



Étude de cas appliquée à l'évaluation de la présence de *Legionella* dans les filières de traitements et de valorisation des déchets



Recherche coopérative sur les déchets et l'environnement

“le virus de l'expertise...”



SOMMAIRE

➤ DONNEES GENERALES ET BIBLIOGRAPHIE

- ✓ Les bactéries du genre *Legionella*
- ✓ Légionellose et fièvre de Pontiac
- ✓ Notions de réservoirs, d'exposition et de DMI

➤ ETUDE DE CAS

- ✓ Organisation et déroulement
- ✓ Résultats

➤ CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Legionella et légionellose



- 1) Bactérie ubiquiste à tropisme hydrique
- 2) Présence possible dans environnements humides (boues, sédiments, composts)

Large réservoir naturel

La bactérie



Taxonomie	Caractéristiques <i>Legionella</i>	Exemple
Genre	1 genre	<i>Legionella</i>
Espèces	48 espèces environ	<i>pneumophila</i>
Sérogroupes	Variables de 1 à 16 pour une espèce	sg 1

La bactérie



Espèce
les plus virulente

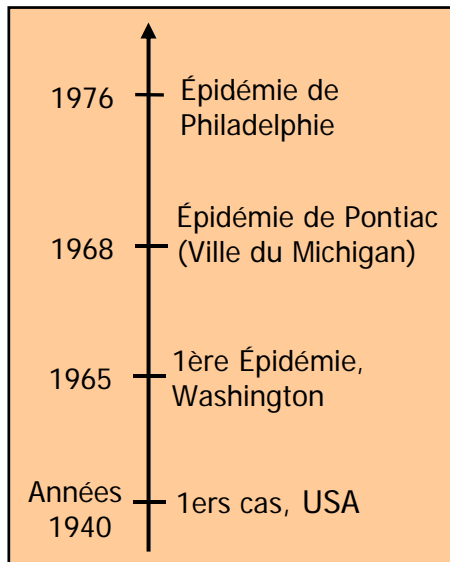


Tableau 2 : Liste des espèces recensées de *Legionella* (Nombre de sérogroupes, implication dans les cas cliniques, capacité à infester des amibes) – d'après Ha, 2005 et EPA, 1999.

ESPECES		ESPECES	
L. adelaidensis	L. fairfieldensis	L. londiniensis (2)	L. rowbothamii
✓ L. anisa *	L. fallonii	✓ L. longbeachae * (2)	L. rubrilucens
✓ L. beliardensis *	L. geestiana	✓ L. lytica *	✓ L. sainthelensi * (2)
✓ L. birminghamensis *	L. genomospecies	✓ L. macaechernii * (syn : ✓ L. santicrusis * Tatlockia macaechernii)	
✓ L. bozemanii * (2) (syn : Fluoribacter bozemaniae)	✓ L. gormanii * (syn : Fluoribacter gormanii)	✓ L. micdadei * (syn : Tatlockia micdadei)	L. shakespearei
L. brunensis	✓ L. gratiana *	L. moravica	L. spiritensis (2)
✓ L. cherrii *	L. gresilensis	L. nautarum	L. steigerwaltii
✓ L. cincinnatiensis *	✓ L. haeckeliae * (2)	✓ L. oakridgensis *	L. taurinensis
L. donaldsonii	L. israelensis	✓ L. parisiensis *	✓ L. tusconensis *
L. drozanskii	L. jamestowniensis	✓ L. pneumophila * (15)	✓ L. wadsworthii *
✓ L. dumoffii * (syn : Fluoribacter dumoffii)	✓ L. jordanis *	L. quateirensis	L. waltersii
✓ L. erythra * (2)	✓ L. lansingensis *	✓ <u>L. quinlivanii *(2)</u>	<u>L. worsleiensis</u>

(n) : nombre de sérogroupes par espèce.

en gras : espèces capables de parasiter au moins une amibe.

* Espèces déjà associées à des cas cliniques (environ 20 espèces pathogènes)



Legionella et légionellose



□ Conditions d'une infection

RESERVOIRS

Quantité de bactéries (survie, multiplication, ...)

+

BIOAEROSOLS

Taille des gouttelettes

Persistence dans l'atmosphère (% humidité, t°C)

+

INHALATION

Contexte (distance à la source, protection, ...)

+

Souches

DMI certainement variable

Virulence

$20 \text{ UFC} < \text{ID}_{50} < 129 \text{ UFC}$

+

Individus

Statut immunitaire

FIEVRE DE PONTIAC
(Majoritaire)

LEGIONELLOSE
(Minoritaire)



Legionella et légionellose

□ DMI : une donnée nécessaire à l'évaluation du risque mais ...

DMI certainement variable \searrow
20 UFC < ID₅₀ < 129 UFC

La DMI => une approche de l'évaluation du risque adaptée ?

- Trop d'incertitudes Calcul des valeurs de **DMI**, **LD50** et **ID50** incertain
Virulence extrêmement **variable** des *Legionella*
Sensibilité variable des individus
- Étude dose-réponse **Caractérisation des expositions = difficile**
(nombre de personnes exposées et mode d'exposition)

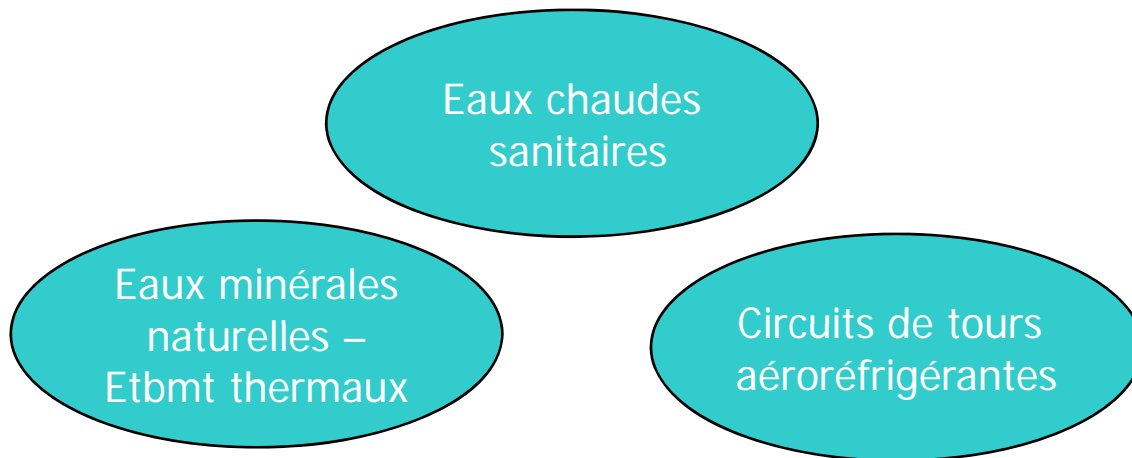
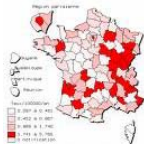


Legionella et légionellose



☐ SOURCES CONNUES

La légionellose



Méthodologie adaptée

= Norme NF T 90 431



Données disponibles



Évaluation et gestion du
risque possible



1er niveau seuil
=
1 000 UFC/L



Legionella et légionellose



□ CONTEXTE :

