une lettre présentant le projet de recherche a été envoyée à toutes les Directions de santé publique du Québec. De plus, la lettre a été publiée dans le journal de l'association des médecins microbiologistes infectiologues du Québec (AMMIQ). Cette lettre avait pour intention d'inviter les différents intervenants à nous signaler les cas de légionellose de leur région.

2.2.1 Recrutement des patients

La Santé publique avait pour rôle d'établir un premier contact avec le patient ou sa famille afin d'obtenir son accord pour nous transmettre ses coordonnées. Le patient ou sa famille était ensuite contacté pour convenir d'une rencontre.

Les cas de légionellose diagnostiqués sans culture n'ont pas été admis dans l'étude car la souche isolée des sécrétions respiratoires est essentielle afin d'établir un lien avec une possible contamination de l'environnement.

De plus, seuls les cas de légionellose contractée dans la communauté suite à une exposition domestique ont été acceptés dans l'étude. Pour répondre à ce critère, le sujet devait avoir séjourné à son domicile dans les deux semaines précédant le début des symptômes.

2.3 Rencontre avec le patient

2.3.1 Formulaire de consentement éclairé

Lors de la rencontre avec le patient ou la famille, un formulaire de consentement approuvé par le Comité d'Éthique de la recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont (annexe A) est présenté au patient et signé par celui-ci (ou un membre de sa famille) et un témoin (agent de recherche). Une copie du formulaire lui est ensuite remise.

2.3.2 Questionnaire épidémiologique

La visite chez le patient débute avec un questionnaire épidémiologique. Le questionnaire se divise en trois sections : la condition médicale du patient, ses habitudes de vie et la structure de son domicile. Si le patient est décédé ou qu'il n'est pas dans l'état de répondre aux questions, les différents points sont vus avec à un membre de sa famille.

2.3.3 Échantillonnage

Des prélèvements d'eau sont effectués dans le chauffe-eau et les sorties d'eau périphériques de la résidence du patient.

Dans le chauffe-eau, 500 ml d'eau sont récoltées stérilement par le robinet de vidange, habituellement situé à la base du chauffe-eau (figure 8). En périphérie, l'eau des robinets de cuisine et de salle de bain est récoltée à deux reprises : un premier échantillon de 500 ml est prélevé stérilement dès l'ouverture du robinet d'eau chaude. Le deuxième échantillon de 500 ml est récolté au même robinet après avoir laissé couler l'eau quelques minutes, jusqu'à ce que la température maximale soit atteinte. Selon les habitudes de vie du patient, l'eau de la douche ou

du bain sera échantillonnée de la même façon qu'aux robinets. La température des échantillons est prise immédiatement après leur récolte. Les échantillons sont entreposés à 4°C et la mise en culture est effectuée dans un délai de 24 heures après l'échantillonnage.

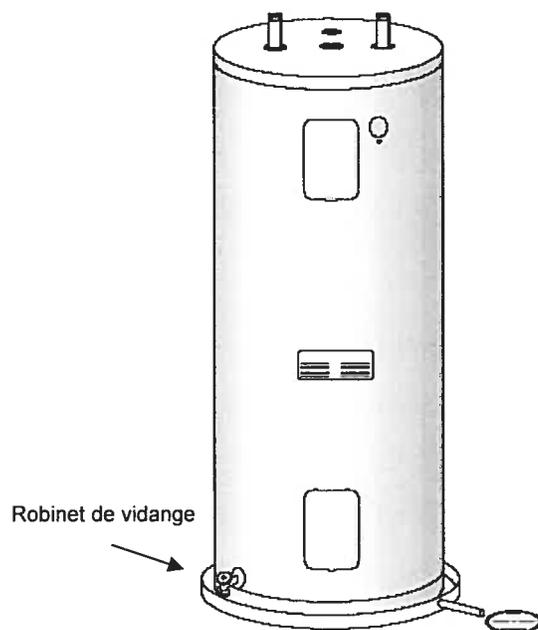


Figure 8. Représentation schématique d'un chauffe-eau électrique

2.4 Procédés de traitement des échantillons d'eau

➤ Concentration des échantillons

L'eau prélevée est concentrée par centrifugation à haute vitesse, soit 13000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré et le culot est suspendu dans 5 ml du surnageant. L'échantillon est concentré 100 fois.

➤ **Conservation des échantillons**

Un volume de 1 ml de l'échantillon d'eau concentrée est transféré dans un tube de congélation, identifié et entreposé à -80°C.

➤ **Culture**

La croissance de *Legionella* est fastidieuse et requiert la présence de L-cystéine (sauf *L. oakridgensis* et *L. spiritensis*), de α -kétoglutarate et de fer. La bactérie ne croît pas sur des milieux tels la gélose au sang ou "tryptic soy agar" (TSA). Le milieu solide "buffered charcoal yeast extract" (BCYE) (*Quélab*, Canada) a été élaboré spécifiquement pour répondre aux besoins nutritifs de *Legionella* (annexe C). En plus des composantes essentielles à la croissance de la bactérie, le charbon de bois contenu dans le milieu permet d'éliminer les radicaux toxiques d'oxygène et de prévenir l'oxydation de la cystéine (64).

Le culot obtenu de la concentration de l'échantillon initial est dilué 10 fois. Un volume de 0,1 ml du culot d'eau concentrée et du produit dilué est ensemencé sur le milieu BCYE. Il est nécessaire de diluer le culot d'eau concentrée car la quantité de bactéries peut être très variable d'un domicile à l'autre. Ainsi, la concentration de l'eau permet de repérer *Legionella* dans les échantillons ayant une faible contamination bactérienne, tandis que la dilution permet la détection de la bactérie dans les échantillons très contaminés. Les cultures sont incubées à 37°C dans un atmosphère ajusté à 5% de CO₂ ce qui stimule la croissance de la bactérie. Les cultures seront observées au troisième et au cinquième jours d'incubation afin d'identifier les colonies de la bactérie. Les colonies présumptives seront isolées sur le milieu BCYE. Après une croissance de 48 heures une colonie isolée est soumise à une coloration de Gram. Si la morphologie correspond à la bactérie recherchée, la procédure décrite à la figure 2 est suivie : les colonies présumptives sont repiquées sur

gélose sang et incubées dans les mêmes conditions que le milieu BCYE. L'absence de croissance confirme le genre *Legionella*.

➤ **Conservation des souches**

Les souches sont congelées à -80°C dans un bouillon Brucella supplémenté de glycérol 20%. Quelques colonies sont prélevées d'une culture pure à l'aide d'un écouvillon stérile et une suspension d'une turbidité correspondante à un MacFarland ≥ 3 est préparée directement dans le milieu de congélation.

➤ **Confirmation de l'espèce et du sérotype**

Les souches de *Legionella* sp. identifiées sont envoyées au LSPQ pour confirmer l'espèce et le sérotype. La détection de *Legionella pneumophila* est faite par immunofluorescence directe. Ce test consiste à détecter, avec un anticorps monoclonal marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, une protéine présente sur la membrane externe de tous les sérotypes connus de *L. pneumophila*. Les réactifs nécessaires à la coloration sont disponibles commercialement sous le nom « Monofluo *Legionella pneumophila* IFA test kit » (Genetic Systems). Chaque test est réalisé avec des contrôles positifs et négatifs. Un frottis des souches à tester est préparé sur lame à partir d'une culture pure. Après avoir fixé les cellules, quelques gouttes du réactif colorant anti-*Legionella pneumophila* sont ajoutées sur le frottis. Après 30 minutes d'incubation à 35°C, les frottis sont examinés au microscope à fluorescence (525 nm). *L. pneumophila* apparaît comme un bâtonnet fluorescent de couleur verte.

