



n^o
n

18607

AGENCE DE L'EAU RHIN-MEUSE

Etude des enquêtes épidémiologiques liées

aux eaux de baignade.

Recherche et analyse des micro-organismes responsables.

par MUSQUAR Benoît

Etudiant à l'**L.U.T.** du **Montet** Nancy
Biologie Appliquée
Industrie Alimentaire et Biologique

à l'AGENCE DE L'EAU RHIN-MEUSE.

Route de Lessy
57 16 1 Moulins-les-Metz

Maître de stage : Melle Claire **RIOU**

Enseignant superviseur : Mr André **MOUREY**

SOMMAIRE

	Pages
<u>REMERCIEMENTS</u>	3
<u>INTRODUCTION</u>	4
<u>PRESENTATION DE L'AGENCE</u>	5
<u>PATHOLOGIES RENCONTREES :</u>	
<u>A) TROUBLES GASTRO-INTESTINAUX</u>	
A 1) Argumentation.....	6
- Agent pathogène	
- Pathologie	
- Mode de contamination	
- Survie	
A 2) Techniques d'analyse.....	8
<u>B) AFFECTIONS CUTANEO-MUQUEUSES</u>	
B 1) Argumentation	11
B 2) Techniques d'analyse	12
<u>C) LEPTOSPIROSE</u>	
C 1) Argumentation	13
C 2) Techniques d'analyse	15
<u>D) PATHOLOGIES AMIBIENNES</u>	
D 1) Méningo-encéphalite amibienne primitive	17
D 2) Encéphalite amibienne granulomateuse	19
D 3) Considérations générales	19
D 4) Techniques d'analyse	19
<u>E) CHOLERA</u>	
E 1) Argumentation	21
E 2) Techniques d'analyse	23
<u>CONCLUSIONS</u>	24
<u>POURSUITES</u>	25
<u>ANNEXES</u>	
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	

-Remerciements

Mes remerciements s'orientent vers

Mr Bruno **VERLON**, directeur de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse, qui m'a accepté au sein de l'Agence,

Melle Claire **RIOU**, maître de stage, pour avoir guidé, conseillé mes recherches et pris le temps de superviser mes travaux,

l'équipe de **documentalistes** pour les réponses immédiates à mes sollicitations fréquentes pour obtenir les articles souhaités,

Je remercie également les personnes extérieures à l'Agence ayant accepté de répondre à mes interrogations :

Mr **HARTEMANN**, qui m'a fait profiter de l'ensemble de la littérature qu'il possède se rapportant au sujet,

Mr PAQUIN pour m'avoir autorisé l'accès aux techniques d'analyse en application dans le laboratoire,

Mr **EXINGER**, dans le laboratoire duquel j'ai passé plusieurs heures à observer et interroger les techniciennes,

Mr **RICHARDIN** pour l'utilité des documents qu'il m'a fourni.

Introduction :

OBJECTIFS

Cette étude repose sur la recherche bibliographique des antécédents épidémiologiques rencontrés dans les pays développés, dans le cadre d'activités aquatiques.

L'objectif de l'étude est d'identifier les micro-organismes en cause dans ces pathologies et de recenser les méthodes de recherche. L'accent sera mis sur les **éléments** importants à la compréhension du mode de contamination : voies et vecteurs d'infection ou localisation de ces pathogènes.

Les enquêtes et rapports publiés servent à mieux **connaître** le mécanisme de la pathologie afin d'en chercher la cause et de prévenir tout accident.

RESTRICTIONS

On limitera volontairement ce cadre aux baignades et autres activités hors piscines ; c'est un souhait de ne pas prendre en compte les pathogénicités en relation avec les eaux traitées. Cette restriction a pour seul objectif de vouloir se pencher sur la qualité bactériologique des eaux de surface (rivière, lac, étang . . .) étant potentiellement des lieux récréatifs (nécessitant que le danger y soit absent).

La **préoccupation** principale des hydrologues se plaçant avant tout sur la recherche de l'amélioration des caractères chimiques et biologiques, le caractère microbiologique n'est pris le plus souvent en compte que dans les eaux d'alimentation. C'est pourquoi les références littéraires concernant la microbiologie des eaux de surface sont assez pauvres.

DEROULEMENT DE L'ETUDE

L'étude repose sur des enquêtes épidémiologiques effectuées en Europe ou en Amérique du nord, qui relatent avec grande précision les paramètres essentiels à la compréhension et avancent des hypothèses quant aux germes responsables des épidémies.

Dans le désir de ne pas vouloir se limiter à la littérature, une partie du rapport est consacrée à la synthèse des renseignements fournis par les spécialistes qui ont eu la sympathie de répondre à mes questions.

Au cours de ce stage, j'ai pu rencontrer :

- le professeur Hartemann, directeur du Laboratoire **d'Hygiène** et de Recherche en Santé Publique (LHRSP) de Vandoeuvre, enseignant à la faculté de médecine de Brabois et auteur de nombreux ouvrages concernant la microbiologie de l'eau.
- Mr Paquin, chef du service microbiologie du LHRSP.
- Mr Exinger, directeur du laboratoire d'hydrologie (ULP) de la faculté de pharmacie à **Illkirch-Gratzen**.
- Mr Richardin, ingénieur sanitaire de la DDASS Moselle, à Metz.

De ces menées personnelles en ressort tout d'abord une description des pathologies rencontrées par ces professionnels : micro-organismes mis en cause, facteurs favorables à l'infection par des pathogènes, etc.

Les directeurs de laboratoires interrogés par la suite m'ont indiqué les méthodes d'analyses qu'ils appliquent (normalisées pour certains micro-organismes, empiriques **mais** officialisées pour d'autres).

Fiche d'identité de l'Agence :

Etablissement public de **l'Etat**, doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière.

L'Agence est apparue en 1964, par application de la loi du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux, ainsi qu'à la lutte contre leur pollution.

Mission : l'Agence doit aider financièrement et techniquement à la lutte contre la pollution de l'eau et à la protection des ressources en eau dans le respect du milieu naturel.

Moyens : l'Agence perçoit sur les usagers de l'eau des redevances qui seront redistribuées sous forme de subventions, de prêts ou d'avances aux maîtres d'ouvrages qui concourent à lutter contre la pollution des eaux ou à l'amélioration de la répartition de la ressource entre les usagers.

Zone d'influence de l'Agence : cette zone s'étend à trois régions (Alsace, Lorraine, Champagne-Ardenne en partie), ce qui représente une superficie égale à 6% de celle de la France.

La longueur totale des cours d'eau ayant un objectif de qualité dans le bassin est de :

-1900 km pour les grands cours d'eau.

-5200 km pour les petits cours d'eau.

L'Agence de **l'Eau** Rhin-Meuse a une vocation européenne puisque ses rivières sont communes à plusieurs pays et sa situation géographique (centrée entre la Suisse, l'Allemagne, le Luxembourg, la Belgique et les Pays-Bas) entraîne l'obligation de rendre cohérentes les actions menées avec celles des voisins de la France.

Siège : METZ en Moselle (Rozérieulles)

Président du Conseil d'Administration : Jean-François Saglio, ingénieur général des Mines.

Directeur : Bruno Verlon, ingénieur en chef des Mines.

Effectif 1994 : 170 personnes

Budget primitif 1994 : 1 150 MF

Les 6 Agences de **l'Eau** en France concourent à la politique définie par le **Ministère de l'Environnement**.

A) Troubles gastro-intestinaux :

A 1) Argumentation :

* Agents pathogènes :

Plusieurs micro-organismes sont responsables des troubles gastro-intestinaux. Certains, cités dans la table des pathologies hydriques (annexe n°1), correspondent essentiellement à des germes d'origine fécale.

Parmi ces bactéries, on peut trouver la famille des ENTEROBACTERIACEAE, se subdivisant en :

- coliformes : *Escherichia*
Citrobacter
Klebsiella
Enterobacter

- *Proteus-Providencia*

- *Salmonella*

- *Shigella*

ainsi que certains streptocoques de la famille des Streptococcaceae qui sont cocci Gram + (les streptocoques fécaux, témoins de contamination fécale, sont aussi appelé entérocoques).

Les *Salmonella* sont les agents de gastro-entérites, engendrées le plus souvent par les aliments y compris l'eau. Ce sont ces sérotypes ubiquistes dont le nombre le plus important provoque des troubles gastriques et des septicémies, une petite partie est la cause des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes.