➤ PLAN NATIONAL SANTE ENVIRONNEMENT



Réduire de 50% l'incidence de la légionellose d'ici à 2008

SANTE PUBLIQUE : évaluation du risque sanitaire

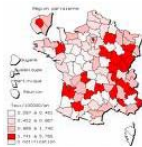
⇒ Exposition des **riverains**

⇒ Exposition des **personnels**

⇒ Exposition des **utilisateurs**

➤ Sources de **légionelloses non identifiées ...**

La légionellose



Données InVS

France

-2006 : 1443 cas

-Taux d'incidence 2006
= 2,3 / 100 000 habitants

-Environ 10 % de
cas mortels

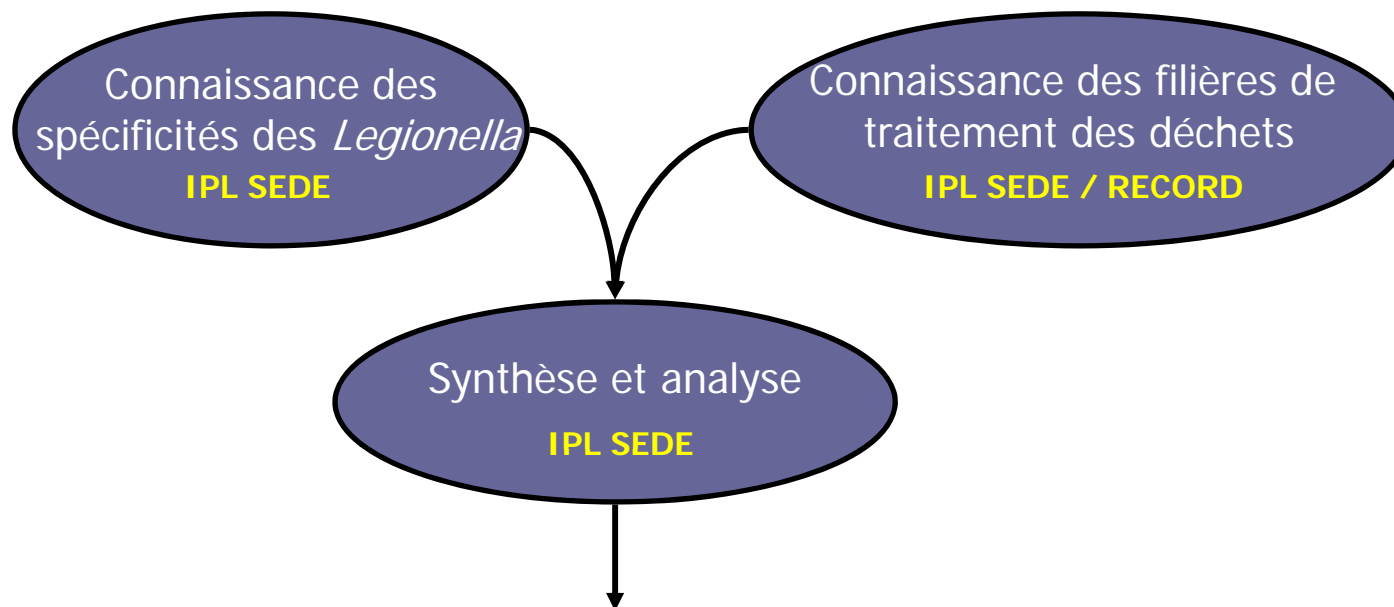


Legionella et légionellose



❑ AUTRES SOURCES

Centre de traitement des déchets et de valorisation ???





L'étude



IDENTIFICATION DES FILIÈRES POTENTIELLEMENT À RISQUES

Un triple objectif

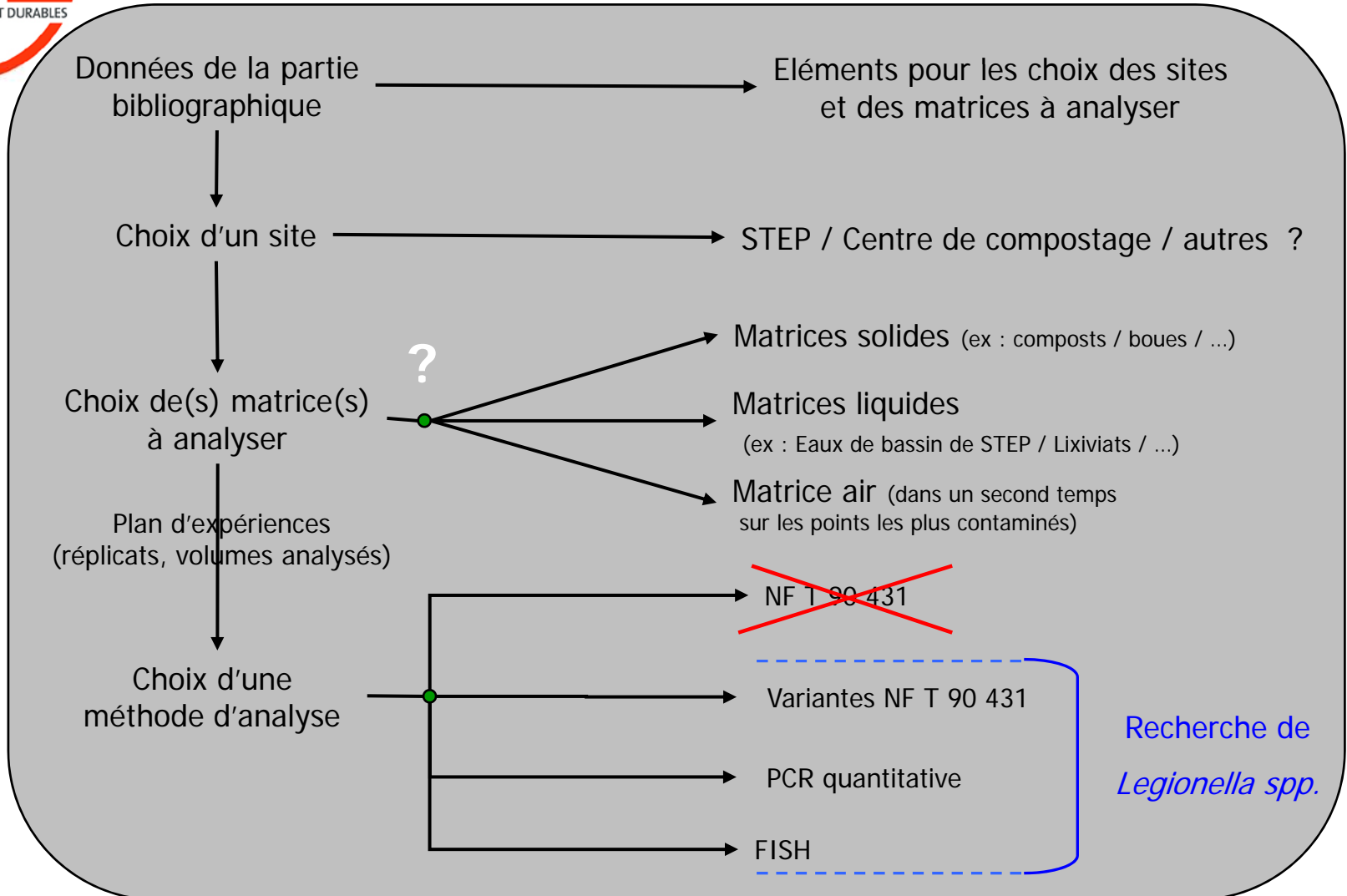
- Situer le **risque « légionelle »** dans le **contexte du traitement des déchets**.
- Identifier la présence de **réservoirs potentiels** dans les installations de traitements des déchets
- Évaluer la **pertinence des méthodologies** employées pour la recherche et le dénombrement des *Legionella* au sein d'un centre de traitement de déchets

Organisation

1^{ère} partie bibliographique

Identifier un type
d'installation et un site

2^{ème} partie d'Étude de cas



Réservoir naturel => Quantités limitées

En conditions « artificielles » entretenues par l'activité humaine
=> **Prolifération potentielle**

La bactérie



Conditions favorables ?