Le sérotype des souches de *L. pneumophila* est déterminé au LSPQ avec les réactifs « *Legionella antisera* » (Denka Seiken). Les sérotypes recherchés sont ceux les plus fréquemment rencontrés au

Québec : 1, 4, 5 et 6 (12a). Le test consiste à mettre en présence les antisérums polyclonaux spécifiques aux 4 sérogroupes avec une préparation bactérienne. Une réaction positive s'observe par une agglutination visible à l'œil nu. Une réaction négative indique que la souche est de séro groupe autre que 1, 4, 5 ou 6. Dans ce cas, la souche est envoyée au Laboratoire de lutte contre la maladie (LLCM) à Winnipeg pour une analyse complémentaire visant à déterminer le séro groupe.

2.5 Jumelage entre les souches cliniques et environnementales

Lorsqu'une ou des souches de *Legionella* sont retrouvées dans l'environnement domestique d'un patient, l'espèce et le séro groupe sont comparés à la souche clinique. Dans le cas d'une combinaison parfaite entre les souches cliniques et environnementales, les souches sont comparées par endonucléase de restriction (REA) ou par électrophorèse à champ pulsé (PFGE).

2.6 Comparaison du profil génétique

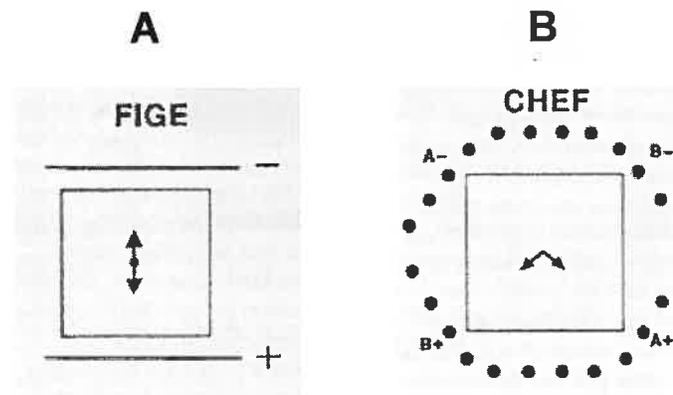
Afin de confirmer le lien épidémiologique entre les souches cliniques et environnementales, le profil génétique est comparé par PFGE ou par REA.

2.6.1 Électrophorèse à champ pulsé (PFGE)

Le PFGE permet la séparation de très longs fragments d'ADN (>1000 kb) comparativement à une électrophorèse conventionnelle. Les deux techniques se distinguent particulièrement par le changement de direction du courant électrique dans la matrice de migration du PFGE. Le facteur déterminant de cette technique est les impulsions électriques

données par les multiples électrodes de l'appareil (36). La direction de la charge positive change continuellement durant la migration et les fragments sont forcés de suivre ces changements à travers la matrice d'agarose dans laquelle ils circulent (figure 9). Cette propriété permet d'obtenir une résolution de 10 à 100 fois supérieure que celle possible avec une électrophorèse en gel d'agarose conventionnelle (26).

La durée des impulsions est choisie en fonction de la longueur des fragments à séparer et les longues pulsations permettent la réorientation des plus grosses molécules.



Source : référence 71

Figure 9. Direction du champ électrique de l'électrophorèse conventionnelle (A) et de l'électrophorèse à champ pulsé (B)

Le PFGE demande plusieurs étapes de préparation des échantillons avant de procéder à la migration. L'ADN des échantillons à tester est extrait par lyse cellulaire et moulé dans l'agarose afin d'en préserver l'intégrité. Les fragments sont ensuite générés à l'aide d'une enzyme de restriction qui possède peu de cible dans l'ADN afin d'obtenir des

fragments de grande taille. Les fragments obtenus par digestion sont insérés dans un gel d'agarose et soumis aux impulsions électriques.

Les souches cliniques et environnementales sont cultivées sur BCYE dans les mêmes conditions que décrites précédemment. À partir d'une suspension bactérienne, l'ADN est extrait et purifié avec les réactifs fournis par le GenePath® Group 2 Reagent Kit (*BioRad*, Canada). L'endonucléase de restriction utilisée pour la bactérie *Legionella* est *Sfi* I (*New England Biolabs*, USA) qui reconnaît la séquence suivante :



Le programme utilisé pour la migration des fragments d'ADN de *Legionella* est StA #5 de l'appareil GenePath (*BioRad*, Canada). La durée des impulsions de ce programme est de 5,3 secondes au début de la migration, suit une augmentation linéaire et se termine après 20 heures avec 34,9 sec.

Le gel de migration est coloré avec du bromure d'éthidium, un agent intercalant. Le gel est exposé aux rayons ultraviolets et une photo est prise par un appareil Polaroid. L'analyse des profils obtenus par PFGE repose sur la similitude des bandes entre les souches. Des clones auront exactement le même ADN, donc génèreront le même profil. Lorsque des mutations, tels des délétions ou des insertions, surviennent dans l'ADN, les fragments n'ont plus la même taille. Conséquemment, la vitesse de migration sera modifiée. Il en résulte une ou des bandes de positions différentes (55,56).

Les profils obtenus pour les échantillons sont interprétés selon les critères décrits au tableau II (56).

Tableau II

Critères d'interprétation des profils génétiques obtenus par PFGE

Lien épidémiologique	Profil des bandes
Identiques	Les bandes sont les mêmes
Étroitement reliées	Diffèrent par un événement génétique, 1 à 3 bandes de différence ²
Possiblement reliées	Diffèrent par deux événements génétiques, 4 à 5 bandes de différence
Différentes	Diffèrent par plus de trois événements génétiques, ≥6 bandes de différence

2.6.2 Analyse de l'ADN par endonucléase de restriction (REA)

Cette technique exploite les différences dans le génome d'individus d'une même espèce et ces différences portent parfois sur les sites de restriction. L'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse conventionnelle en gel d'agarose. Des clones auront un profil identique tandis que la présence/absence d'un site de restriction provoque des polymorphismes dans la longueur des fragments.

Cette technique a été employée lors de la première phase de l'étude et l'enzyme de restriction utilisée pour *Legionella* est *Sfi* I.

² Une bande de différence désigne la présence ou l'absence d'une seule bande dans l'échantillon en comparaison à l'échantillon de référence.

Chapitre 3 - Résultats

3.1 Les cas de légionellose

La surveillance des cas de la maladie du Légionnaire s'est étalée sur une période de 58 mois divisée en deux phases. Dans la première phase, qui s'est déroulée de juillet 1997 à décembre 1999, 3 patients ont été admis dans l'étude. Ces cas ont été repérés lors d'une étude de surveillance active des pneumonies contractées dans la communauté admises à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Une recherche de la bactérie *Legionella* sp. a été effectuée dans les sécrétions respiratoires des 2614 patients admis à l'hôpital lors de cette période (29).

17 cas de légionellose sont survenus pendant la deuxième phase de surveillance, de juillet 2002 à octobre 2004. Cette période d'étude correspond à la méthode décrite en page 19. Un patient a refusé de participer à l'étude et deux autres ne respectaient pas certains critères d'inclusion de l'étude : un cas n'était pas documenté par une culture et l'autre n'était pas propriétaire du chauffe-eau de son domicile.

Au total, 17 patients atteints de la maladie du Légionnaire ont participé à l'étude. Tous ces patients ont été hospitalisés en raison de la sévérité de leur pneumonie.

3.2 Caractéristiques démographiques

Les tableaux III à V présentent les différentes caractéristiques démographiques des patients admis dans l'étude.

3.2.1 Distribution géographique des cas

Les cas de légionellose admis dans l'étude sont survenus dans 9 régions différentes du Québec; 65% des cas ont été déclarés en milieu urbain, pour la plupart à Montréal, tandis qu'une minorité (35%) a eu lieu en zone rurale (tableau III).