Les *Shigella* sont pathogènes, uniquement pour l'homme et les autres primates. Elles sont responsables de la dysenterie bacillaire (par *S. dysenteriae* 1) et de gastro-entérites et diarrhées, engendrées souvent par l'eau et les aliments. Les shigelloses (par *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*) constituent, dans nos pays, une infection dont l'origine hydrique n'est pas négligeable.

Germes pathogènes ou saprophytes :

Les bactéries, composant la flore intestinale et évacuées dans les selles, possèdent un pouvoir pathogène variable. C'est à dire que certaines bactéries pathogènes peuvent s'implanter et coloniser le tube digestif d'un individu sans que celui-ci en soit affecté : on parlera d'un porteur asymptomatique.

A l'opposé, d'autres bactéries non-pathogènes (ou saprophytes) peuvent menacer de troubles une personne immuno-déprimée (dont les défences immunitaires sont affaiblies).

* Pathologies :

Le trouble gastro-intestinal ou morbidité gastro-intestinale se caractérise par des douleurs abdominales (crampes), maux d'estomac, nausées, pouvant être aggravé par vomissements ou diarrhées (supérieur à 3 selles par jour) avec apparition de fièvres.

Certaines maladies (comme la leptospirose) ont des signes cliniques évidents qui sont directement liés à un pathogène. On connaît ainsi facilement la cause d'infection. Mais le symptôme gastrique ne caractérise pas obligatoirement une pathologie liée aux contacts avec les eaux de baignade. Cela peut être causé par l'alimentation ou tout autre chose.

C'est pour cela qu'il est difficile de faire la correspondance entre la morbidité gastro-intestinale et l'infection en baignade.

* Mode de contamination :

- Voie **d'infection** :

Les bactéries passent à l'intérieur du corps du baigneur par une simple ingestion de l'eau polluée. Les **Shigella**, par exemple, sont caractérisées par leur aptitude à coloniser le gros intestin, à pénétrer et à se multiplier dans les cellules épithéliales coliques et à produire la maladie. D'autres pathogènes sont aussi capables de pénétrer et d'envahir plus ou moins profondément les tissus sous-jacents.

De nombreux micro-organismes intestinaux, résidents normaux du tube digestif, passent dans la circulation sanguine à la suite d'un fléchissement de l'immunité locale, et se fixent au niveau d'autres tissus. Ils se multiplient et déterminent alors des lésions locales accompagnées de troubles plus ou moins graves. [16]

- Toxicité-Virulence : [16]

Au cours de leur multiplication, les bactéries peuvent élaborer des toxines qui jouent un rôle dans le pouvoir pathogène.

Les toxines sont des macromolécules dont le site d'action cellulaire peut être membranaire, intra ou extra-cellulaire.

3 types de toxines sont connues : [16]

- les toxines qui tuent la cellule par voie intra-cellulaire et agissent par inhibition de la synthèse protéique.

- les toxines qui affectent la régulation cellulaire par modification de l'équilibre **hydroélectrique** de la cellule.

- les toxines qui agissent sur les cellules nerveuses en inhibant la transmission de **neuro-médiateurs** au niveau pré-synaptique de la jonction neuro-musculaire.

En ce qui concerne la virulence de la bactérie, elle est mesurée expérimentalement en faisant varier les doses infectieuses administrées aux animaux ou humains volontaires. La dose infectieuse 50 % (**DI 50**) ou la dose létale 50 % (**DL 50**) correspond à une atteinte malade ou mortelle de 50 % des cobayes. La virulence d'une bactérie (= nombre de germes pour atteindre DI 50) est fonction de la sensibilité des individus.

- Sensibilité :

La sensibilité aux bactéries dépend d'un état de forme individuel. Les bactéries pathogènes opportunistes et les saprophytes profitent des **défences** immunitaires amoindries d'un individu pour pénétrer dans l'organisme et envahir les muqueuses.

Certains pathogènes, après pénétration chez l'hôte, se localisent et végètent au niveau de certains tissus privilégiés sans déclencher aucun symptôme morbide. Les porteurs sains se maintiennent en bonne santé mais disséminent les germes de leurs selles dans la nature.

La sensibilité est difficilement mesurable puisqu'elle oscille entre de nombreuses concentrations de micro-organismes, en fonction de l'état de santé individuel.

- Localisation :

Ces germes proviennent de la pollution fécale donc des déchets de l'homme et des animaux. Ils sont **soit** dispersés dans la nature, soit évacués par les eaux usées et se retrouvent pour la majeure partie dans les rivières et les fleuves, même après passage dans une station d'épuration.

* Indicateurs de pollution fécale - Indicateurs de risque de santé :

Les laboratoires désirant **connaître** la qualité bactériologique d'une eau ne peuvent pas, financièrement et à cause du temps d'analyse, assumer la recherche de tous les **micro-organismes**.

Des indicateurs de contamination d'origine fécale sont choisis en fonction des critères de facilité de recherche, de longue survie dans l'eau, de corrélation avec le degré de pollution... (liste des qualités d'un bon indicateur en annexe **n°2**). Ils sont recherchés, particulièrement pour éviter la recherche de pathogènes tels que *Shigella* ou autres entérobactéries.

Les bactéries les plus couramment utilisées dans l'analyse des eaux sont les coliformes (totaux et fécaux) ainsi que les streptocoques fécaux parce que ces derniers sont jugés comme de bons indicateurs de contamination fécale.

De toutes les bactéries non-sporogènes, les streptocoques sont **ceux-qui** résistent le mieux aux agents physico-chimiques. De plus, ils survivent plus longtemps dans l'eau que les coliformes.

La DDASS, responsable des zones de baignades aménagées dans tous les départements du territoire, base ses analyses sur ces 3 bactéries. La qualité de l'eau est fixée selon les normes guides et impératives appliquées à ces bactéries (annexe **n°3**) et dont Mr Richardin, **ingénieur-sanitaire** de la DDASS Moselle, pense qu'elles sont satisfaisantes pour prévenir tout risque de santé.

Cette position est controversée, tout comme le choix des indicateurs de troubles gastriques. Toutes les publications européennes et américaines (USA et Canada) [6, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 26, 30] ainsi que des spécialistes de l'épidémiologie comme le professeur Hartemann sont d'accord sur 3 points essentiels :

- les streptocoques fécaux (SF) sont de très bons indicateurs de pollution fécale. Lors de calculs statistiques, la plus forte corrélation entre la morbidité gastro-intestinale et la concentration en germes est obtenue pour les streptocoques fécaux.

- les coliformes fécaux (CF) ne donnent pas de bonne corrélation entre leur taux dans les eaux et les troubles gastro-intestinaux des baigneurs.

- le coliforme fécal *Escherichia coli* "est le meilleur indicateur de contamination fécale par les animaux à sang chaud" [9]; il serait bon de le rechercher en particulier.

"Pour les enfants au-dessus de dix ans, une corrélation positive a été trouvée entre le taux de symptômes gastro-intestinaux et un niveau **d'E. coli** à 200/100 ml. Pour un âge supérieur, la relation entre symptômes et densité d'entérocoques est plus fortement **démontrée**." [30].

Le choix des indicateurs à surveiller pour prévenir les risques de santé s'oriente vers les streptocoques fécaux et *E. coli*.

En ce qui concerne les normes, l'article [14] de la Revue des Sciences de l'Eau précise que pour une concentration de 100 **SF/100** ml (= Norme Guide, annexe **n°3**) on obtient un taux de 12 à 14 % de baigneurs souffrants de troubles gastro-intestinaux.

L'incidence sur la santé est tout de même non négligeable : "les concentrations en SF à partir desquelles le risque chez les baigneurs est significativement supérieur au risque chez les **non-baigneurs** sont sensiblement inférieures aux Normes Guides **actuelles**" [14]. Un taux de sécurité a **peut-être** été trouvé: "**U.S.E.P.A. (United States Environmental Protection Agency)** a proposé que la moyenne d'entérocoques ne devrait pas dépasser **35/100 ml**" [9].

Cette densité de germes assurant la tranquillité des baigneurs est assez éloignée de la **Norme Guide** qui n'est pourtant qu'un objectif à atteindre.

Mr Richardin a cependant fait la remarque suivante : pour un taux de 90 % des baignades aménagées et autorisées de Moselle qui respectent la norme guide de 100 **SF/100** ml, aucun cas de troubles gastrique n'a été déclaré.

Cela ne signifie pourtant pas qu'ils soient inexistantes. Les individus malades ne font pas toujours le rapprochement entre la baignade et la maladie. De plus, ces troubles ne nécessitent que rarement une assistance médicale. **Enfin**, ils ne se déclarent pas "en épidémie" chez tous les sujets qui sont entrés en contact avec l'eau (sinon la DDASS en serait informée), mais atteignent plus sûrement les enfants, vieillards et toutes personnes immuno-déprimées.