Optimale = 35°C
Tolérée = 25 < T°C < 45

← Température

Survie = 0,2 mg/l
Multiplication = 2,2 mg/l

← O₂ dissous

Sel métalliques (dont fer)
Relation avec les autres microorganismes

← Nutriment

Tolérée = de 1 à 5 g/l
Présence possible jusqu'à 30 g/l ?

← Salinité

Flore associée

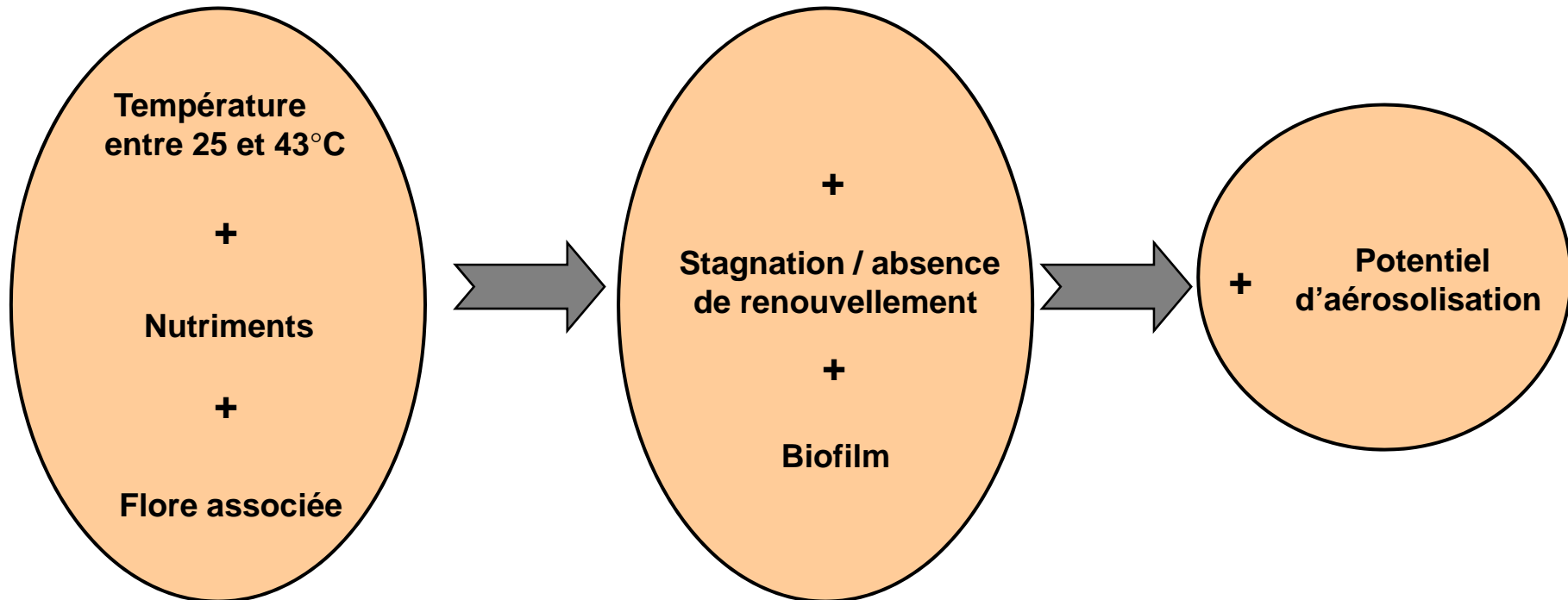
Optimal = neutralité
Toléré = 5,5 < pH < 8,5