Tableau III

Distribution géographique des cas de légionellose

Patient #	Ville	Région administrative*
1	Montréal	06 - Montréal
2	Montréal	06 - Montréal
3	Montréal	06 - Montréal
4	Montréal	06 - Montréal
5	Chambly	16 - Montérégie
6	Saint-Antoine	15 - Laurentides
7	Sherbrooke	05 - Estrie
8	Montréal	06 - Montréal
9	Montréal	06 - Montréal
10	Saint-Norbert	14 - Lanaudière
11	Laval	13 - Laval
12	Montréal	06 - Montréal
13	Jonquière	02 - Saguenay
14	Québec	03 - Québec
15	Kamouraska	01 - Bas Saint-Laurent
16	Québec	03 - Québec
17	Montréal	06 - Montréal

* voir carte des régions administratives du Québec en annexe B

3.2.2 Âge et sexe

Le tableau IV montre deux caractéristiques importantes dans l'épidémiologie de la maladie du Légionnaire; l'âge et le sexe des patients. L'âge moyen des patients (n=17) est de 62 ans avec un minimum de 48 ans et un maximum de 83 ans (étendue 35 ans).

13 patients sur 17 sont des hommes et la moyenne d'âge des hommes atteints est de 60 ans tandis que la moyenne d'âge des 4 femmes atteintes est de 68 ans.

41% des patients se situent dans le groupe d'âge de 40 à 60 ans et 59% sont plus âgés que 61 ans.

Tableau IV
Âge et sexe des patients admis dans l'étude

Patient #	Âge	Sexe
1	49	Homme
2	62	Homme
3	65	Homme
4	52	Homme
5	48	Homme
6	54	Homme
7	58	Homme
8	55	Homme
9	65	Femme
10	72	Femme
11	73	Homme
12	83	Homme
13	61	Femme
14	76	Homme
15	62	Homme
16	72	Femme
17	48	Homme

3.2.3 Facteurs de risque

Le tableau V montre l'état de santé général des patients admis dans l'étude. Tous les patients possèdent des facteurs de risque prédisposant à l'acquisition de la maladie du Légionnaire. Six patients n'avaient aucune maladie sous-jacente, mais avaient des facteurs de risque: trois sont des personnes âgées, deux sont fumeurs et un est fumeur et alcoolique. Tous les autres patients étaient atteints de maladies débilitantes.

8 patients (47%) sont décédés des conséquences de leur maladie. La moyenne d'âge des patients décédés est de 65 ans, tandis que la moyenne d'âge des survivants est de 60 ans.

Tableau V
Facteurs de risque retrouvés chez les patients admis dans l'étude

Patient #	Facteurs de risque et conditions sous-jacentes	Décès
1	Myélome	Non
2	Alcoolisme et tabagisme	Non
3	Grefe rénale	Non
4	Cancer	Oui
5	Tabagisme	Non
6	Diabète	Oui
7	Cancer	Non
8	Diabète	Oui
9	Maladie de Crohn	Oui
10	Âge	Non
11	Âge	Oui
12	Âge	Oui
13	Cancer	Oui
14	Insuffisance rénale	Oui
15	Cancer	Non
16	MPOC et cardiaque	Non
17	Tabagisme	Non

3.2.4 Statut socio-économique

Selon les données recueillies dans le questionnaire épidémiologique, le statut social et économique est très variable d'un patient à l'autre.

3.2.5 Chauffe-eau domestiques

93% des chauffe-eau de l'étude sont électriques. La température moyenne de l'eau récoltée dans la partie basse de ces systèmes est de 36°C tandis que la température en périphérie atteint en moyenne 55°C.

Un seul chauffe-eau n'était pas électrique, mais à l'huile, et l'eau récoltée en périphérie était à 79°C.

3.3 Recherche de *Legionella* dans l'eau résidentielle

3.3.1 Souches cliniques

Tous les patients de l'étude ont eu une culture des sécrétions respiratoires démontrant la présence d'une espèce de *Legionella*. Les souches retrouvées chez les patients sont présentées au tableau VI.

L. pneumophila est l'espèce la plus retrouvée chez les patients, soit dans 82% (14/17) des cas. Le sérotype 1 est identifié chez 10 patients et représente 70% des *L. pneumophila*. Les sérotypes 3, 4, 5 et 8 ont également été retrouvés. 3 patients ont été atteints par des *Legionella* non-*pneumophila* : *L. cinclinatiensis*, *L. micdadei* et *L. longbeachae*.

Des huit décès survenus, 6 ont impliqué *L. pneumophila* 1, ce qui correspond à 75% des cas.

3.3.2 Souches environnementales

L'eau du domicile de tous les patients a été récoltée dans un délai maximum de 45 jours après le début de l'hospitalisation.

Au total, 126 échantillons ont été récoltés. Suite aux analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons d'eau, la bactérie *Legionella* sp. a été retrouvée dans 6 domiciles (35%).

Dans 2 cas, la bactérie n'a pas été détectée en périphérie, mais était présente dans le chauffe-eau (tableau VI). Dans aucun cas la bactérie a été retrouvée dans la périphérie et non dans le chauffe-eau.

3.3.3 Comparaison des souches cliniques et environnementales

Une combinaison parfaite entre l'espèce et le sérotype a été faite dans le cas de 2 patients (12%).

Les patients #2 et #11 ont été infectés par *L. pneumophila* sérotype 1 et les souches retrouvées (tableau VI) dans leur environnement domestique sont de même espèce et de même sérotype.

Tableau VI

Comparaison des souches cliniques et environnementales

Patient #	Souche clinique	Souche chauffe-eau	Souche douche	Souche bain	Souche évier s. bain	Souche évier cuisine
1	<i>L. pneumophila</i> 8	L.p. n/t	n/d	n/a	n/a	n/d
2	<i>L. pneumophila</i> 1	L.p. 1	L.p. 1	n/a	n/a	L.p. 1
3	<i>L. pneumophila</i> 5	n/a	n/d	n/a	n/a	n/d
4	<i>L. pneumophila</i> 1	n/a	n/d	n/a	n/d	n/d
5	<i>L. pneumophila</i> 1	n/d	n/d	n/a	n/d	n/d
6	<i>L. cincinnatiensis</i>	L.p. 8	n/a	L.p. 8	n/d	L.p. 8
7	<i>L. micdadei</i>	n/d	n/a	n/d	n/d	n/d
8	<i>L. pneumophila</i> 1	n/d	n/d	n/a	n/d	n/d
9	<i>L. pneumophila</i> 1	L.p. 2	n/a	L.p. 2	n/d	L.p. 2
10	<i>L. longbeachae</i>	n/d	n/d	n/a	n/d	n/d
11	<i>L. pneumophila</i> 1	L.p. 1	L.p. 1	n/a	n/d	L.p. 1
12	<i>L. pneumophila</i> 1	n/d	n/d	n/a	n/d	n/d
13	<i>L. pneumophila</i> 1	n/d	n/d	n/a	n/d	n/d
14	<i>L. pneumophila</i> 4	n/d	n/a	n/d	n/d	n/d
15	<i>L. pneumophila</i> 3	n/d	n/a	n/d	n/d	n/d
16	<i>L. pneumophila</i> 1	n/d	n/a	n/d	n/d	n/d
17	<i>L. pneumophila</i> 1	L.p. 4	n/d	n/a	n/d	n/d

n/d = non détectée

n/a = non applicable

n/t = non typable

3.3.4 Comparaison des profils génétiques

Les profils génétiques des souches clinique et environnementales du patient #2 ont été comparés par REA (30).