Cette pathologie existe **donc** avec certitude, sous forme bénigne ou **aigüe**, à l'insu des autorités sanitaires.

A 2) Techniques d'analyse :

Les techniques d'analyses utilisées s'orientent logiquement sur la recherche des paramètres "classiques" que sont les coliformes et les streptocoques fécaux, ainsi que sur celle d'un pathogène important : ***Salmonella***.

* Indicateurs : coliformes (totaux et fécaux) et streptocoques fécaux.

Les laboratoires recherchent ces indicateurs parce que leur analyse a été normalisée, ceci pour des raisons de répétabilité des résultats.

o Milieux ordinairement utilisés en laboratoires :

La surveillance de la qualité des eaux des zones de baignades aménagées, est basée sur le décret n° 91-980 du 20 septembre 1991 dont les méthodes et normes sont détaillées en annexe n°3.

Le laboratoire de la Faculté de Pharmacie d'~~ILLKIRSCH-GRAPPENSTADEN~~, n'utilise que les méthodes de filtration normalisées :

NF T 90-413	octobre 1985	pour les coliformes totaux et fécaux (en milieu liquide-NPP)
90-414	octobre 1985	pour les coliformes fécaux (par filtration)
90-4 11	octobre 1989	pour les streptocoques fécaux (en milieu liquide-NPP)
90-4 16	octobre 1985	pour les streptocoques fécaux (par filtration)

Le laboratoire LHRSP de Vandoeuvre recherche parfois spécifiquement le coliforme fécal ***E. coli*** : il utilise la méthode NPP avec composé fluorescent permettant une lecture facile.

Cette technique est normalisée (AFNOR T 90-433 de décembre 1992) et repose sur la capacité qu'a ***E. coli*** d'hydrolyser le ~~4-méthyl-umbelliferyl-β-D~~ glucuronidase (MUG) en créant un composé fluorescent. L'ensemencement se fait dans 96 microplaques ou des microcapsules où se trouve un milieu de culture déshydraté contenant du MUG. Les microplaques sont examinées sous ultraviolets (366 nm) à l'obscurité après 36 h minimum d'incubation à 44 °C.

o Milieux utilisés dans les enquêtes épidémiologiques vues dans le cadre de l'étude :

L'article "Une meilleure connaissance des risques sanitaires liés à la baignade", paru dans la Revue des Sciences de l'Eau [14] nous renseigne sur ces points :

- pour les entérocoques, les études de **FUSEPA** utilisent le milieu de Slanetz et **Bartley**.
les études françaises utilisent le milieu D-coccosel (composition en annexe n°2).

- pour les coliformes fécaux, **FUSEPA** emploie les milieux **mC** ou **mFC** qui se retrouvent dans le Standard Methods.

les études françaises utilisent le milieu TTC+tergitol.

- pour ***E. coli***, **FUSEPA** emploie le milieu **mTEC** pour dénombrement sélectif (Standard Methods).

E. coli est recherché spécifiquement : il apporte une meilleure information sur les conséquences que la baignade peut avoir sur la santé, notamment parce qu'il indique la présence d'autres pathogènes Néanmoins, il représente 90 à 95 % des coliformes fécaux, et pour des raisons de temps et de coûts, les autorités sanitaires ont accepté de rechercher les coliformes fécaux en général.

La différence des milieux utilisés est basée sur les caractères biochimiques qui distinguent ***E. coli*** des autres coliformes fécaux :

- production d'uréase : réaction – pour ***E. coli***
réaction + pour ***Klebsiella***

- production d'indole : réaction + pour ***E. coli***
réaction – pour ***Citrobacter***, ***Enterobacter***, ***Klebsiella***

* Recherche du pathogène ***Salmonella*** :

L'article "Isolation of ***Salmonella typhi-murium*** from municipal water" [7] relate un incident épidémiologique ayant lieu à Riverside (Californie) en 1965, qui a mis en cause ***Salmonella typhi-murium***. Cette épidémie a touché près de 16 000 personnes avec une gravité relativement faible qui n'excède que rarement les troubles gastriques. Il apparait, suite à une enquête, que le système de **chloration** était défaillant. Cet épisode fait parti des maladies d'eaux d'alimentation mais illustre la pathogénécité de ***Salmonella*** qui se retrouve dans les eaux de baignade.

Cinq isolations du pathogène ont été faites selon la technique de filtration (détail en annexe n°4)

Un autre article [23], enquêtant sur la survie des bactéries après processus de traitement, propose une technique de numération des salmonelles par la méthode en milieu liquide (détail en annexe n°4).

B) Affections cutanéomuqueuses.

B 1) Argumentation :

* Pathologies :

Ces affections s'inscrivent essentiellement comme infections dermatologiques, présentes parallèlement aux troubles gastriques chez les individus ayant eu **des** contacts avec une eau polluée.

Ces pathologies vont souvent de paire parce que les bactéries responsables ont une origine commune : les germes fécaux, pathogènes ou opportunistes, peuvent pénétrer dans le corps par l'ingestion involontaire d'eau polluée (provoquant une morbidité gastro-intestinale) ou par les lésions de la peau, qu'ils colonisent et infectent.

Pour comparer la fréquence des deux maladies, la Revue des Sciences de l'Eau [14] indique que les pathologies les plus **fréquemment** en cause sont :

- les affections gastro-intestinales (45 % des troubles observés),
- les affections dermatologiques (23 %),
- les affections de la sphère ORL (oto-rhino-laryngologique) à un taux de 22 %
- et les **affections** des yeux (6%).

* Agents pathogènes :

Parmi ces pathologies, les **affections** dermatologiques sont significativement bien corrélées avec la concentration en bactéries *Pseudomonas aeruginosa*. La corrélation est plus faible avec les coliformes et plus faible encore avec *Aeromonas spp.*

Pseudomonas aeruginosa est un organisme potentiellement pathogène; il cause diverses infections dont des éruptions cutanées et est le principal agent d'infection de l'oreille externe (otitis externa) chez les nageurs. Une relation a été établie entre le nombre de *P. aeruginosa* dans l'eau et l'incidence d'infection d'oreilles (McNeill 1985). [9]

Aeromonas est la cause de nombreux types d'infections, dont la diarrhée et l'infection des tissus mous.

La Revue des Sciences de l'Eau confirme : dans l'étude française [12], des corrélations ont été établies entre le taux **d'affections** dermatologiques et les concentrations en coliformes fécaux mais également avec les concentrations en pathogènes opportunistes tel que *Pseudomonas* ou *Aeromonas*. Dans une étude canadienne [9], les staphylocoques totaux présentent la meilleure corrélation avec l'ensemble des pathologies et en particulier les infections dermatologiques (des informations concernant *Staphylococcus* sont trouvables dans le cadre des eaux de piscine, mais pas dans celui des eaux de surface qui nous intéresse).

Il **semblerait** cependant que *P. aeruginosa* soit le germe le plus communément isolé lorsqu'il y a apparition d'otite externe. C'est la conclusion d'une étude faite dans un camp de scouts au bord d'un lac. L'enquête ne précise malheureusement pas le mode d'action du pathogène. •

* Contamination :

- Voie de contamination :

Si la bactérie est présente dans l'eau, une immersion de l'oreille permettra la colonisation ou l'infection du canal auditif, même si le processus exact d'infection reste inconnu.

- Localisation :

La concentration en *P. aeruginosa* dans les excréments humains est faible chez les sujets en santé et le micro-organisme est rarement isolé dans les excréments d'animaux inférieurs.

Il est présent sur les plantes, dans le sol et parfois dans les eaux de ruissellement de surface. La concentration en *P. aeruginosa* dans l'eau dépend aussi du taux de germes des eaux d'égouts.

On a le plus souvent isolé *P. aeruginosa* en faible nombre dans les eaux douces utilisées à des fins récréatives (Santé et Bien-être social, Canada 1990).

La concentration en *P. aeruginosa* sur les plages de baignade dépendent aussi de la densité en baigneurs.

Les espèces *Aeromonas* peuvent être isolées dans les excréments des animaux à sang chaud, les eaux d'égouts, les eaux douces et salées.

L'eau semble être un habitat naturel d'*Aeromonas* et cet organisme ne devrait pas être utilisé comme indicateur de la qualité de l'eau dans les aires de baignades.