← pH



L'étude : données bibliographiques

CARACTERISTIQUE D'UN RESERVOIR



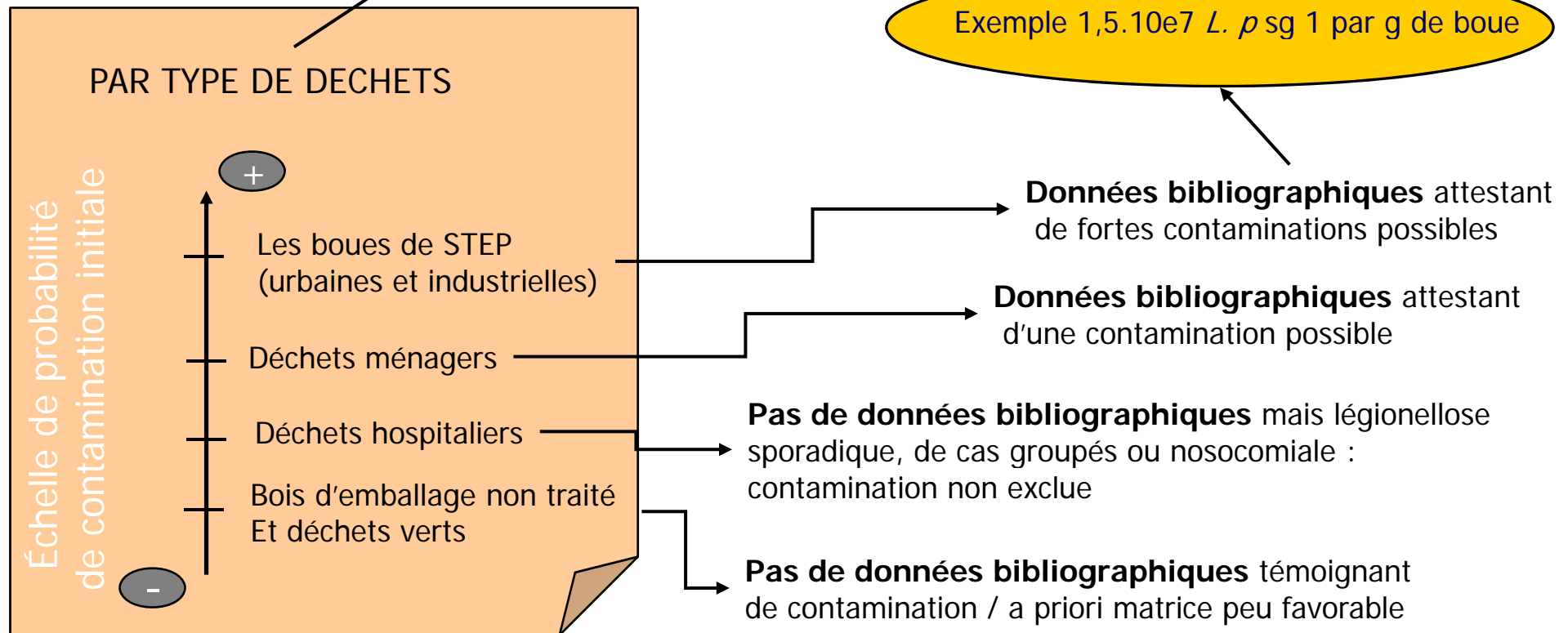


L'étude : données bibliographiques



RESERVOIR POTENTIEL

RECENSEMENT et CLASSEMENT

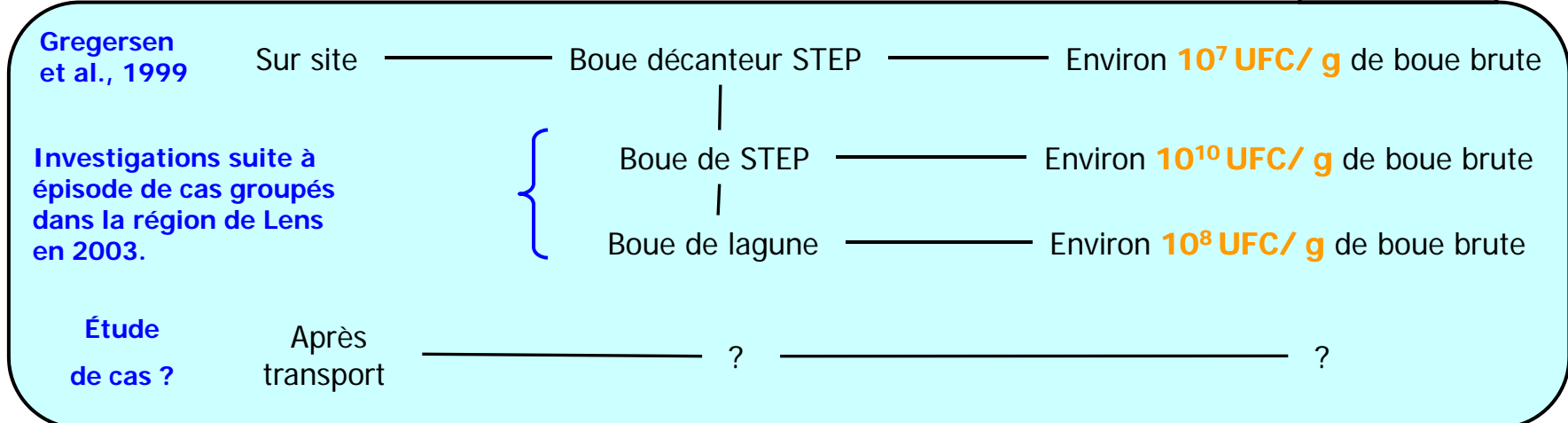
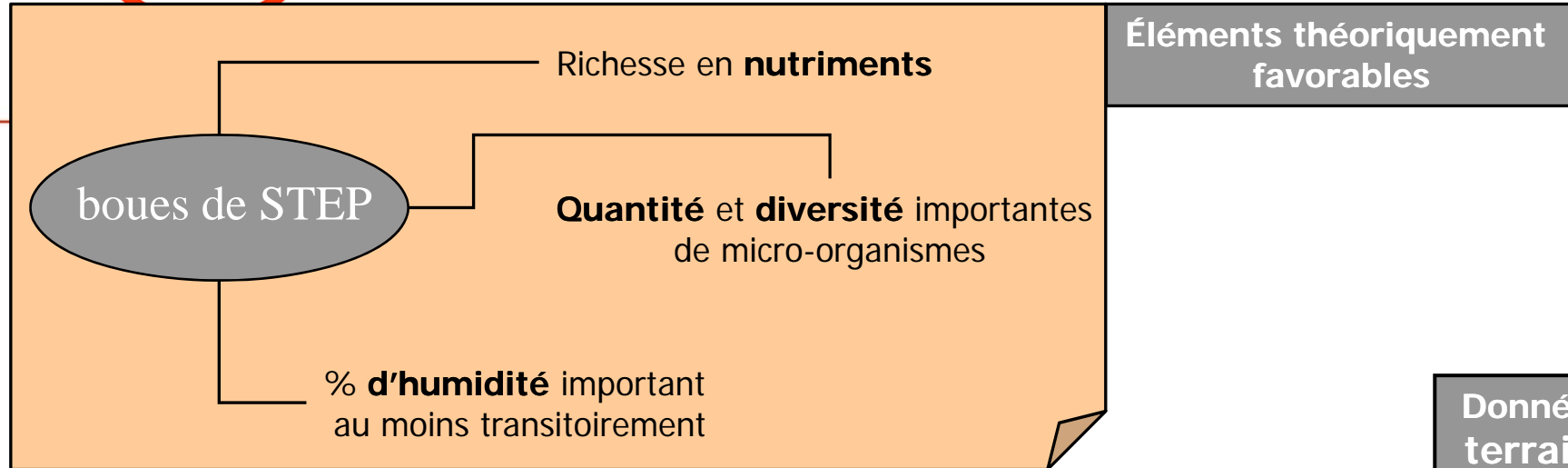




L'étude : données bibliographiques



RESERVOIR POTENTIEL





L'étude : données bibliographiques



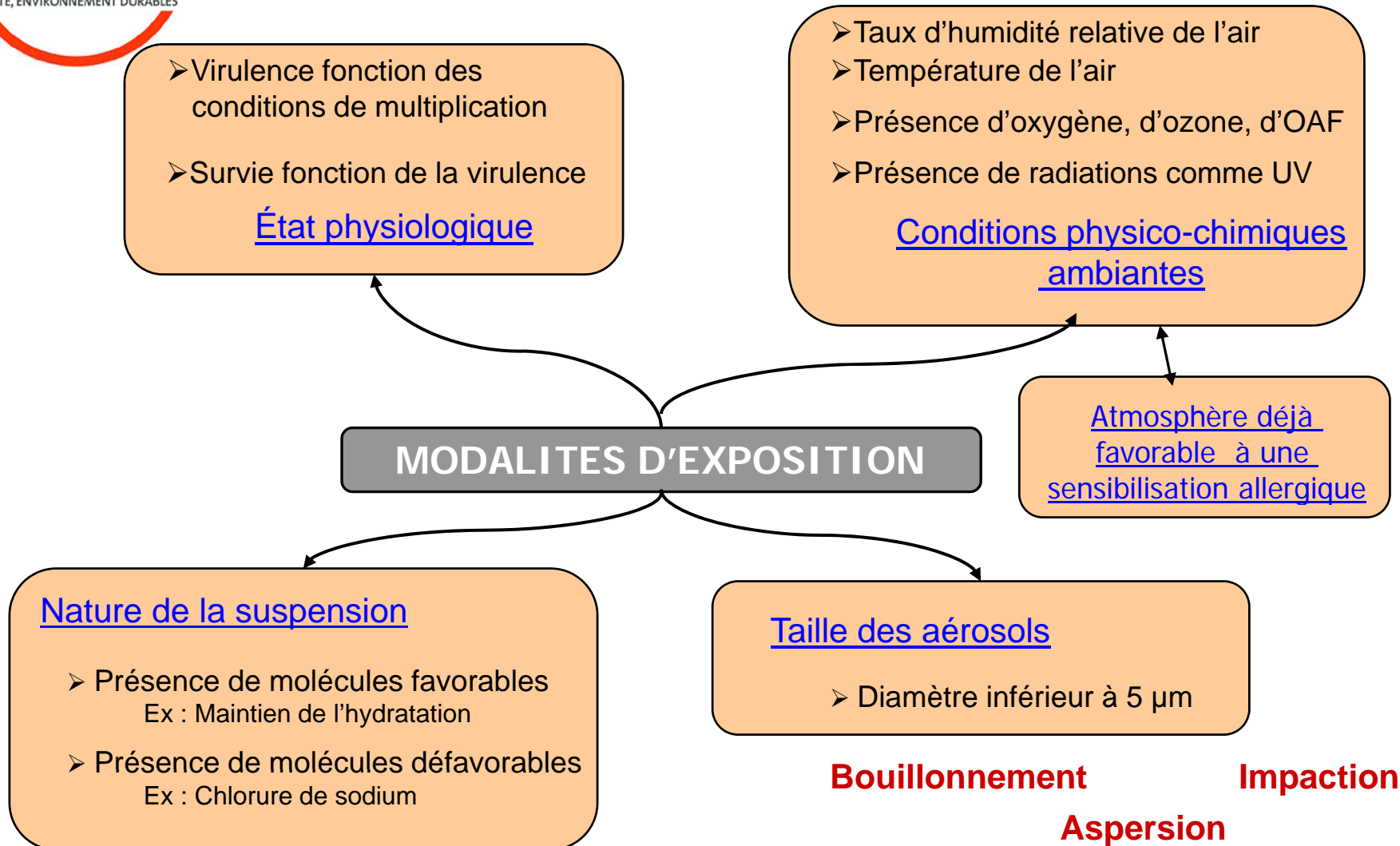
RESERVOIR POTENTIEL

Données
terrains
complémentaire

Sur site ——— STEP ——— Contexte épidémie de HARNES ——— 44% de STEP positives (n=97)