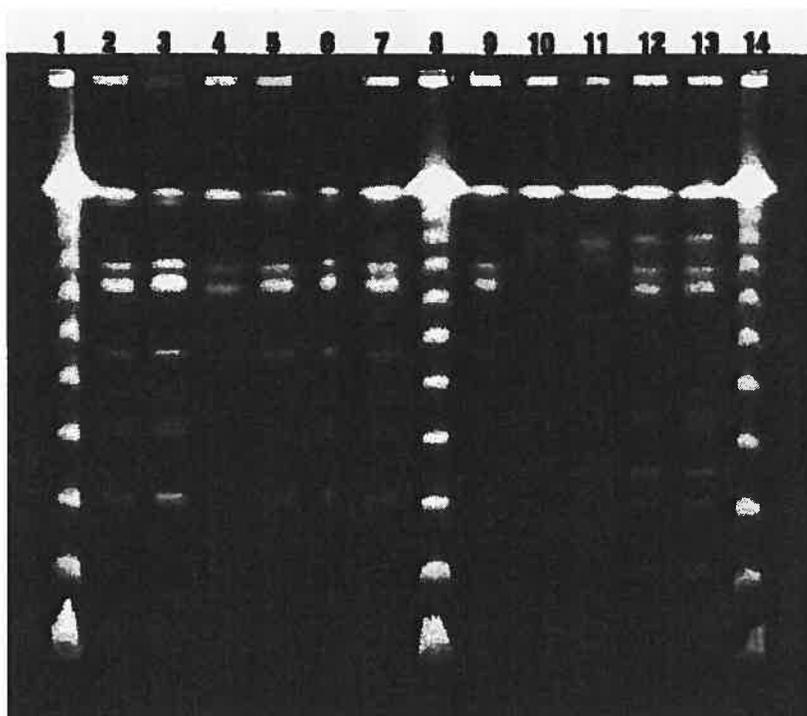


Figure 10. REA des souches clinique et environnementales du patient #2

Ligne 1, 8 et 14 : marqueurs de poids moléculaires; Ligne 2 : souche clinique LP-1; Ligne 3 : chauffe-eau domestique; Ligne 4 : robinet de cuisine; Ligne 5 : robinet salle de bain; Ligne 6 et 7: tête de douche; Ligne 9 : chauffe-eau (1 mois plus tard); Ligne 10 à 13 : souches contrôles LP-1

Toutes les souches de *L. pneumophila* 1 retrouvées dans l'environnement domestique du patient #2 (ligne 3 à 7, 9) ont un profil identique à la souche clinique (ligne 2).

Les profils génétiques des souches clinique et environnementales du patient #11 ont été comparés par PFGE.

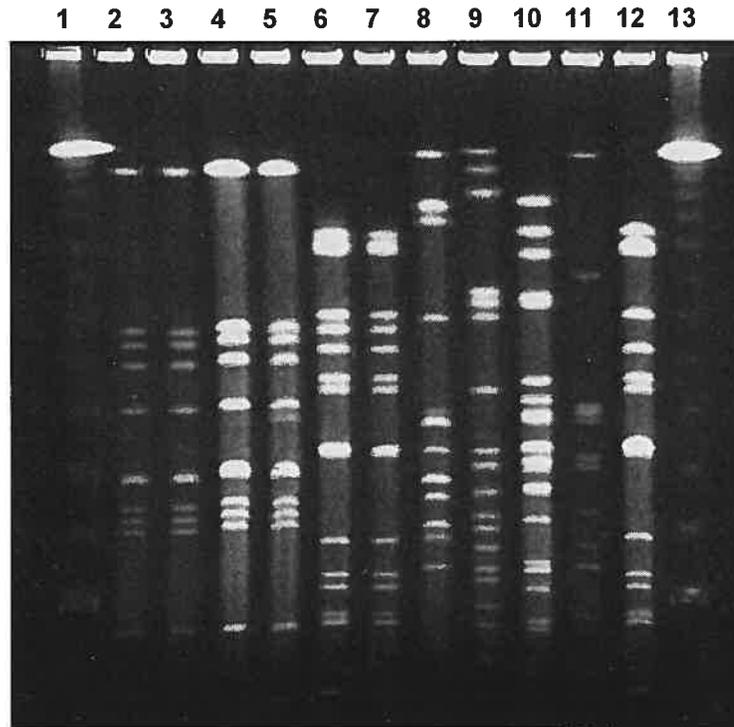


Figure 11. PFGE des souches clinique et environnementales du patient #11

Ligne 1 et 13 : marqueurs de poids moléculaires; Ligne 2 : souche clinique LP-1; Ligne 3 et 4: tête de douche; ligne 5 : chauffe-eau domestique; ligne 6 et 7 : robinet de cuisine; ligne 8 à 12 : souches contrôle LP.

Les souches de *L. pneumophila* 1 retrouvées dans le chauffe-eau et la tête de douche du domicile du patient #11 (ligne 3 à 5) ont un profil identique à la souche clinique (ligne 2). Cependant, les souches retrouvées dans la cuisine sont différentes de la souche clinique.

Chapitre 4 – Discussion

4.1 L'étude

Cette étude fut réalisée afin de mieux cerner les risques réels qu'engendre, pour la santé humaine, la présence de la bactérie *Legionella* dans l'environnement domestique.

Le problème majeur que présente ce genre d'étude réside dans la difficulté de retracer les cas de légionellose dans la population. En plus d'être une maladie difficile à diagnostiquer, le système actuellement en place au Québec est passif. D'autre part, la nécessité pour l'étude d'avoir des cas avec culture positive réduit considérablement le nombre de patients. En effet, la recherche de la bactérie *Legionella* n'est pas faite systématiquement sur les expectorations, mais plutôt dans les sécrétions bronchiques obtenues par bronchoscopie. Cette procédure n'est réservée qu'aux patients dont les symptômes de la maladie sont sévères. La population sélectionnée par ces limitations représente donc les personnes plus sévèrement atteintes et ne permet pas de repérer les cas de légionellose moins sévère, qui sont probablement plus fréquents dans la population québécoise.

Le protocole choisi pour l'étude permet, dans le cas d'une combinaison parfaite entre l'espèce et le sérotype des souches cliniques et environnementales, une identification certaine de la source de l'infection. Contrairement aux études (21,50) qui ont tenté de faire des liens par comparaison de l'espèce et du sérotype, notre étude permet de confirmer ce lien grâce à l'épidémiologie moléculaire.

Dans le cadre de cette étude, nous avons eu l'opportunité d'utiliser deux techniques différentes pour produire les profils génétiques; le PFGE et le REA. Basées sur un principe similaire, les techniques ne permettent toutefois pas d'obtenir les mêmes résultats. Le pouvoir discriminant du REA est bon, mais celui du PFGE est nettement supérieur. La différence fondamentale entre les deux techniques réside dans la résolution des fragments d'ADN que permet le PFGE. Les fragments obtenus, contrairement au REA, sont distincts et bien nets. Or, le PFGE est plus onéreux et la procédure plus complexe.

La technique d'électrophorèse à champ pulsé utilisée dans l'étude, a récemment été critiquée dans la littérature. En effet, certaines études **(17,28,59)** ont relaté avoir obtenu des profils génétiques identiques pour des souches qui n'avaient aucun lien épidémiologique entre elles. Or, dans le contexte de notre étude, les souches comparées par PFGE ont toujours un lien épidémiologique, ce qui rend la technique appropriée pour l'analyse de nos résultats.

4.2 Analyse des résultats

4.2.1 Cas de légionellose

Grâce au système de communication mis en place, 11 cas de légionellose nous ont été référés en 2002 et 2003. Or, pour la même période de surveillance, le fichier des maladies à déclaration obligatoire rapporte 42 cas de légionellose au Québec **(12)**. Près de 74% des cas ne nous ont pas été signalés.

Ces cas n'ont pas été inclus dans notre étude vu l'absence probable de recherche de *Legionella* sp. par culture. D'autres tests sont en effet disponibles pour le diagnostic de la légionellose. Il existe notamment un test rapide de détection des antigènes spécifiques à *L. pneumophila* séro groupe 1 dans l'urine. De plus, l'analyse de séroconversion dans le sang est aussi un test diagnostique courant.

Nous estimons que les cas admis dans notre étude représentent seulement 2% des cas de légionellose qui seraient survenus au Québec pendant notre période de surveillance. Cette valeur correspond aux estimations du centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) sur le nombre de cas de la maladie correctement diagnostiqué.

4.2.2 Caractéristiques démographiques

Tous les cas qui ont été admis dans l'étude sont survenus lors des périodes estivales et automnales. Ce caractère saisonnier a déjà été constaté au sujet d'éclotions en lien avec les tours de refroidissement (7a). Cette tendance peut s'expliquer par une plus grande utilisation de la climatisation pendant ces périodes, surtout dans les grandes villes comme Montréal où la température est plus élevée et où les tours de refroidissement sont plus présentes qu'en zone rurale. Cette hypothèse pourrait expliquer l'incidence plus élevée de la maladie en été, mais il est difficile d'établir l'implication de la contamination domestique dans cette réalité. En fait, il est fort plausible que la contamination domestique ne soit pas de type saisonnière.