B 2) Techniques d'analyse :

Les méthodes utilisées pour rechercher *Pseudomonas* sont normalisées (AFNOR T 90-4 18 et AFNOR T 90-419) alors que la méthode de recherche d'*Aeromonas* est tirée de la littérature. (détail en annexe n°5 et 6)

C) Leptospirose :

C 1) Argumentation :

* Agent pathogène :

leptospire, micro-organisme de la famille des *Spirochaetaeae*, subdivisée en trois genres :

- Leptospira*
- Treponema*
- Borrelia*.

Sur le plan de l'observation, le leptospire est un petit filament hélicoïdal de 10 à 20 μm de long et de 0,1 μm de diamètre, formé de nombreuses spires, très mobiles et très souples. La plupart des souches ont une ou deux extrémités en forme de crochets caractéristiques.

Leptospira possède un organe locomoteur unique; sa respiration est aérobie stricte; elle a une réaction positive aux tests de la **catalase** et de l'oxydase.

* Pathologie :

La leptospirose majeure, la plus grave -**leptospirose** ictéro-hémorragique- est le fait de *Leptospira ictero-hemorrhagiae*. Elle représente 47 % des leptospiroses et peut être parfois mortelle. Elle se caractérise par un début brutal avec fièvre, myalgies et syndrome méningé, l'ictère apparaît, qui dure une dizaine de jours et dont la manifestation coïncide avec une baisse de la température. Les signes rénaux s'accroissent et le taux d'azote dans le sang s'élève ..."**[4]**

* Mode de contamination :

- Voies d'infection :

"La moitié des cas de leptospirose ictéro-hémorragique sont contractés après un bain de rivière, les leptospires pénétrant chez les nageurs par voie muqueuse (conjonctive, bouche, rhinopharynx)."**[4]**

Mais la porte d'entrée la plus **fréquente** est encore la peau, surtout si elle présente des excoriations, après un long séjour dans l'eau. Grâce à leur petit diamètre et à leur organe locomoteur les leptospires pénètrent la peau, les muqueuses et autres tissus de leur hôte. Ils se multiplient dans le sang et, par ce vecteur, atteignent puis colonisent certains organes. Malheureusement, le mode d'action de la virulence est encore mal connu.

- Vecteurs de contamination :

"Dans le cas de la leptospirose ictéro-hémorragique, le rat héberge et dissémine les leptospires. Il les élimine par les urines et se transmettent à l'homme par la terre, la vase **et surtout l'eau.**"**[4]** Les risques d'infection sont donc plus importants aux abords des étendues d'eau à cause des rejets organiques de la faune des berges.

Une épidémie de leptospirose a eu lieu en URSS en 1967 : la population locale se baignait dans un canal dont l'eau avait été contaminée par des rats musqués.

- **Localisation** :

Une enquête menée au bord d'un lac **[18]** montre que pour la période de mai à septembre, 100% des échantillons prélevés donnent une réponse positive à la recherche des leptospires. Cette période se caractérise par une température de l'eau de 23-24°C et un pH plus alcalin (pH: 8,45-8,91) que pendant le reste de l'année. Par contre, la période de novembre à avril donne des pourcentages d'échantillons positifs allant de 0 à 8 % (en janvier-février: 0 % de positif à cause d'une température d'eau de 1°C).

Il est à noter que la distance du prélèvement à la berge est importante. En effet, selon la même enquête, 100% des prélèvements sont positifs pour une distance inférieure à 5 mètres; si elle est supérieure, on ne trouve plus de traces de leptospires [18]. En effet, les rejets fécaux de la faune des berges constituent la principale source de pollution, ce qui explique le pourcentage d'échantillons positifs à une faible distance du rivage.

Il faut en plus distinguer les différents régimes d'écoulement de l'eau. Pour la même enquête : dans un ruisseau, 100 % des échantillons sont positifs quelque soit la saison; dans un lac, on obtient 65 % d'échantillons positifs sur la totalité d'une année de prélèvement. Dans le ruisseau, l'eau s'écoule à température supérieure à 4,5°C pendant les mois les plus froids et facilite la mise en suspension des particules organiques par mélange de l'eau et de la vase. Par contre, l'eau du lac est stagnante, sa température descend jusqu'à 1°C et les rejets de la faune mélangés à la vase n'ont qu'une faible surface de contact avec l'eau.

L'état physique de l'eau ainsi que les paramètres extérieurs exercés expliquent les différences de qualité bactériologique d'échantillons apparemment similaires.

- Sensibilité :

Le danger de leptospiroses n'est pas négligeable car les baigneurs fréquentent assidument les zones **cotières** de faible profondeur (en particulier les enfants) et sont plus exposés à l'agent infectieux. Le risque est encore plus important chez les enfants, personnes **agées** et **immuno-déprimées** à cause de leur sensibilité aux pathogènes.

La leptospirose est en recrudescence ces deux dernières années chez les personnes non exposées professionnellement. Elle était fréquente depuis longtemps dans les métiers à risque : agriculteurs, agents de voirie, métiers en milieu humide fréquenté par les rats.

Étant donné que les leptospiroses sont des maladies immunisantes, l'organisme infecté répond par la production **d'anti-corps**. Un vaccin humain **inactivé anti-ictéro-hemorragiae** a été proposé. Pour enrayer la maladie, les égouttiers sont vaccinés obligatoirement depuis 1974.

Un cas de leptospirose rencontré par le professeur Hartemann était le fait du contact direct entre un individu et l'eau de la Meurthe par retournement de l'embarcation lors d'une sortie en **canoé**. La personne était à l'origine en bonne santé et pleine forme physique. Elle a certainement absorbé de l'eau, puis étant malade, s'est vue transportée à l'hôpital. Il a été vérifié que sur la Meurthe, l'aire **d'entraînement** des **canoés** se situe en aval d'une zone de rejet de station d'épuration et est ainsi exposée à une pollution régulière et importante.

* Survie :

Les leptospires se maintiennent facilement dans le milieu extérieur souillé (eau et sols boueux) à pH légèrement alcalin, de salinité nulle ou faible et en absence d'exposition aux ultraviolet. Le leptospire, sensible à la **dessiccation** et aux rayons solaires, peut survivre plusieurs semaines en saison chaude dans les rivières légèrement alcalines et ombragées. Il est détruit par un traitement thermique de 5 minutes à 50 °C (ces valeurs sont communes à tous les articles).

* **Traitement** :

La pénicilline G est l'antibiotique le plus souvent conseillé pour le traitement de la leptospirose. Les doses prescrites par les spécialistes sont sensiblement différentes les unes des autres mais peuvent être regroupées dans une fourchette de 5 à 10 millions **d'UI** par jour pendant au moins 10 jours. Le malade doit absorber de la nourriture glucidique et être réhydraté.

C 2) Techniques d'analyses :

Les leptospires ne sont pas colorables par les méthodes bactériologiques usuelles; "il faut utiliser la coloration de Giemsa ou la technique d'imprégnation argentique.

Les leptospires ne peuvent pas être cultivées sur les milieux utilisés en bactériologie courante. Ils exigent un facteur de croissance présent dans le sang ou le sérum." [4]
Ils se développent en milieux liquides ou **semi-solides**. Ces milieux sont d'autant plus variés qu'il n'existe pas de techniques normalisées. Néanmoins, tous contiennent du sang, du sérum ou de l'albumine, ainsi que des antibiotiques spécifiques. En effet, le leptospire ayant besoin d'un milieu enrichi au sang, il entre en compétition avec d'autres **micro-organismes** qui tendent à "étouffer" sa croissance.

C'est pourquoi avant tout ensemencement il faut séparer les leptospires des autres bactéries ou inhiber la croissance de celles-ci pour permettre le développement des leptospires. Les milieux varient en fonction des antibiotiques qu'ils contiennent.

* Séparation physique de *Leptospira* des autres bactéries :

Cette opération de séparation nécessite une **centrifugation** ou une filtration ou une combinaison des deux. L'exemple de préparation d'échantillon proposé dans l'annexe n° fait appel aux deux techniques.

Par contre le LHRSP, dans son protocole d'analyse des leptospires, utilise la filtration en employant trois sortes de filtres différents (détail en annexe n°7).

La centrifugation est nécessaire lors de l'analyse d'eaux chargées en sédiments. Ces particules, plus lourdes que des micro-organismes, s'accumulent alors au fond du tube et il ne reste plus qu'à soutirer la phase liquide pour récupérer les bactéries.

Filtrer directement une eau chargée risque de colmater le filtre de même que **centrifuger** une eau claire est inutile dans les analyses ordinaires.

* Séparation par les caractères biochimiques :

Concernant les inhibiteurs, la plupart des milieux mentionnés dans la littérature ainsi que celui utilisé en pratique par le LHRSP contiennent du **5-fluoro-uracil (5-FU)** qui limite les contaminations.