Sur site ——— LAGUNE ——— 270 m ——— Environ 330 UFC/m³ d'air

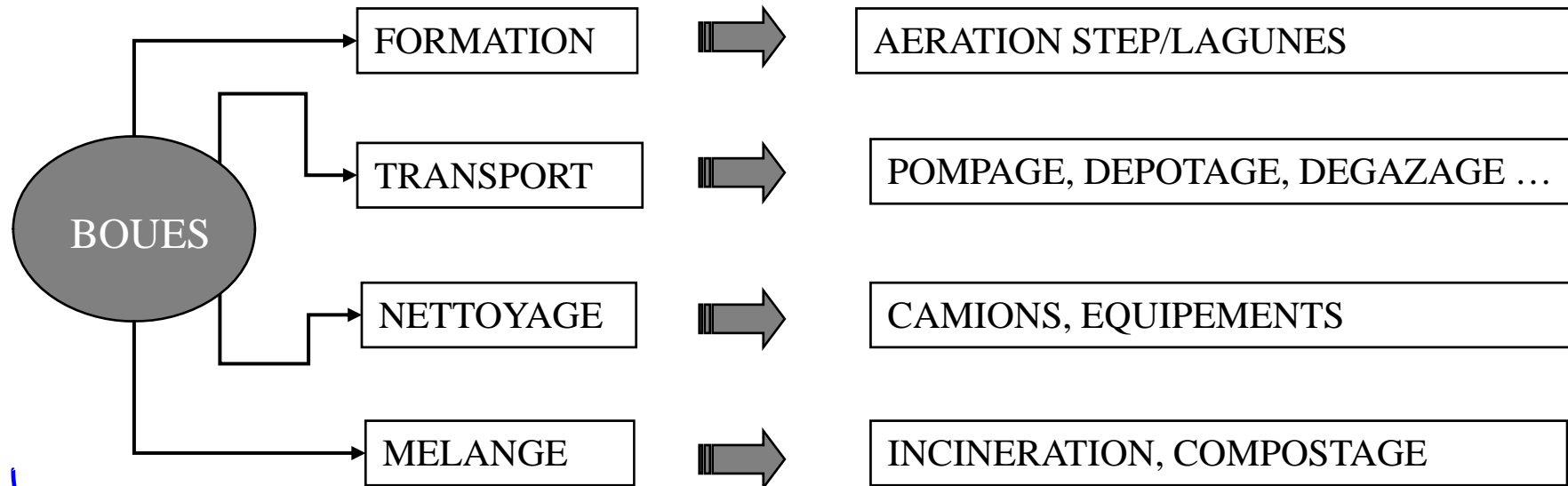
Proximité immédiate ——— Environ 5 400 UFC/m³ d'air