Comme la littérature le décrit, les hommes sont davantage atteints par la maladie du Légionnaire que les femmes. Notre cohorte est en effet

composée de 77% d'hommes. De plus, tous les patients sont d'âge moyen ou avancé.

La maladie du Légionnaire est connue pour affecter principalement les personnes qui ont des facteurs de risque ou un système immunitaire déficient. Tous les patients enrôlés dans l'étude, présentaient une condition médicale propice au développement de la maladie. Cependant, il n'est pas exclu que les personnes sans déficit immunitaire soient atteintes de la maladie sous une forme moins sévère qui ne requiert ni hospitalisation ni visite médicale. Dans ce contexte, il est pratiquement impossible d'étudier cette population et d'évaluer les risques d'une contamination domestique sur eux.

Le nombre de décès des patients dans l'étude est très élevé et avoisine les 50%. Habituellement, cette maladie cause 12% de décès (31), mais pour une population sévèrement atteinte, le nombre de décès peut être plus élevé. Il n'est donc pas étonnant de constater autant de décès chez nos patients vu les restrictions de recrutement de l'étude qui favorisent la sélection des cas les plus sévères.

4.2.3 Chauffe-eau domestiques

Quatre-vingt-dix pourcent (90%) des chauffe-eau domestiques au Québec sont électriques (11), il est donc tout naturel qu'ils représentent 93% de l'étude.

Nous avons pu vérifier que l'eau dans la partie basse des réservoirs électriques est effectivement plus froide que la température ajustée au thermostat des appareils. Tous les thermostats des chauffe-eau étaient

ajustés à 60°C et la température moyenne de l'eau chaude mesurée aux robinets était de 55°C. Une perte de chaleur peut être occasionnée lors du transport de l'eau (3 ou 4 degrés Celsius). De plus, les thermostats installés sur les chauffe-eau électriques peuvent souffrir d'une légère imprécision (11).

En moyenne, la température des échantillons récoltés à la base des chauffe-eau était seulement de 36°C, une température qui favorise le développement et l'implantation des bactéries. L'eau à la base des chauffe-eau électriques ne semble jamais atteindre la valeur de 60°C. En effet, la température la plus élevée obtenue dans ces échantillons est de 54°C, ce qui est encore insuffisant pour détruire la bactérie.

Pour sa part, le chauffe-eau alimenté à l'huile ne présente pas ce problème de température. À 79°C, les échantillons d'eau du chauffe-eau et de la périphérie étaient pratiquement exempts de bactéries. Ce type de chauffe-eau est d'ailleurs connu pour être beaucoup moins propice à la colonisation bactérienne, malgré qu'elle soit possible. Les résultats obtenus sont donc ceux attendus (2,4,32) et confirment que ces systèmes sont peu impliqués dans le problème de contamination des milieux domestiques par *Legionella*.

4.2.4 Étiologie bactérienne

L'espèce la plus retrouvée chez les patients de l'étude, *L. pneumophila* (82%), est celle attendue selon la littérature (18,27,64). Le sérotype 1 (71%) est la souche la plus retrouvée chez les patients. Or, ce sérotype ne représente que 10% des souches de l'environnement selon l'étude d'Alary *et coll.* (1991). Une étude française (16) a

également obtenu des résultats similaires lorsqu'elle a comparé une banque de souches cliniques et environnementales. La fréquence d'isolement de *L. pneumophila* 1 n'est pas reliée à une prédominance environnementale. Les auteurs concluent à la virulence du sérotype pour expliquer cette réalité. Les autres espèces de *Legionella* sont considérées comme étant plus rares, mais elles représentent le quart de notre cohorte (16,66).

4.2.5 Contamination domestique

Tel que rapporté dans la littérature (2,23,32,43), 35% des domiciles étudiés sont colonisés par la bactérie *Legionella*. Une étude menée dans notre laboratoire (29) fait état d'une association de la contamination avec la capacité du chauffe-eau et son âge (facteurs indépendants). Une contamination plus importante des chauffe-eau de faible volume (40 vs 60 gallons) et des chauffe-eau de plus de 11 ans (2,30) était donc attendue. Soixante-quinze pourcent (75%) des chauffe-eau contaminés de notre étude avaient une capacité de 40 gallons. La puissance des éléments de ces systèmes est généralement de 3 kW tandis que les éléments retrouvés dans les chauffe-eau de 60 gallons sont de 3.8 à 4.5 kW (2). Les sédiments qui s'accumulent à la base des réservoirs sont donc moins chauffés dans les chauffe-eau de petit volume ce qui favorise la croissance de *Legionella*.

La relation entre l'âge du chauffe-eau et la contamination n'a pu être observée durant notre étude. En effet, 60% des chauffe-eau contaminés dans notre étude avaient moins de 5 ans d'existence. Les chauffe-eau plus récents sont donc aussi propices à la colonisation microbienne. D'autres facteurs peuvent aussi intervenir dans la colonisation

domestique comme l'âge de la plomberie domestique et du système de distribution d'eau du quartier.

4.2.6 Liens épidémiologiques

Nous avons confirmé un lien épidémiologique entre la contamination de l'environnement domestique et l'infection chez deux patients. Selon nos données, 12% des cas de légionellose contractée dans la communauté sont causés par une contamination domestique. Considérant nos estimations précédentes, des 500 cas de légionellose contractée dans la communauté, au moins 50 sont attribuables à la présence de la bactérie *Legionella* dans l'environnement domestique. Ce résultat peut probablement être réajusté à la hausse. En effet, les cultures négatives des échantillons d'eau ne signifient pas nécessairement l'absence de la bactérie. En fait, il est possible que nous ayons obtenu une certaine proportion de faux-négatifs avec la méthode de détection par culture. Suite à nos enquêtes épidémiologiques, nous pouvons affirmer que certains patients passaient la quasi-totalité de leur temps dans leur domicile, notamment les patients # 4, 10, 14, 15 et 16. Selon le questionnaire, la seule possibilité pour ces patients de s'être infectés était d'avoir un contact étroit avec leur environnement domestique contaminé. Pourtant, nous n'avons pas établi de lien épidémiologique pour ces patients car les cultures sur les échantillons de l'environnement sont demeurées négatives.

Plusieurs situations peuvent générer des faux-négatifs. La durée de la colonisation des systèmes par la bactérie est très variable (11), donc le délai d'échantillonnage est un facteur déterminant dans la recherche de la bactérie. Notre temps d'intervention moyen était de 37 jours (entre 23 et 45 jours). Dans certains cas, ce délai a été sûrement trop long. En

plus, *Legionella* est difficile à cultiver et la présence d'autres bactéries peut nuire à sa croissance en culture en établissant une compétition.

D'autre part, il est très intéressant de remarquer, chez le patient #11, la présence de souches différentes dans le même environnement (figure 11). Il est effectivement connu que plus d'une espèce, plus d'un sérotype, et maintenant, plus d'une souche peuvent être présents dans le même environnement (2). Cette particularité laisse envisager que pour les cas chez qui nous avons détecté la bactérie sans pouvoir établir un lien, il y a possibilité que l'espèce ou le sérotype recherché était effectivement présent avant ou au moment où les analyses microbiologiques ont été effectuées. De là, l'importance d'isoler plusieurs colonies présumées suite à la culture des échantillons. Il est plausible que notre méthodologie de culture comporte des limites intrinsèques à la mise en évidence de *Legionella* dans l'environnement. Un protocole de détection moléculaire serait sans doute plus sensible, mais l'importance d'avoir une souche cultivable pour les analyses d'épidémiologie moléculaire nous oblige à utiliser la culture comme moyen de détection.

Chapitre 5 – Conclusions

Les systèmes d'eau résidentiels sont considérés comme une source potentielle de cas sporadiques de légionellose contractée dans la communauté.