L.H. Turner explique ce fait ainsi : "**des bases de purines** sont incorporées avec les acides nucléiques des leptospires, alors que les bases de pyrimidines n'y sont pas. Le **5-FU** (l'uracil est une base de pyrimidine) est mortel aux micro-organismes sauf aux leptospires." [18]

Le **5-FU** joue un rôle presque indispensable, ce qui est montré dans le rapport de l'enquête sur la répartition des leptospires dans l'eau [18]:

- sur un milieu sans **5-FU** : **40 %** des échantillons sont positifs à la recherche des leptospires.
- sur un milieu avec **5-FU** : **100 %** des échantillons sont positifs à la recherche des leptospires.

* Milieux les plus **fréquemment** utilisés **on peut** trouver les **milieux** suivant :

- milieu de Reiter et Ramme [14]
- milieux de Ellinghauser (3 milieux différents) [23]
- milieu de Johnson et Harris. [24]
- milieu de Fletcher (Standard Methods p. 9-96)
- milieu de Stuart (utilisé au LHRSP) (Standard Methods p.9-96)

Les milieux et techniques d'analyses sont détaillées dans l'annexe n°7.

* Lecture :

Les leptospires ne sont pas visibles au microscope optique en lumière blanche en raison de leur finesse, c'est pourquoi on les observe sur fond noir et éventuellement en contraste de phase.

Etant donné que les leptospiroses sont des maladies immunisantes, l'organisme répond par la production d'anticorps. On peut donc détecter la présence de leptospires par la recherche des complexes antigènes-anticorps.

△

* Leptospires pathogènes et saprophytes :

Tous les leptospires ne sont pas pathogènes **et** la découverte de ***Leptospira*** n'induit pas obligatoirement une pathogénécité. Pour différencier un leptospire pathogène d'un leptospire saprophyte il suffit de faire un test de croissance à 13 °C et en présence de **8-azaguanine** avec des souches témoins de référence sur un milieu Tween-albumine ou EMJH (Ellinghausen **McCullough** modifié par Johnson et Harris) à 30 °C. [24]

Le tableau ci-dessous montre les résultats des saprophytes et des pathogènes aux tests de la température et de l'inhibiteur :

Paramètres	leptospires pathogènes	leptospires saprophytes
virulence	+	=
culture à 13 °C	=	+
résistance à la 8-azaguanine	=	+

D) Les pathologies **amibiennes**.

* Agents pathogènes :

Les amibes sont des protozoaires dont la classification n'est pas définitive.

Les amibes partiellement pathogènes pour l'homme appartiennent à la famille des Vahlkampfiidae (*Naegleria spp*) ou des Acanthamoebidae (*Acanthamoeba spp*).

Les amibes libres du **genre *Naegleria* ou *Acanthamoeba*** sont considérées par les cliniciens et les biologistes comme des micro-organismes opportunistes, rencontrés dans des infections comme certaines méningo-encéphalites.

Les amibes pathogènes se présentent sous deux aspects [22]:

- grande amibe hématophage de 20 à 30 μm de diamètre et très mobile. C'est une amibe tissulaire au pouvoir destructeur, source des accidents cliniques.

- le kyste dysentérique : ne dépassant pas 14-15 μm , contenant 1 à 4 noyaux, représente la résistance et la transmission du parasite. De lui seul provient la multiplication des amibes, puisqu'il résiste aux conditions de survie extérieures alors que les amibes ne le peuvent pas.

D 1) La méningo-encéphalite **amibienne** primitive (MEAP) .

* Agent pathogène :

Les espèces responsables de méningo-encéphalite sont plusieurs parmi les Acanthamibes mais une seule ***Naegleria (N. fowleri)* est mise** en cause. ***N. fowleri est*** l'espèce la plus pathogène.

Les essais de cultures à différentes températures montrent que plusieurs espèces de ***Naegleria*** peuvent se multiplier à température supérieure à 40 °C, tandis que d'autres se développent à 22-35 °C. Les espèces thermotolérantes sont regardées comme potentiellement pathogènes.

* Pathologie :

La MEAP est une atteinte **aigüe**, fulminante, rapidement fatale, atteignant les enfants et les jeunes adultes.

"***N. fowleri*** étant hautement pathogène, l'évolution se fait rapidement vers l'encéphalite avec coma puis mort qui survient environ une semaine après apparition des premiers symptômes."

[14]

"La **MEAP** se manifeste brutalement avec de violentes douleurs abdominales, **constrictives** et intermittentes. Les selles se multiplient, 10 à 20 par jour en moyenne, faites de glaires et de sang. La température corporelle s'élève modérément jusqu'à atteindre 40 °C. Enfin apparaissent des nausées, de violents vomissements et des signes d'irritations méningées." [20]

* Mode de contamination :

- Voie d'infection :

Les **amibes** libres pathogènes responsables de MEAP peuvent pénétrer par voie nasale par inhalation de poussières ou aspiration d'eau contaminée par des trophozoïtes ou des kystes. L'inhalation ou l'aspiration d'aérosols contenant des kystes est une autre source **possible** d'**infection**.

L'amibe hématophage peut franchir la paroi colique et passer dans le sang. Par ce vecteur, elle colonise tous les organes puis tout le corps. La période d'incubation de l'amibe peut varier de 3 à 15 jours.

- Sensibilité :

Tous les cas décrits concernent les sujets jeunes et en bonne santé. On constate que les atteintes sont individuelles. D'ailleurs en Belgique, frère et soeur ont fréquenté la même piscine, le même jour : seul le frère a développé une **MEAP**. [22]

Les travaux de Capron et **Buguet** (1968) ainsi que les observations de Damian (1964) tendent à établir qu'un parasite ne peut se développer chez un nouvel hôte que s'il y rencontre des groupes antigéniques communs. Ainsi, l'amibe au contact de bactéries de provenance humaine, de débris cellulaires humains, acquiert des **constituants** nouveaux qui lui donne peu à peu le pouvoir de s'adapter à l'homme.

- Localisation :

N. fowleri, l'espèce la plus pathogène, a fréquemment été isolée dans des eaux thermiquement polluées et des eaux usées. On la trouve dans le sol, les tours de refroidissement, les piscines et chez l'homme, lors de prélèvements nasaux et pharyngés.

Le développement de certaines technologies (industries métallurgiques, centrales thermiques) tend à créer des zones ou lagunes d'eaux réchauffées propices à la sélection de micro-organismes dangereux. Dans de nombreuses industries, en particulier les centrales électriques avec refroidissement en circuit fermé, l'environnement chaud et humide des tours de réfrigération peut conduire à une multiplication microbienne importante lorsque les matières organiques sont en quantité suffisante. [22]

Dans le monde entier, la présence de *N. fowleri* a été signalée dans les eaux réchauffées naturellement ou artificiellement. Ainsi, aux Etats-Unis, dans les eaux réchauffées par les centrales électriques et nucléaires, du nord, 50 % des échantillons contiennent des *Naegleria* thermophiles, dont 20 % sont des pathogènes.

En France, les premières souches de *N. fowleri* ont été isolées dans une lagune de refroidissement d'un **effluent** de centrale électrique près de Metz [13]. Une équipe de chercheurs de Lille a isolé *N. fowleri* des eaux de la Moselle. Il faut préciser que plusieurs centrales (électriques ou nucléaire) jalonnent le cours de la Moselle entre Metz et Thionville. L'eau réchauffée étant un facteur important dans la prolifération des amibes pathogènes, les écarts de température ont été mesurés entre l'eau des **effluents** qui entre et celle qui sort d'une centrale : la différence est de 2 °C en moyenne mais peut atteindre 7 °C.

Quant à la concentration de l'eau de la Moselle en *N. fowleri*, elle trouve son maximum à 20 germes /100 l, ce qui amène à penser que les amibes pathogènes ne sont pas abondantes dans la rivière. Comparativement, des recherches faites dans l'eau de la Seine et de la Loire n'ont pas donné de résultats positifs.

- Répartition :

Sur plus de 140 cas mondiaux rapportés au 1 juillet 1989, 63 cas sont américains (USA). Les lacs de Floride ont été la cause de 7 cas de MEAP. .

Une étude nous renseigne sur la répartition des amibes pathogènes en Floride. "La distribution du pathogène *Naegleria fowleri* dans les lacs de Floride est incompréhensible, son mode **d'infection** l'est tout autant. La Floride compte plus de 500 lacs. Ils sont le lieu de loisirs de millions d'individus. Le Département des Ressources Naturelles estime à plus de 1 milliard le nombre de personnes exposées en 14 ans. Mais il y a eu 7 cas en 14 années !" [3 1]

Dans cette étude, on trouve l'exemple d'un lac pour lequel 88,9 % des échantillons **prélevés** sont positifs à la détection de *Naegleria* pathogènes (c'est la plus forte concentration décelée).