MODES D'EXPOSITION

Les expositions du point de vue d'un déchet

Exemple : étapes potentielles de formation de bioaérosols infectieux



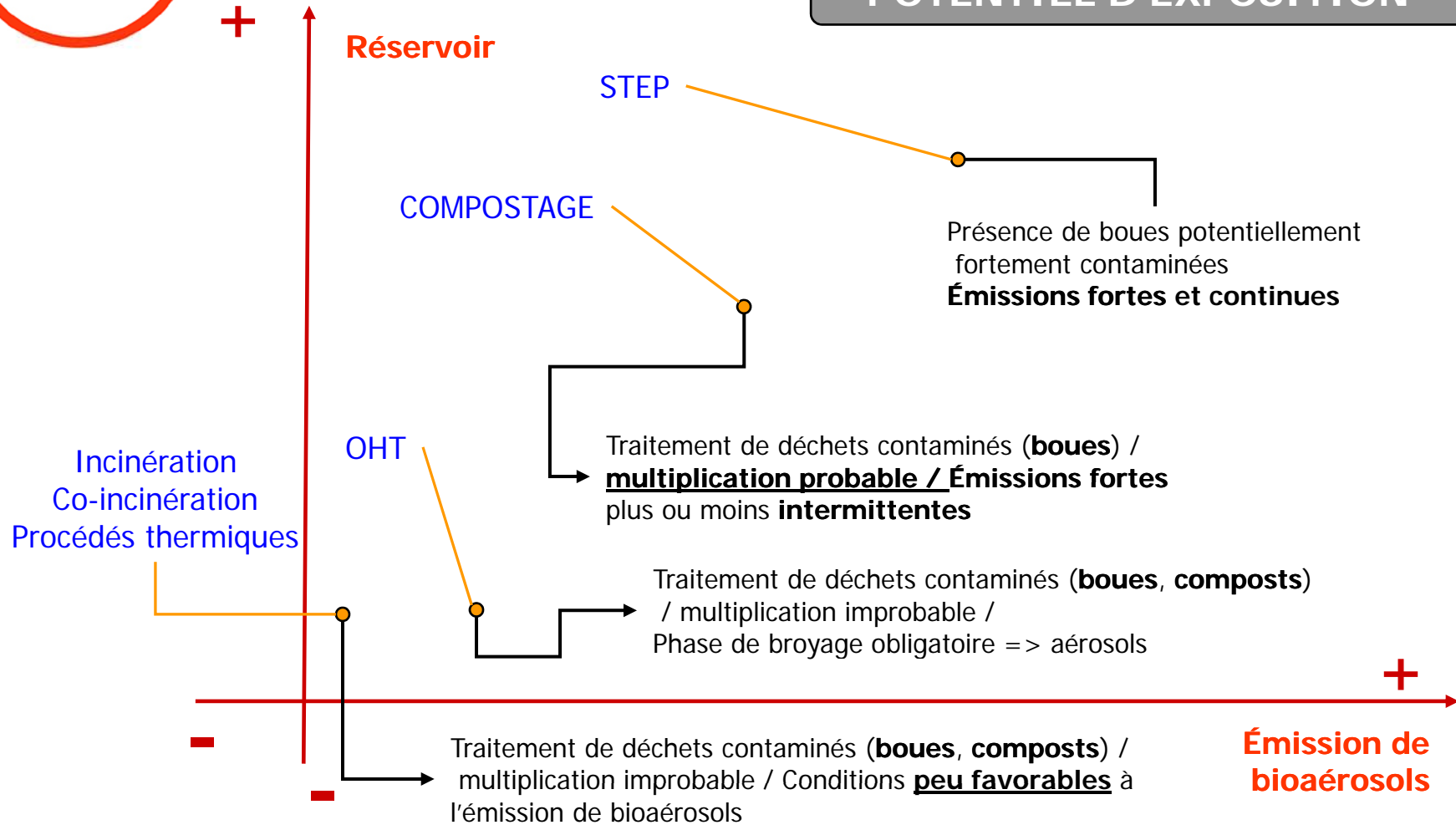
DIVERSITE DES ETAPES D'EXPOSITION



L'étude : données bibliographiques

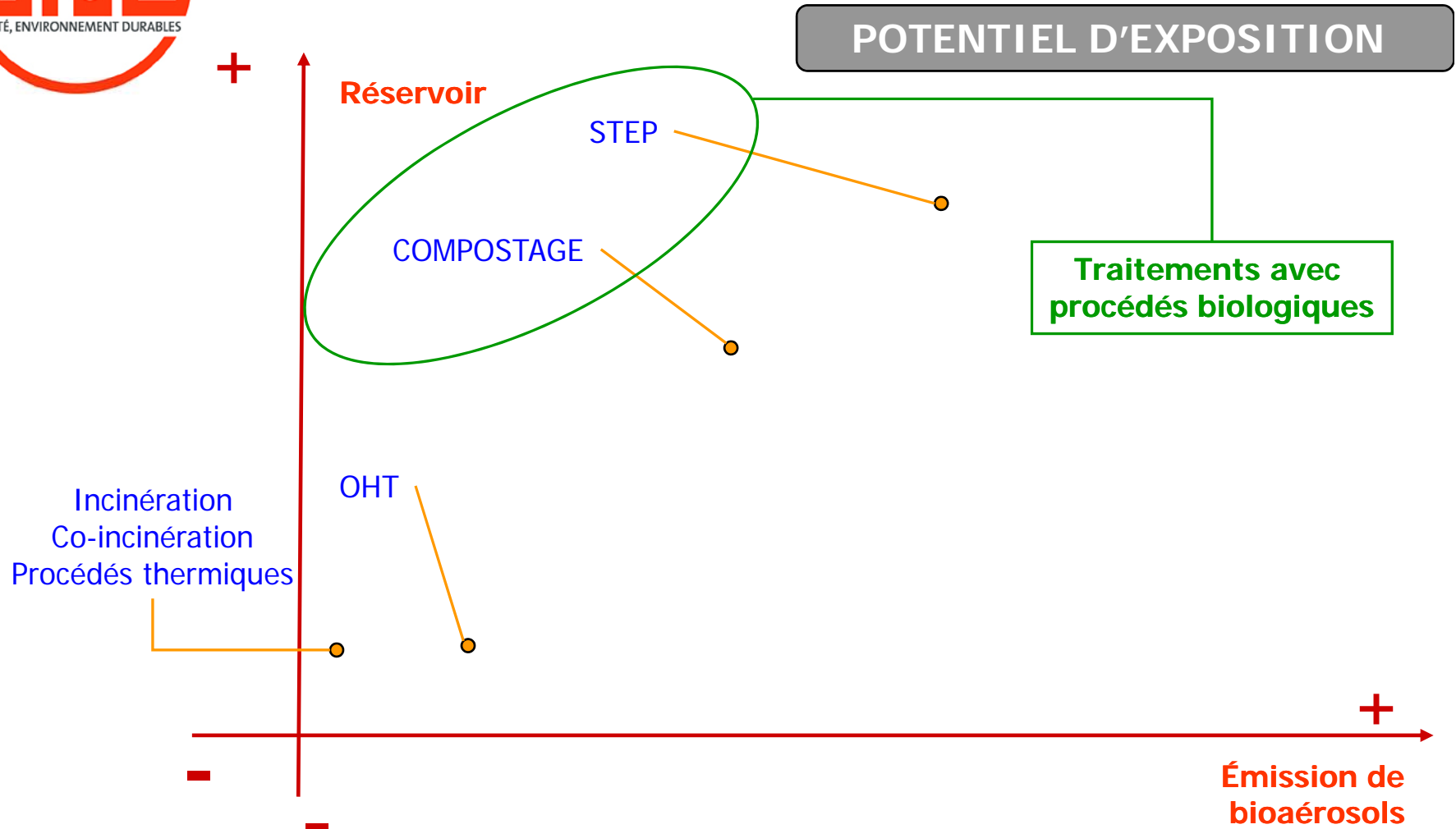


POTENTIEL D'EXPOSITION





L'étude : données bibliographiques





L'étude : données bibliographiques



PROPOSITION DE SITE

STEP OU CENTRE DE COMPOSTAGE

Réservoirs

+

Aérosolisation

↳ Accueil de déchets avec un niveau de contamination potentiellement élevé (OM et surtout boues de STEP)

↳ Utilisation de réseaux d'eaux pour les étapes d'aspersion / Potentiel de contamination à différentes phases du procédé

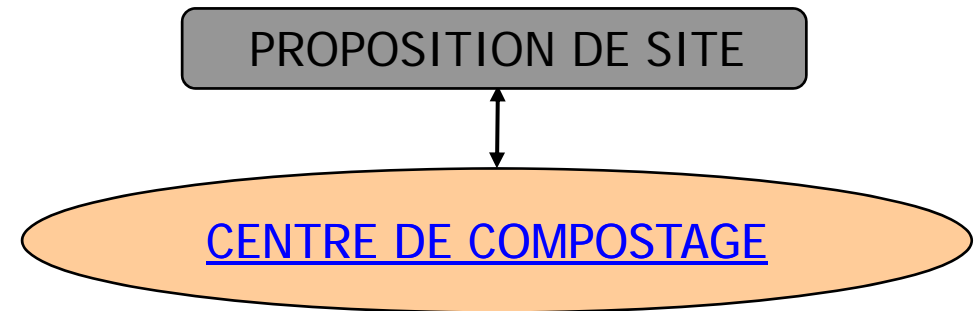
↳ Filière avec le potentiel de survie et de prolifération le plus élevé (humidité, pH, t°C, flore associée, ...)

↳ Nombreuses étapes avec aérosolisation :
déchargement
broyage
retournement
criblage
...

↳ 50 à 90% des particules mises en suspension intègrent la fraction alvéolaire



L'étude : ETUDE DE CAS



Données complémentaires appuyant ce choix :

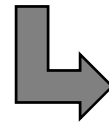
- ↳ **Cas documentés** (Ex *Legionella longbeachae*, Steele T. et Mc Lennan A., 1996)
- ↳ **L'attention déjà portée sur ces sites concernant l'impact sanitaire de l'émission d'aérosols** (*Aspergillus fumigatus*, endotoxines, ...)
- ↳ **Double intérêt :**
 - **analyse des composts = contamination centre de compostage**
 - **analyse des boues entrantes = contamination station**