Considérant l'ampleur de la colonisation des chauffe-eau électriques (32%) et la quantité impressionnante de ce type de chauffe-eau au Québec, le risque pour la santé publique doit être considéré avec attention. En fait, près de 30% des foyers québécois sont contaminés par la bactérie *Legionella*. Vu le vieillissement de la population, le nombre de cas sévères de pneumonie à *Legionella* requérant une hospitalisation risque d'augmenter considérablement dans les prochaines années.

Récemment, une proposition qui vise à réduire le risque de brûlure associé à l'eau chaude a été discutée dans le cadre de la réforme du Code nationale du bâtiment et du Code national de la plomberie (31). Cette mesure consiste à réduire la température à 49°C dans les chauffe-eau. Ceci aurait comme effet d'amplifier le risque de légionellose en favorisant la croissance de la bactérie dans les réservoirs. Un rapport émis par l'Institut national de santé publique propose plutôt de réduire les risques de brûlures par l'eau chaude du robinet tout en évitant d'amplifier le taux de contamination des chauffe-eau par la bactérie (31).

La menace de prolifération de la bactérie *L. pneumophila* dans les chauffe-eau électriques est principalement due à la structure même du système (1,2). La solution pour en réduire la présence réside donc dans la modification de la conception actuelle des chauffe-eau. Cependant,

cette solution n'intervient pas sur le problème des brûlures par l'eau chaude.

Une solution a déjà été proposée **(33)** : installer une valve de mélange (mélange de l'eau chaude avec l'eau froide) à la sortie des chauffe-eau de façon à réduire la température de l'eau en périphérie à 49°C. La solution résout en effet le problème des brûlures, mais qu'en est-il de la problématique qui nous concerne? La valve de mélange, contrairement à la première idée proposée (baisse de la température des chauffe-eau), évite une augmentation du taux de colonisation des *Legionella* dans les chauffe-eau. Cependant, située à cet endroit, la valve abaisse la température dans tout le système de tuyauterie et y favorise la colonisation par *Legionella*. Pour éviter ce problème, la valve de mélange doit être installée aux robinets. De cette façon, la température de l'eau chaude dans le chauffe-eau et dans le système de distribution sera de 60°C.

Finalement, la solution au problème de colonisation des chauffe-eau électriques par la bactérie *Legionella* réside probablement dans la modification de la conception et de la fabrication des chauffe-eau actuels de façon à permettre une température uniforme et adéquate dans tout le réservoir.

Chapitre 6 - Références

1. Alary M., Joly J.R. Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionellae*. *Journal of Infectious Diseases*. 1992. 165 : 565-569.
2. Alary M., Joly J.R. Risk factors for contamination of domestic hot water systems by *Legionellae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991. 57(8): 2360-2367.
3. Arnow P.M., Chou T., Weil D., Shapiro E.N., Kretzschmar C. Nosocomial legionnaires' disease caused by aerosolized tap water from respiratory devices. *Journal of Infectious Diseases*. 1982. 146(4) : 460-467.
4. Arnow P.M., Weil D., Para M.F. Prevalence and significance of *Legionella pneumophila* contamination of residential hot-tap water systems. *Journal of Infectious Diseases*. 1985. 152(1): 145-151.
5. Aubertin J., Dabis F., Fleurette J., Bornstein N., Salamon R., Brottier E., Brune J., Vincent P., Miguères J., Jover A. Prevalence of legionellosis among adults: a study of community-acquired pneumonia in France. *Infection*. 1987. 15(5) : 328-331.
6. Bassetti S., Widmer F. *Legionella* resources on the world wide web. *Clinical Infectious Diseases*. 2002. 34: 1633-1640.

7. Benin A.L., Benson R.F., Arnold K.E., Fiore A.E., Cook P.G., Williams L.K., Fields B., Besser R.E. An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 2002. 185(2): 237-243.
- 7a. Bentham R.H., Broadbent C.R. A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. *Epidemiology and Infection*. 1993. 111(2): 287-295.
8. Bernander S., Jacobson K., Lundholm M. A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 4 and 10 with a common genetic finger printing pattern. *APMIS*. 2004. 112(3): 210-217.
9. Borella P., Montagna M.T., Romano-Spica V., Stampi S., Stancanelli G., Triassi M., Neglia R., Marchesi I., Fantuzzi G., Tatò D., Napoli C., Quaranta G., Laurenti P., Leoni E., De Luca G., Ossi C., Moro M., D'Alcalà G.R. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerging Infectious Diseases*. 2004. 10(3): 457-464.
10. Brown M.R.W., Barker J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends in Microbiology*. 1999. 7(1): 46-50.
11. Communication personnelle, Michel Plante, Hydro-Québec

12. Communication personnelle de l'Agence de Santé publique du Canada.
- 12a. Communication personnelle du Laboratoire de santé publique du Québec.
13. Costerton J.W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*. 1994. 176(8): 2137-2142.
14. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science*. 1999. 284 : 1318-1322.
15. Dennis P.J., Taylor J.A., Fitzgeorge R.B., Bartlett C.L.R., Barrow G.I. *Legionella pneumophila* in water plumbing systems. *Lancet*. 1982. 949-951.
16. Doleans A., Aurell H., Reyrolle M., Lina G., Freney J., Vandenesch F., Etienne J., Jarraud S. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42(1) : 458-460.
17. Drenning S.D., Stout J.E., Joly J.R., Yu V.L. Unexpected similarity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of unrelated clinical isolates of *Legionella pneumophila*, serogroup 1. *Journal of Infectious Diseases*. 2001. 183 : 628-632.

18. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. *Legionella* and Legionnaires' Disease : 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. 15(3): 506-526.
19. Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L., Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1981. 41(1) : 9-16.
20. Fraser D.W., Tsai T.R., Orenstein W., Parkin W.E., Beecham H.J., Sharrar R.G., Harris J., Mallison G.F., Martin S.M., McDade J.E., Shepard C.C., Brachman P.S. Legionnaires' disease. *New England Journal of Medicine*. 1977. 297(22): 1189-1197.
21. Garbe P.L., Davis B.J., Weisfeld J.S., Markowitz L., Miner P., Garrity F., Barbaree J.M., Reingold A.L. Nosocomial Legionnaires' disease. Epidemiologic demonstration of cooling towers as a source. *JAMA*. 1985. 254(4): 521-524.
22. Jarraud S., Reyrolle M., Riffard S., Lo Presti F., Etienne J. Legionnaires' disease in travellers. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 1998. 91(5 Pt 1-2): 486- 489.
23. Joly J.R., Dewailly E., Bernard L., Ramsay D., Brisson J. *Legionella* and domestic water heaters in the Quebec city. *Canadian Medical Association Journal*. 1985. 132: 160.
24. Joseph C., Morgan D., Birtles R., Pelaz C., Martin-Bourgon C., Black M., Garcia-Sanchez I., Griffin M., Bornstein N., Bartlett C. An international investigation of an outbreak of Legionnaires' disease

- among UK and French tourists. *European Journal of Epidemiology*. 1996. 12(3) : 215-219.
25. Joseph C.A. Legionnaires' disease in Europe 2000-2002. *Epidemiology and Infection*. 2004. 132: 417-424.
26. Kaufmann M.E., Pitt T.L. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: *Methods in practical laboratory bacteriology*. 1994. CRC Press. 83-92.
27. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. *Legionella*. In: *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. Lippincott. 1997: 368-369.
28. Kool J.L., Buchholz U., Peterson C., Brown E.W., Benson R.F., Pruckler J.M., Fields B.S., Sturgeon J., Lehnkering E., Cordova R., Mascola L.M., Butler J.C. Strengths and limitations of molecular subtyping in a community outbreak of Legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection*. 2000. 125 : 599-608.
29. Laverdière M., Joly J.R., Habel F., Bernier F., Riendeau G.A., DeCarolis E. Sporadic community-acquired Legionnaires' disease and contaminated domestic hot water supplies. Chapter 74. 360- 363. In : *Legionella*. 2002. ASM Press.
30. Laverdière M., Joly J.R., Habel F., Bernier F., Riendeau G.A., DeCarolis E. A sporadic community-acquired Legionnaires disease linked to a domestic hot water supply : report of a documented case. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2001. 10(5).