A exactement 305 mètres de distance de ce lac se situe un autre lac pour lequel 0 % des échantillons sont positifs, c'est à dire qu'ils ne contiennent pas de *Naegleria* pathogènes.



- Sensibilité :

Tous les cas décrits concernent les sujets jeunes et en bonne santé. On constate que les atteintes sont individuelles. D'ailleurs en Belgique, frère et soeur ont fréquenté la même piscine, le même jour : seul le frère a développé une **MEAP**. [22]

Les travaux de Capron et **Buguet** (1968) ainsi que les observations de Damian (1964) tendent à établir qu'un parasite ne peut se développer chez un nouvel hôte que s'il y rencontre des groupes antigéniques communs. Ainsi, l'amibe au contact de bactéries de provenance humaine, de débris cellulaires humains, acquiert des **constituants** nouveaux qui lui donne peu à peu le pouvoir de s'adapter à l'homme.

- Localisation :

N. fowlerti, l'espèce la plus pathogène, a fréquemment été isolée dans des eaux thermiquement polluées et des eaux usées. On la trouve dans le sol, les tours de refroidissement, les piscines et chez l'homme, lors de prélèvements nasaux et pharyngés.

Le développement de certaines technologies (industries métallurgiques, centrales thermiques) tend à créer des zones ou lagunes d'eaux réchauffées propices à la sélection de micro-organismes dangereux. Dans de nombreuses industries, en particulier les centrales électriques avec refroidissement en circuit fermé, l'environnement chaud et humide des tours de réfrigération peut conduire à une multiplication microbienne importante lorsque les matières organiques sont en quantité suffisante. [22]

Dans le monde entier, la présence de *N. fowlerti* a été signalée dans les eaux réchauffées naturellement ou artificiellement. Ainsi, aux Etats-Unis, dans les eaux réchauffées par les centrales électriques et nucléaires, du nord, 50 % des échantillons contiennent des **Naegleria** thermophiles, dont 20 % sont des pathogènes.

En France, les premières souches de *N. fowlerti* ont été isolées dans une lagune de refroidissement d'un **effluent** de centrale électrique près de **Metz** [13]. Une équipe de chercheurs de Lille a isolé *N. fowlerti* des eaux de la Moselle. Il faut préciser que plusieurs centrales (électriques ou nucléaire) jalonnent le cours de la Moselle entre Metz et Thionville. L'eau réchauffée étant un facteur important dans la prolifération des amibes pathogènes, les écarts de température ont été mesurés entre l'eau des **effluents** qui entre et celle qui sort d'une centrale : la différence est de 2 °C en moyenne mais peut atteindre 7 °C.

Quant à la concentration de l'eau de la Moselle en *N. fowlerti*, elle trouve son maximum à 20 germes /1000 l, ce qui amène à penser que les amibes pathogènes ne sont pas abondantes dans la rivière. Comparativement, des recherches faites dans l'eau de la Seine et de la Loire n'ont pas donné de résultats positifs.

- Répartition :

Sur plus de 140 cas mondiaux rapportés au 1 juillet 1989, 63 cas sont américains (USA). Les lacs de Floride ont été la cause de 7 cas de MEAP. .

Une étude nous renseigne sur la répartition des amibes pathogènes en Floride. "La distribution du pathogène **Naegleria fowlerti** dans les lacs de Floride est incompréhensible, son mode d'infection l'est tout autant. La Floride compte plus de 500 lacs. Ils sont le lieu de loisirs de millions d'individus. Le Département des Ressources Naturelles estime à plus de 1 milliard le nombre de personnes exposées en 14 ans. Mais il y a eu 7 cas en 14 années !" [31]

Dans cette étude, on trouve l'exemple d'un lac pour lequel 88,9 % des échantillons prélevés sont positifs à la détection de **Naegleria** pathogènes (c'est la plus forte concentration décelée).

A exactement 305 mètres de distance de ce lac se situe un autre lac pour lequel 0 % des échantillons sont positifs, c'est à dire qu'ils ne contiennent pas de **Naegleria** pathogènes.

Mais quel est le vecteur d'infection ? Les lacs sont-ils toujours contaminés à la même concentration d'une année à la suivante ? Beaucoup de questions mais peu de réponses. On ignore entièrement pourquoi ces amibes présentes partout dans la terre humide et les eaux stagnantes peuvent se développer dans certaines circonstances et deviennent pathogènes, surtout chez les adolescents.

D 2) L'encéphalite amibienne granulomateuse (EAG)

L'agent causal est *Acanthamoeba* spp.

* Pathologie :

" **L'EAG** se présente sous la forme insidieuse d'altération neurologiques chez des sujets **affaiblis**, débilisés ou **immuno** déprimés. L'invasion du liquide céphalo-rachidien est présumée secondaire à une invasion pulmonaire et la mort survient après une évolution chronique.

Signes cliniques : l'altération mentale demeure le signe essentiel durant les atteintes par *Acanthamoeba*. Il existe parfois une paralysie des nerfs **craniens**.

Généralement, la cause du décès est une broncho-pneumonie. Des ulcérations chroniques de la peau ont été rapportées chez les sujets morts **d'AEG."** [22]

* Mode de contamination :

- Voie d'infection : les Acanthamibes pathogènes peuvent gagner le **tractus** respiratoire par inhalation d'air, d'aérosols ou de poussières contenant des kystes.

- Sensibilité : il apparaît que les sujets immuno-déprimés sont les plus vulnérables à une atteinte par *Acanthamoeba*. En ce qui concerne le développement du parasite sur l'hôte, le processus est identique à celui de *Naegleria*.

- Localisation : dans le milieu extérieur, *Acanthamoeba* se retrouve sur les mêmes substances que *Naegleria*. Cependant, chez l'homme, *Acanthamoeba* peut être isolée des selles et des organes des sujets malades.

D 3) Considérations générales :

Traitement : Les médicaments ne peuvent intervenir que s'ils sont administrés avant l'envahissement **amibien** : en effet, "l'examen microscopique montre de vastes zones de nécroses avec infiltration d'amibes, qui indique à quel point le processus de destruction est rapide." [20] Jusqu'alors, il apparaît que seul l'amphotéricine B a une action. Ce pouvoir a été établi expérimentalement in vivo chez la souris.

D 4) Techniques d'analyse (détails en annexe n°8).

* Préparation de l'échantillon :

Le **volume** d'eau de l'échantillonnage doit être assez important pour s'assurer de la concentration en amibes pathogènes. Si la recherche en amibes dans 1 litre d'eau se révèle négative, il ne faut pas conclure à la l'absence totale dans tout le cours d'eau. Un prélèvement de gros volume (50 ou 100 litres) est plus représentatif qu'un petit volume !

L'inconvénient du gros volume est que d'autres bactéries en concentration importante seront prélevées : les coliformes totaux peuvent atteindre un seuil de 10^3 ou 10^4 **100** ml, ce qui donne un nombre démesuré de germes dans 100 litres.

Il y a donc obligation de procéder à une séparation des bactéries et-des amibes : les **deux** techniques les plus utilisées sont la filtration et la centrifugation

* Milieux utilisés :

Tous les milieux de mise en culture des amibes possèdent un point commun : ils contiennent une suspension de bactéries, qui serviront de sources nutritives aux amibes. Les exemples trouvés dans la littérature citent *Enterobacter aerogenes* et *Escherichia coli* comme base nutritive. La bactérie de la solution ajoutée au milieu est tuée thermiquement et la gélose est non-nutritive pour que les germes ne se développent pas.

* Lecture-Observation :
(détail en annexe n°8)

E) Choléra

E 1) Argumentation :

Maladie transmissible, le choléra est strictement limité à l'espèce humaine. Originaire d'Asie, le choléra a **connu** plusieurs extensions (ou pandémies) meurtrières en Europe, Amérique et **Afrique** à partir du **19^{ème}** siècle.

Depuis 1960, la maladie a pris une allure bactériologique nouvelle, au point que l'on doit opposer désormais un **choléra** "actuel" (**el tor**) au choléra asiatique "**classique**" (**cholerae**). En effet, une **7^{ème}** pandémie déclarée en Indonésie en 1961 met en cause le sérotype **el tor**; elle a atteint le Pérou en 1991 et continue sa propagation en Amérique du sud.