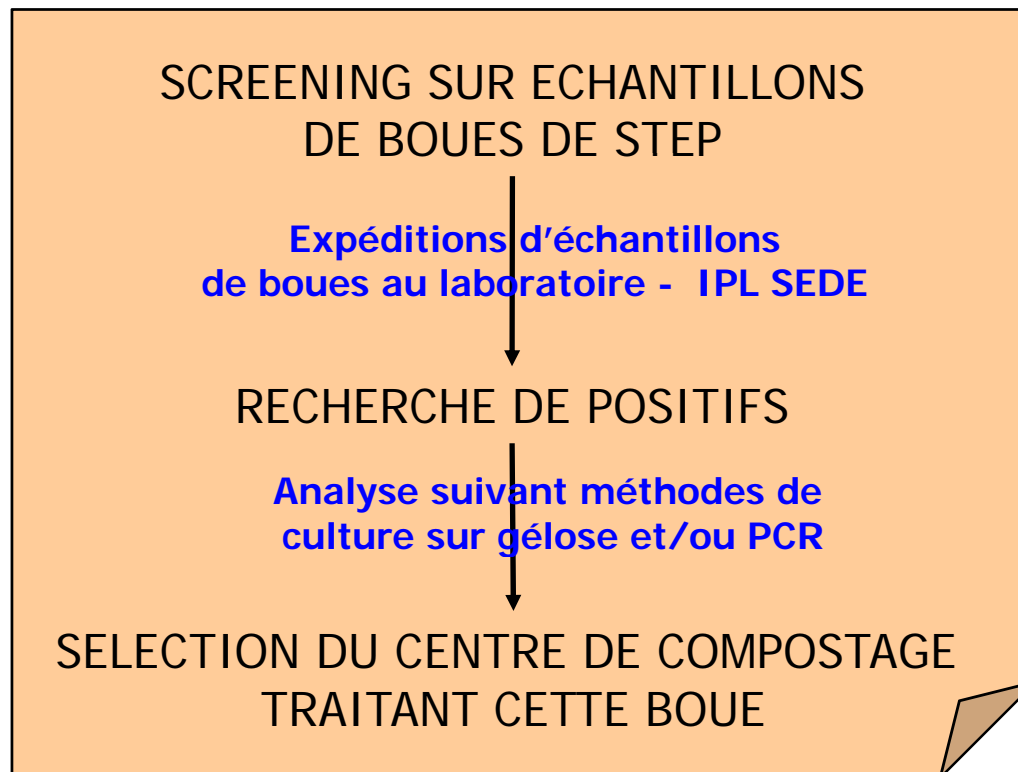
L'étude : ETUDE DE CAS

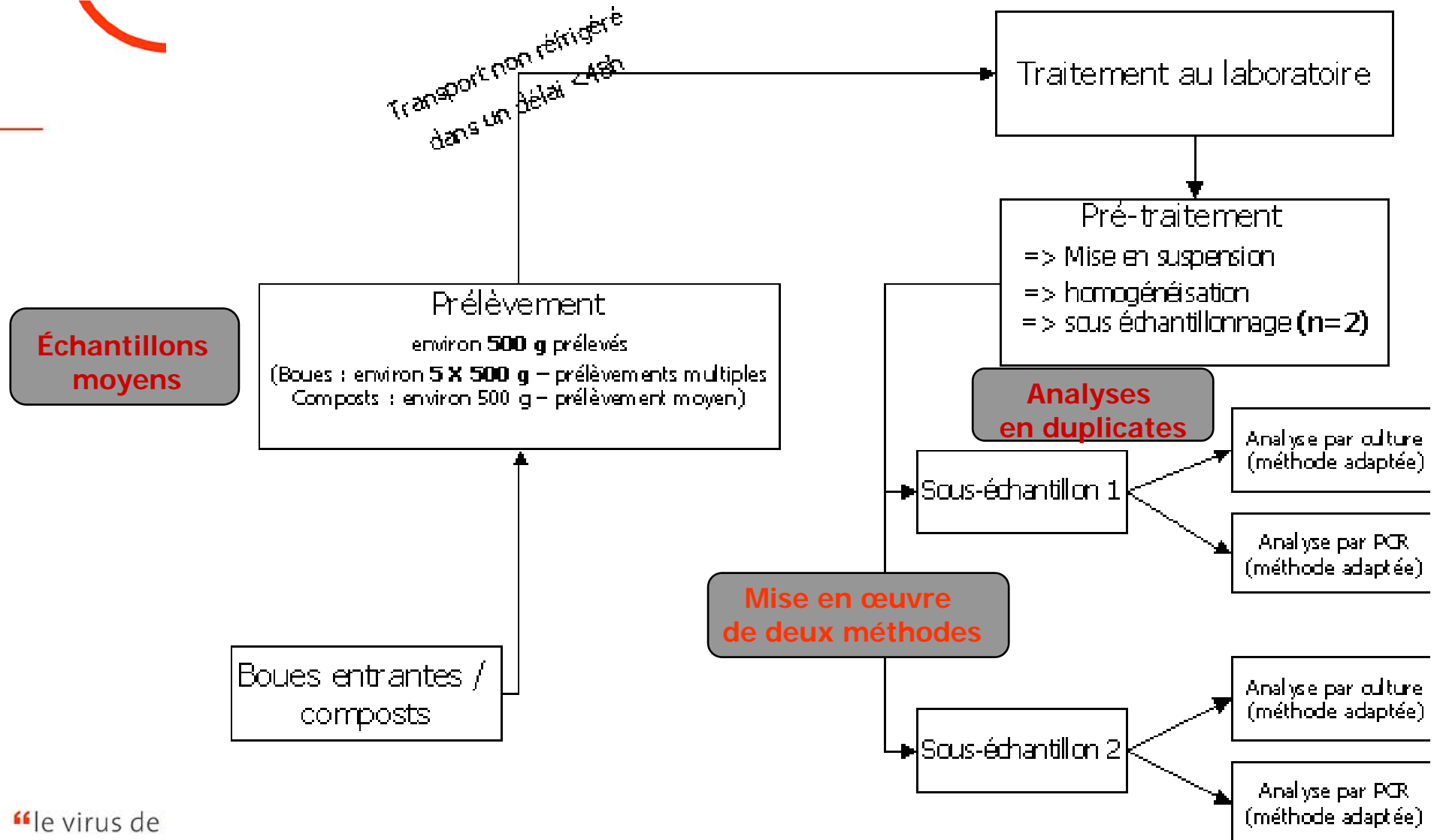


Stratégie pour le choix du site de compostage



Éviter de réaliser une campagne
sur un site non contaminé



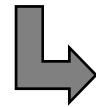




L'étude : ETUDE DE CAS



METHODES ANALYTIQUES



Capable de s'affranchir d'une flore interférente importante



~~NF T 90 431~~

Méthodes systématiquement menées en parallèle

1. Variantes NF T 90 431



Unité Formant Colonie/I (UFC/I)
= Bactéries capables de se multiplier

➤ Information quantitative
(Avantage : Viabilité)

2. PCR quantitative



Unité génome/I (UG/I)
= Contamination globale

Information quantitative sur les matrices liquides (protocole éprouvé)

Information plus qualitative sur les matrices solides (mise en œuvre plus difficile)

(Avantage : Sensibilité)



L'étude : ETUDE DE CAS



SCREENING DES BOUES

2 CENTRES DE COMPOSTAGE

5 **BOUES** TOUTES D'ORIGINE URBAINE

Centre de compostage	Dénomination de la boue	Date de prélèvement	CULTURE		PCR Quantitative	
			UFC/g de boue brute		UG/g de boue brute	
			<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
C1	B	11/01/2007	Présence <500	Présence <500	21 000 000	4 100
C1	SH	11/01/2007	Présence <500	Présence <500	1 330 000	Non détectée <500
C2	N	18/01/2007	Non détectée <500	Non détectée <500	10 600	Présence <2 000
C1	SE	18/01/2007	Non détectée < 10 000	Non détectée < 10 000	167 000	34 200
C1	R	01/02/2007	1 000	Présence <500	162 000	Non détectée <500