31. Lavoie M., Lévesque B., Sergerie D. Prévention des cas de brûlures et de légionellose associés à l'eau chaude du robinet dans les résidences privées. Institut national de santé publique du Québec. 2003. 50 pages.
32. Lee T.C., Stout J.E., Yu V.L. Factors predisposing to *Legionella pneumophila* colonization in residential water systems. Archives of Environmental Health. 1988. 43(1): 59-61.
33. Lévesque B., Lavoie M., Joly J.R. Residential water heater temperature: 49 or 60 degrees celsius? Canadian Journal of Infectious Disease. 2004 15(1) : 11.
34. Levy P.Y., Teyssie N., Etienne J., Raoult D. A nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* caused by contaminated transesophageal echocardiography probes. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2003. 24(8) : 619-622.
35. Marston B.J., Lipman H.B., Breiman. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Archives of Internal Medicine. 1994. 154(21): 2417-2422.
36. Martineau B. Systématique bactérienne. Guide d'identification des bactéries aérobies. Décarie Éditeur. 1996 : 147-149.
37. McDade J.E., Brenner D.J., Bozeman M. Legionnaires' Disease bacterium isolated in 1947. Annals of Internal Medicine. 1979. 90 : 659-661.

38. McDade J.E., Shepard C.C, Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A., Dowdle W.R. Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*. 1977. 297(22) : 1197-1203.
39. McNally C., Hackman B., Fields B.S., Plouffe J.F. Potential importance of *Legionella* species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000. 38: 79-82.
40. Murdoch D.R. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clinical Infectious diseases*. 2003. 36: 64-69.
41. Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S., Donlan R.M. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*. 2001. 147 : 3121-3126.
42. Nahapetian K., Challemel O., Beurtin D., Dubrou S., Gounon P., Squinazi F. The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Research in Microbiology*. 1991. 142(6): 677-685.
43. Pedro-Botet M.L., Stout J.E., Yu V.L. Legionnaires' disease contracted from patient homes: the coming of the third plague? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002. 21: 699-705.
44. Perola O., Kauppinen J., Kusnetsov J., Heikkinen J., Jokinen C., Katila M.L. Nosocomial *Legionella pneumophila* serogroup 5 outbreak

associated with persistent colonization of a hospital water system. APMIS. 2002. 110(12) : 863-868.

45. Prevost G., Jaulhac B., Piemont. DNA fingerprinting by Pulsed-Field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 1992. 30(4) : 967-973.
46. Shelton B.G., Kerbel W., Witherell L., Millar J.D. Review of Legionnaires' Disease. American Industrial Hygiene Association (AIHAJ). 2000. 61: 738-742.
47. Stout J.E., Rihs J.D., Yu V.L. *Legionella*. In : Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. Manual of clinical microbiology. 8th ed. ASM Press 2003 : 809-823.
48. Stout J.E., Yu V.L. Legionellosis. New England Journal of Medicine. 1997. 337: 682-687.
49. Stout J.E., Yu V.L., Best M.G. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. Applied and Environmental microbiology. 1985. 49(1): 221-228.
50. Stout J.E., Yu V.L., Muraca P., Joly J.R., Troup N., Tompkins L.S. Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired legionnaires' disease. New England Journal of Medicine. 1992. 326(3): 151-155.

51. Stout J.E., Yu V.L., Yee Y.C., Vaccarello S., Diven W., Lee T.C. *Legionella pneumophila* in residential water supplies : environmental surveillance with clinical assessment for legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection*. 1992. 109 : 46-57.
52. Straus W.L., Plouffe J.F., File T.M., Lipman H.B., Hackman B.H., Salstrom S.J., Benson R.F., Breiman R.F. Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires disease group. *Archives of Internal Medicine*. 1996. 156(15): 1685-1692.
53. Suzuki A., Ichinose M., Matsue T., Amano Y., Terayama T., Izumiyama S. Endo T. Occurrence of *Legionella* bacteria in a variety of environmental waters from April 1996 to November 2000. *Kansenshogaku Zasshi*. 2002. 76(9): 703-710.
54. Tatlock H. A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1944. 57 : 95-99.
55. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1997. 18(6): 426-439.
56. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995. 33(9) : 2233-2239.

57. Thacker S.B., Bennett J.V., Tsai T.F., Fraser D.W., McDade J.E., Shepard C.C., Williams K.H., Stuart W.H., Dull H.B., Eickhoff T.C. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' Disease bacterium. *Journal of Infectious Diseases*. 1978. 138(4) : 512-519.
58. Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Levi Y. Amoebae in domestic systems : resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. 97(5):950-963.
59. Thouverez M., Godard C., Leprat R., Talon D. Is pulsed-field electrophoresis a valuable tool to identify nosocomial cases of *Legionella pneumophila* disease? *Journal of Hospital Infection*. 2003. 55 : 254-259.
60. Tobin J.O., Dunnill M.S., French M., Morris P.J., Beare J., Fisher-Hoch S., Mitchell R.G., Muers M.F. Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet*. 1980. ii : 118-121.
61. Vickers R.M., Yu V.L., Hanna S.S., Muraca P., Diven W., Carmen N., Taylor F.B. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infection Control*. 1987. 8(9) : 357-363.
62. Wingender J., Flemming H.C. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Science and Technology*. 2004. 49(11-12): 277-286.

63. Yao J.D.C. Moellering R.C. Antibacterial agents. In : Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. Manual of clinical microbiology. 8th ed. ASM Press 2003 : 1039-1065.
64. Yu V.L. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In : Mandell G.L. Dolin R., Bennett's J.E. Principles and Practice of infectious diseases. 4th ed. Churchill Livingstone. 1995 : 2087-2097.
65. Yu V.L., Plouffe J.F., Pastoris M.C., Stout J.E., Schousboe M., Widmer A., Summersgill J., File T., Heath C.M., Paterson D.L., Cheresky A. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. Journal of Infectious Diseases. 2002. 186: 127-128.

Sites internet

66. <http://biosciences.insa-lyon.fr/recherche/laboratoires/umg/eqrech2.php>
67. <http://www.hc-sc.gc.ca/francais/vsv/maladies/legionnaire.html>
68. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/legionellosis_g.htm
69. http://www.doctissimo.fr/html/sante/mag_2001/mag0427/sa_3887_legionellose_02.htm
70. http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/c_time_f.html
71. <http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>
72. <http://www.cqpvc.gc.ca/region.htm>
73. <http://www.cchst.ca/reponsesst/diseases/legion.html>

Chapitre 7- Annexes

A : Formulaire de consentement



Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Centre affilié à l'Université de Montréal

Pour vous, pour la vie

Formulaire de consentement éclairé

TITRE DU PROJET: Acquisition de la maladie du Légionnaire suite à une exposition domestique.

Date d'émission du protocole: 16 novembre 2001

Parraineurs: Hydro-Québec
Pfizer Canada

Investigateur: Dr Michel Laverdière, M.D.
Dr Jean Joly

Centres: Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Laboratoire de santé publique du Québec

INTRODUCTION

Vous avez souffert ou souffrez actuellement d'une pneumonie. Cette infection est causée par la bactérie responsable de la maladie du Légionnaire. Cette infection n'est jamais transmise de personne à personne. Vous avez donc acquis cette infection à partir d'un environnement contaminé par cette bactérie. La bactérie responsable de la maladie du Légionnaire vit habituellement dans l'eau. Nous ignorons quelle source d'eau pourrait être responsable de votre infection.