* Agent pathogène : [17]

Le choléra est provoqué par des bactéries du genre **Vibrio**. Le genre **Vibrio** comprend plus de 30 espèces qui sont toutes d'habitat aquatique. L'espèce la plus importante est **Vibrio cholerae** qui peut être divisée en trois biotopes : **cholerae**, **el tor**, **albansis**. Le biotope **albansis** n'a qu'un intérêt nomenclatural.

L'étude antigénique des souches de **K. cholerae** a montré que toutes les souches épidémiques possèdent le même antigène O désigné O: 1. Le groupe O: 1 est lui-même subdivisé en trois **sérotypes** sur la base de trois facteurs antigéniques : A, B, C; on les appelle Ogawa (AB), Inaba (AC), Hikojima (**ABC**). Parmi les souches de **K. cholerae O: 1**, certaines sont pathogènes parce qu'elles élaborent une entérotoxine, d'autres ne le sont pas.

* Pathologie :

Dans les cas typiques, le début est brutal, **frappant** subitement des sujets en parfaite santé apparente.

Le tableau est dominé par l'émission de selles accompagnant des douleurs gastriques et **non-coliques**; impérieuses, exténuantes, les selles peuvent atteindre le nombre de soixante à cent par jour et prenant rapidement un aspect aqueux, incolore, avec des grains blanchâtres analogues à des grains de riz.

Les vomissements, également impérieux, apparus aussi dès le premier jour prennent vite le même aspect aqueux et **riziforme**. [3]

Diarrhées et vomissements, dont le volume peut atteindre plusieurs litres, entraînent rapidement une soif inextinguible (toute ingestion de liquide provoque une recrudescence des vomissements) et un état de déshydratation aiguë avec raréfaction des urines ou même anurie totale; alors que la température centrale du corps reste à 37 °C, la température des extrémités peut descendre **au-dessous** de 35 °C.

La déshydratation entraîne un amaigrissement d'une extraordinaire rapidité. En absence d'un traitement d'urgence, la mort survient par collapsus cardiaque deux à trois jours après les **premiers signes** cliniques; le malade demeure lucide malgré une angoisse croissante et des crampes extrêmement douloureuses causées par la déficience des muscles en électrolytes.

A côté de cet aspect habituel, il existe des formes mortelles en quelques heures sans diarrhées ni vomissements.

* Mode de contamination :

- Voie d'infection :

La transmission du choléra se fait toujours par voie orale, soit directement par contact avec les selles d'un malade ou d'un porteur sain de vibrions, soit indirectement par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés.

- Vecteurs :

L'homme est infectant par ses selles dès la période d'incubation, puis pendant la maladie, et peut le rester plus ou moins longtemps après la guérison.

La transmission indirecte par les linges, surtout lorsqu'ils restent humides, par les fruits ou légumes consommés crus et lavés à l'eau souillée, par des mouches dont les pattes peuvent transporter les vibrions des selles aux aliments (lait, pain, fruits . . .) est fonction de la possibilité de survie de ces vibrions en dehors de l'organisme humain.

- Dose infectante :

Elle est estimée entre 10^6 et 10^8 organismes et peut être modifiée par l'acidité de l'estomac et le véhicule de transmission.

- Localisation :

L'origine hydrique domine l'épidémiologie du choléra, expliquant son endémicité dans les régions deltaïques aux populations entassées ne disposant pas d'eau épurée mais d'eau chargée de matières organiques assurant la survie des vibrions et régulièrement réensemencées par les malades (déjections, vomissements, linges).

Le rôle des facteurs météorologiques dans le déclenchement ou la limitation des épidémies a été bien démontrée en Inde où les poussées épidémiques nécessitent un degré élevé d'humidité atmosphérique et un terrain favorisé par l'absence de choléra pendant deux ans.

* Survie :

- chez l'homme :

Jusqu'en 1960, il était admis que la présence du vibron cholérique chez les porteurs sains ne dépassait pas 30 à 40 jours; actuellement, nombre d'observations font état de délais pouvant atteindre plusieurs mois et aussi, dans un cas, 3 ans. [10]

- dans le milieu extérieur :

Dans une eau claire et peu polluée de laboratoire, les vibrions ne survivent pas plus de 13 jours.

Dans une eau contenant une grande concentration de bactéries (eau de surface), le temps de survie n'excède pas 1 ou 2 jours.

Dans une eau filtrée stérile, le temps de survie atteint 17 jours à la température ambiante et 42 jours à 5 à 10 °C.

La survie est affectée à pH acide et par le froid : la marche vers l'Est du vibron *el tor* fut stoppée en 1965 par l'hiver iranien.

* Traitement :

La rapidité de l'évolution du choléra, de la déshydratation et de la déminéralisation, de la menace d'acidose et d'urémie fait que le traitement doit être entrepris d'extrême urgence afin de compenser au plus tôt et très exactement les pertes en eau et en électrolytes des malades.

Il s'agit d'une lutte de vitesse fondée sur l'administration par voie intraveineuse ou rectale de solutions diverses (salées, **glucosées**, bicarbonées) dont la composition et le rythme seront commandés par l'observation clinique des symptômes.

En association à ce traitement de base, certains antibiotiques (streptomycine, kanamycine ...) ont contribué à transformer le pronostic du choléra, à condition que le traitement de base demeure la restauration hydro-électrolytique.

Vaccination :

Si les vaccins préparés avec ***K. cholerae*** protègent contre ***K. cholerae*** et contre ***V. el tor***, il n'est pas encore démontré que les vaccins préparés avec ***K. el tor*** et actif-contre ce germe protège également contre ***V. cholerae***.

Dans tous les cas, la protection conférée par la vaccination ne dépasse guère 4 à 6 mois. La revaccination est donc nécessaire en cas de séjour prolongé en zone d'endémie cholérique. [3]

E 2) Techniques d'analyses : (détails en annexe n°9)

Les techniques d'analyses des vibrions diffèrent peu entre elles. Les protocoles d'analyses du laboratoire d'hydrologie ULP à Illkirch-Graffenstaden ou du LHRSP de Vandoeuvre suivent les mêmes lignes de recherche :

- concentration des germes par filtration sur membrane.
- enrichissement de la culture dans un bouillon à pH alcalin puis incubation.
- isolement sur un milieu TCBS puis incubation.
- lecture des isolements.
- identification-confirimation.

Conclusion

L'étude de ces enquêtes épidémiologiques révèle le mode d'action, les vecteurs d'infection ou la localisation de certains germes responsables de pathologies. La compilation de ces données nous renseigne sur la présence ou l'absence de danger sanitaire de points d'eau et l'attitude à adopter vis-à-vis de ces lieux lorsqu'ils servent un usage récréatif

Il apparaît après étude qu'il est quasiment impossible d'assurer aux baigneurs une sécurité totale pour la santé. Cette sécurité totale signifie 0 % d'incidence. Or d'autres pathologies peuvent se déclarer, sans rapport avec la baignade.

Il est néanmoins possible, comme le fait la DDASS, de contrôler et d'autoriser certaines zones aquatiques. On peut aussi limiter les accidents sanitaires en interdisant des activités telles que le canoé, le triathlon ou les joutes et autres jeux nautiques dans les endroits pollués.

Pour dresser une liste des points dont il faut se méfier, des caractères évidents s'imposent.

Il faut éviter :

- les eaux polluées ou en aval d'une zone de rejet de station d'épuration
- les eaux chaudes, dormantes et ombragées
- les périmètres où la vase est en suspension
- les abords fréquentés par des rongeurs ou des troupeaux d'animaux.

Les germes responsables des pathologies sont directement ou indirectement recherchés mais cette recherche ne s'impose pas pour tous les micro-organismes.

La présence des germes pathogènes provenant des matières fécales (comme *Shigella* ou d'autres entérobactéries) est reconnue à travers l'analyse d'indicateurs tels que les coliformes ou les streptocoques fécaux.

Il n'est pas nécessaire non plus de vouloir isoler des amibes pathogènes : les pathologies qu'elles provoquent sont extrêmement rares et leur densité dans l'eau est aussi faible.

Par contre, les leptospires sont dignes d'intérêt puisqu'ils sont présents dans les cours d'eau et ils provoquent de graves maladies.

En ce qui concerne la recherche des vibrions cholériques, elle serait nécessaire dans les points d'eau des pays en voie de développement car les individus malades y disséminent le germe dans l'eau; dans les pays développés, les réseaux d'assainissement réduisent le risque de tomber malade mais il faut cependant se garder d'entrer en contact avec une eau d'aspect visiblement insalubre.