CULTURE : PRESENCE MODEREE DE L. SPP ET PNEUMOPHILA POUR 3 BOUES SUR 5

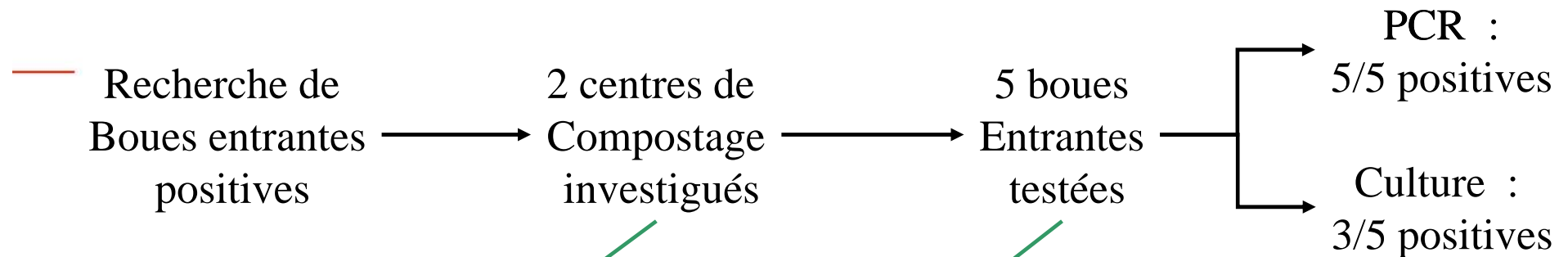
PCR QUANTITATIVE : 100% POSITIFS / NIVEAUX TRES VARIABLES



L'étude : ETUDE DE CAS



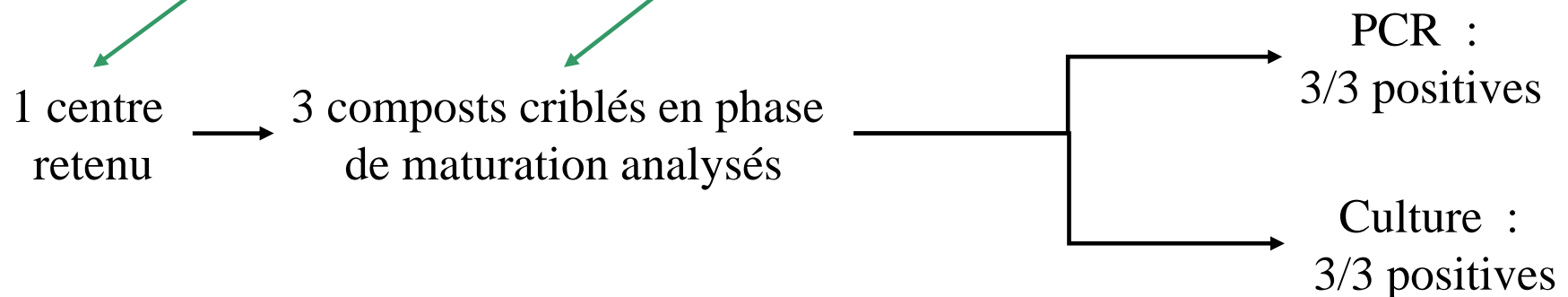
1ere phase : janvier-février 2007



Boue urbaine + déchets verts

Même origine

2ème phase : mars 2007





L'étude : ETUDE DE CAS



CARACTERISTIQUE

Centres de compostage	Dénominations des composts	Dates de prélèvement	Durée de maturation après criblage	T°C de prélèvement	Caractéristiques
C1	B	12/03/2007	1 mois	38,5	Légèrement humide à collant / Présence d'amas
C1	SH	12/03/2007	7 jours	14	Aspect sec et aéré
C1	SE	12/03/2007	15 jours	42	Aspect sec et aéré

1 CENTRE DE COMPOSTAGE

3 **composts** en phase de maturation et criblés

Centre de compostage	Dénomination du compost	Date de prélèvement	CULTURE		PCR Quantitative	
			UFC/g de compost		UG/g de compost	
			<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
C1	B	12/03/2007	510 000	250 000	2 760 000	122 000
C1	SH	12/03/2007	240 000	200 000	1 260 000	40 000
C1	SE	12/03/2007	Présence < 40 000	Présence < 40 000	150 000	Présence < 20 000



L'étude : ETUDE DE CAS

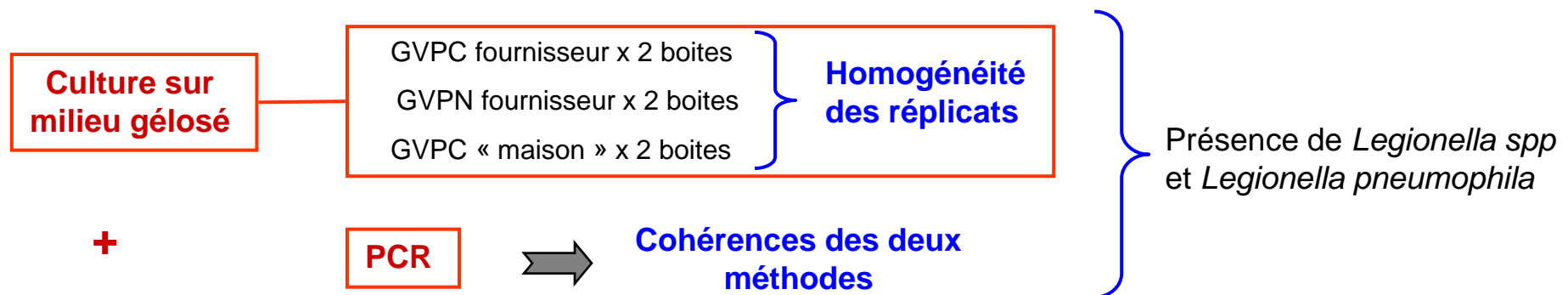


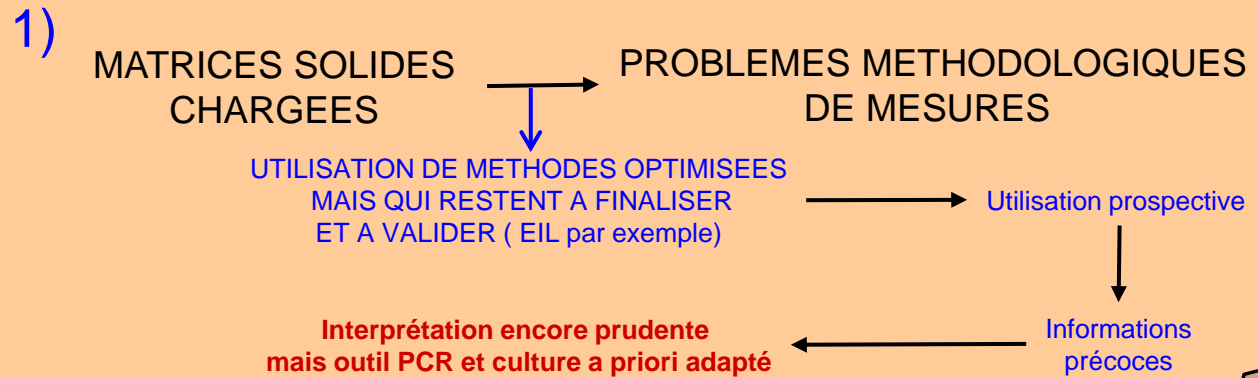
Centre de compostage	Dénomination du compost	Date de prélèvement	CULTURE		PCR Quantitative	
			UFC/g de compost		UG/g de compost	
			<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
C1	B	12/03/2007	510 000	250 000	2 760 000	1 22 000
C1	SH	12/03/2007	240 000	200 000	1 260 000	40 000
C1	SE	12/03/2007	Présence < 40 000	Présence < 40 000	1 50 000	Présence < 20 000

➤ **Protocole optimisé : Selon** protocole décrit dans

Courtois S, Chesnot T., Delgado Viscogliosi P., Yañez A., Jourdain M.J., Pierzo V., Martin S. 2008. Fiabilisation de l'analyse de *Legionella pneumophila* dans les eaux résiduaires : évaluation de différentes méthodes de préparation d'échantillons » *European Journal of Water Quality* tome 39, fasc 1, p91-102 - **(Projet ANR PERLE)**

➤ Multiplication du nombre de mesures





2) A priori 2 réservoirs potentiels sur les sites de compostage



Rq : Autres points de la filière non investigués pour des problèmes de faisabilité de prélèvement

Pas de conclusions possibles sur l'évolution des *Legionella* pendant les phases de fermentation du compostage

Cependant, la présence dans le compost implique a minima une possibilité de persistance des *Legionella* pendant le compostage



PERSPECTIVES ...



Comment progresser sur la connaissance des niveaux d'exposition ?

RESERVOIR

- Confirmer les **outils méthodologiques** pour la recherche des *Legionella* dans les matrices solides riches en microorganismes
- Confirmer la présence de *Legionella* dans **différentes filières** sur **différents sites**

BIOAEROSOLS

- Confirmer les **outils méthodologiques** pour la recherche des microorganismes dans les bioaérosols
- Intégrer la recherche des *Legionella* au niveau des **études d'exposition aux bioaérosols**
- **Réaliser des prélèvements dédiés à proximité de réservoirs confirmés**



**Laboratoire d'Études et d'Expertises,
Rue Lucien CUENOT, Site Saint JACQUES II
BP 51005, 54 521 MAXEVILLE**

Merci de votre attention