BUT DE L'ÉTUDE

Afin de mieux connaître quelle pourrait être cette source, nous vous proposons, avec l'accord de votre médecin personnel, de participer à un projet de recherche clinique parrainé par Hydro-Québec et Pfizer Canada Inc. Ce projet est conduit conjointement par le Dr Michel Laverdière du Département de microbiologie-infectiologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et le Dr Jean R Joly du Laboratoire de santé publique du Québec. Il vise à déterminer l'origine possible de votre pneumonie.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Si vous acceptez de participer à ce projet, un agent de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont à Montréal, qui s'identifiera à l'aide d'une pièce d'identification avec photo, se rendra à votre domicile à une date et une heure préalablement convenue avec vous. Lors de cette visite nous vous demanderons de répondre à un questionnaire visant à déterminer quelles étaient les sources d'eau

prot. Légionnaire H.Qc form. cons. v. 9/3/2004
jj/mmm/aa

initiales du sujet: _____

Page 1 de 3

Pavillon Maisonneuve
5415, boul. de l'Assomption
Montréal QC H1T 2M4
Téléphone : (514) 252-3400

Pavillon Rosemont
5689, boul. Rosemont
Montréal QC H1T 2H1
Téléphone : (514) 252-3400

Pavillon Rachel-Tourigny
5305, boul. de l'Assomption
Montréal QC H1T 2M4
Téléphone : (514) 252-3400

**Pavillon pédiatrique
Thérèse-de-Yturralde**
6900, 42e Avenue
Montréal QC H1T 2T2
Téléphone : (514) 374-7940

**Centre d'accueil
Judith-Jasmin**
8850, rue Bisailon
Montréal QC H1K 4N2
Téléphone : (514) 354-5990

avec lesquelles vous avez été en contact au cours des deux semaines précédant le début de votre infection (ce questionnaire prend environ une heure à compléter). Une copie de ce questionnaire vous sera remise si vous le désirez. Au cours de cette même visite nous prendrons également des échantillons d'eau afin de voir si l'eau potable de votre maison est contaminée par la bactérie responsable de votre pneumonie. Cette visite à domicile comporte outre un examen de la plomberie de votre maison, la prise d'environ dix échantillons d'eau: trois au robinet de l'évier de la cuisine, trois au niveau de la douche, trois au niveau de l'évier de la salle de bain que vous utilisez le plus fréquemment et finalement un au niveau du robinet de vidange du chauffe-eau. Si vous possédez un humidificateur, bain tourbillon ou spa, nous y ferons aussi des prélèvements d'eau.

Par ailleurs, la bactérie isolée dans l'échantillon de crachat que vous avez soumis au moment de votre hospitalisation servira également à certaines analyses moléculaires en laboratoire qui permettront d'établir s'il y a une relation entre la bactérie de votre pneumonie et celles que nous avons retrouvées dans votre domicile. Quant à vous, vous n'aurez pas à subir des tests supplémentaires en raison de votre participation à cette étude que ce soit durant l'hospitalisation ou après celle-ci.

RISQUES ET DÉSAGRÈMENTS

Il n'y a aucun risque pour vous à participer à cette étude. Le seul inconvénient est de recevoir l'agent de recherche chez vous, à un moment qui vous conviendra, de répondre à un questionnaire et de nous permettre de prélever les échantillons d'eau.

AVANTAGES

En participant à cette étude, vous nous aiderez à mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie du Légionnaire et contribuerez indirectement pour le futur à la prévention de cette maladie.

NATURE DE LA PARTICIPATION

Comme dans tout projet de recherche, vous êtes libre d'accepter ou de refuser d'y participer ou de vous retirer à n'importe quel moment sans que ceci porte préjudice à la qualité des soins que vous êtes en droit de recevoir.

DÉCLARATION D'UNE RÉMUNÉRATION DU CHERCHEUR

Le médecin chercheur qui collabore au recrutement des sujets pressentis recevra un montant couvrant le temps consacré au projet, les dépenses de bureau et du personnel engendrées par le projet. Ces montants peuvent être versés au médecin-chercheur ou à la clinique médicale à laquelle il est rattaché. Le montant est établi en fonction de la nature du travail exigé et du taux horaire professionnel en vigueur.

CONFIDENTIALITÉ

Toutes les données recueillies seront traitées de façon confidentielle. Seuls les représentants du Laboratoire de santé publique du Québec, de Pfizer Canada, d'Hydro-Québec et du Comité d'éthique de la recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont seront autorisés à consulter les données recueillies au cours de l'étude. Vous conservez tous vos droits en signant ce formulaire de consentement. Les documents de cette étude seront conservés au département de microbiologie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont pour une période de 15 ans. Vous pourrez avoir accès sur demande à l'ensemble des résultats de cette recherche une fois l'étude terminée.

QUESTIONS

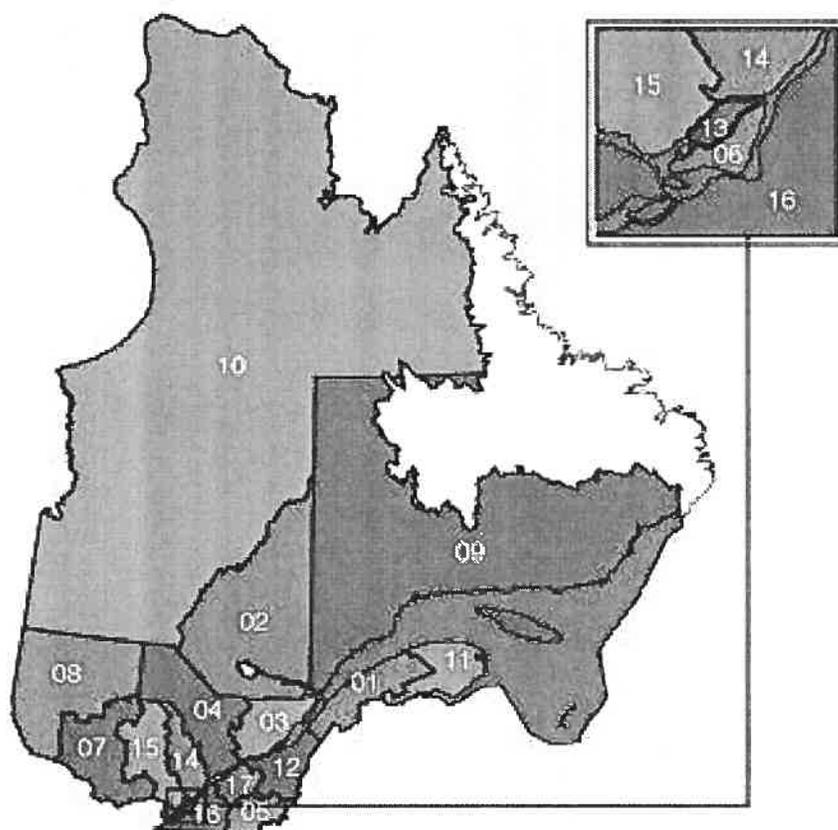
Sentez-vous libre de poser toutes les questions dont vous avez envie. Pour toute question à propos de vos droits en tant que sujet de recherche de cette étude, communiquez avec docteure Jocelyne Tessier, responsable du Comité d'éthique de la recherche en composant le 514-252-3400 poste 3373. Pour des questions se rapportant à l'étude, vous pouvez rejoindre madame Annie Duchesne, agente de recherche à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, au 514-252-3400 poste 4524, le docteur Michel Laverdière au même numéro ou le docteur Jean Joly au 514-457-2070. Vous recevrez un exemplaire de ce formulaire de consentement une fois qu'il aura été signé

CONSENTEMENT

On m'a expliqué l'étude en question, j'ai eu le temps de lire ce formulaire de consentement et j'ai obtenu des réponses à mes questions. J'accepte de participer à l'étude mentionnée en titre.

_____	_____	_____
Nom du sujet	Signature du sujet	Date
_____	_____	_____
Nom du témoin	Signature du témoin	Date
_____	_____	_____
Nom du chercheur	Signature du chercheur	Date

Annexe B : Carte des régions administratives du Québec



Source : référence 72

Annexe C : Composition du milieu BCYE (Quelab)

Ingrédients	Quantité (gramme/litre)
Extrait de levures	11,5
Charbon de bois activé	1,5
Tampon ACES	6,0
Alpha-kétoglutarate	1,0
Agar	17,0
Facteurs de croissance	
L-cystéine HCl	0,4
Pyrophosphate de fer	0,25

pH 6,9 \pm 0,1