Les techniques de recherche de ces germes incluent souvent des centrifugations ou plusieurs filtrations successives du fait de la faible teneur de l'eau en organismes. Les méthodes décrites dans les rapports ont été affinées pour les besoins des enquêtes et sont, à mon avis, très au point.

L'objectif est maintenant d'essayer, non pas de "nettoyer" les cours d'eau, mais bien de chercher et de combattre les causes de pollution.

Poursuites

Il est nécessaire de préciser avant tout que l'eau n'est pas le seul élément responsable des pathologies perçues dans des zones aquatiques à usages récréatifs.

Le ministère de la santé est préoccupé par la salubrité des plages (pelouses ou sables) qui environnent l'eau. En effet, le sable des plages a été accusé d'être à l'origine de problèmes sanitaires, notamment dermatologiques. Les débris laissés sur le sable, les animaux domestiques errants et l'environnement sanitaire (douches, toilettes) déterminent la salubrité de la plage.

Il n'est, pour l'instant, pas question d'envisager des opérations de décontamination des sables.

Cependant, il serait intéressant lors d'études épidémiologiques à venir, de surveiller non seulement la qualité de l'eau de baignade mais aussi celle des abords.

Quant à cette étude, il est regrettable qu'elle ne soit que théorique mais le temps manquerait à la mettre en pratique. Cela peut faire l'objet de travaux postérieurs tels que :

- **échantillonner** et analyser l'eau de différents points en lac, rivières, zones de baignades autorisées et non autorisées afin d'y rechercher les germes fécaux pathogènes ou les organismes dangereux tels que les leptospires.
- faire une recherche sur des techniques d'analyse simples et peu coûteuses.
- faire une recherche sur l'amélioration des techniques d'analyse en fonction de la provenance de l'eau, c'est à dire qu'elle soit chargée ou pas en sédiments.
- organiser une enquête sur les individus fréquentant les zones de baignades autorisées afin de savoir s'il y a existence de troubles liés à la baignade.

ANNEXES

	<u>Pages</u>
ANNEXE N°1	Pathologies hydriques..... 27
ANNEXE N°2	Techniques d'analyse des indicateurs de contamination fécale : * Critères de choix d'un bon indicateur Composition du milieu D Coccozel Technique d'analyse de IWL P..... 28
ANNEXE N°3-1	*Méthodes de référence pour l'analyse des eaux de baignade..... 29 *Normes guides et impératives de l'eau des zones de baignade autorisée..... 30
ANNEXE N°4	Techniques d'analyse de <i>Salmonella</i> 31
ANNEXE N°5	Techniques d'analyse de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 33
ANNEXE N°6	Technique d'analyse d' <i>Aeromonas</i> 34
ANNEXE N°7	Techniques d'analyse des leptospires..... 35
ANNEXE N°8	Techniques d'analyse des amibes pathogènes..... 38
ANNEXE N°9	Techniques d'analyse de <i>Vibrio cholerae</i> 40

ANNEXE N°81 : PATHOLOGIES HYDRIQUES :

Infections humaines transmises par l'eau

	Agent	Origine .. -- la plus fréquente
PATHOLOGIES DIGESTIVES:		
Fièvres typhoïdes	<i>Salmonella typhi</i> (para A - para B)	Coquillages Eaux
Gastro-entérites	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i> sp. <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Giardia</i> <i>Rotavirus</i>	Eaux Baignades Eaux Eaux Eaux
Choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	Eaux. Coquillages
Hépatite A	Virus	Eaux. Coquillages
PATHOLOGIES RESPIRATOIRES:		
Legionellose	<i>Legionella</i>	Aérosols
Affections O.R.L.	Réovirus	Baignades
LEPTOSPIROSE	Leptospires	Baignades
MENINGO-ENCEPHALITES AMBIENNES:		
(MEAP)	<i>Naegleria</i> <i>Acanthamoeba</i>	Eaux réchauffées
DIVERS:		
Candidoses	<i>Candida albicans</i>	Baignades (mer)
Suppurations bactériennes (cutanéomuqueuses)	<i>Staphylococcus</i> <i>Pseudomonas</i>	Baignades



ANNEXE N°82 : Analyse des indicateurs de contamination fécale.

* Critères de qualité d'un bon indicateur.

L'indicateur idéal se caractérise par les critères suivants :

1. utilisable dans tout type d'eau,
2. présent dans les eaux d'égout et les eaux polluées lorsque des organismes pathogènes y sont présents,
3. présente une concentration en corrélation avec le degré de pollution,
4. présent en plus grand nombre que les organismes pathogènes,
5. ne prolifère pas en milieu aquatique,
6. survit plus longtemps dans l'environnement que les organismes pathogènes,
7. absent des eaux non-polluées,
8. facile à détecter par des méthodes de laboratoire simples et précises,
9. inoffensifs pour les personnes et les animaux.

* Mr Larbaigt, chargé de mission à l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse et auteur de l'article [] paru dans la Revue des Sciences de l'Eau, m'a renseigné sur la composition du milieu D-coccosel :

Bio-trypticase	1770 g	Citrate de sodium	190 g
Biothione	370 g	Esculine	10g
Extrait de levure	590 g	Citrate de fer NH_4	075 g
Bile de boeuf	10,0 g	Acide de sodium	0,25 g
Chlorure de sodium	530 g	Gélose	1375 g

* Techniques d'analyse des indicateurs de contamination fécale par le laboratoire d'hyrologie ULP de la Faculté de Pharmacie **d'Illkirsch** : (toutes les méthodes utilisées sont normalisées)

100 ml d'échantillon sont passés sur micro-filtre **0,45 μm** (Millipore) Les micro-filtres sont posés sur les milieux suivants :

- TTC + tergito17 :	pour les coliformes totaux	à 37°C	} pendant 24 h
	pour les coliformes fécaux	à 44°C	}
§ Slanetz et Bartley :	pour les streptocoques fécaux	à 37°C	pendant 48 h

(le labo recherche aussi les ***Staphylococcus aureus*** sur Chapman pour les analyses d'eau de piscines)

Les pages suivantes de cette annexe sont consacrées, d'une part aux techniques d'analyse fixées par le décret du 20 septembre 1991 et en vigueur concernant la surveillance de la qualité de l'eau des zones de baignade aménagées, et d'autre part aux normes guides et impératives appliquées à ces zones.

Méthodes de référence pour l'analyse des eaux de baignade

Décret n° 91-980 du 20 septembre 1991 fixant les normes d'hygiène et de sécurité applicables aux baignades aménagées

Arrêté du 29 novembre 1991

-S

Paramètres	Méthodes d'analyses	Norme AFNOR
Coliformes totaux	Fermentation en tubes multiples. Repiquage des tubes positifs sur milieu de confirmation	NF T 90-413 Octobre 1985
Coliformes thermotolérants	Dénombrement selon NPP ou filtration sur membrane et culture sur milieu approprié tel que gélose lactosée au tergitol, glose d'endo , bouillon au teepol 0,4% ; repiquage et identification des colonies suspectes.	N-FT 90-413 NF T 90-414 Octobre 1985
Streptocoques fécaux	Méthode de Litsky. Dénombrement selon NPP ou filtration sur membrane. Culture sur un milieu approprié.	NFT90-411 Octobre 1989 N-F T 90-416 Octobre 1985
Salmonelles	Concentration par filtration sur membrane. Inoculation sur milieu type. Enrichissement, repiquage sur glose d'isolement, identification.	
Entérovirus Entérovirus	Concentration par filtration, par floculation ou par centrifugation et confirmation.	

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

NOVEMBRE 1991

Bilan Sanitaire des Baignades Aménagées Autorisées de Moselle.

Saison estivale 1993

Publication de la DDASS de Moselle (Metz) - (premier semestre 1994)

Normes Guides et Impératives des indicateurs appliqués aux eaux de baignades

Paramètres microbiologiques	Normes Guides (NG)	Normes Impératives (NI)
Coliformes Totaux (CT) dans 100 ml	500	10 000
Coliformes Fécaux (CF) dans 100 ml	100	2 000
Streptocoques Fécaux (SF) dans 100 ml	100	

Classement des eaux de baignades :

CLASSEMENT	QUALITE CONFORME		QUALITE NON CONFORME	
	A	B	C	D
Coliformes Totaux	80 % Prél. ≤ NG 95 % Prél. ≤ NI	95 % Prél. ≤ NI	5 à 33 % Prél. ≥ NI	1 Prél. sur 3 ≥ NI
Coliformes Fécaux	80 % Prél. ≤ NG 95 % Prél. ≤ NI	95 % Prél. ≤ NI	5 à 33 % Prél. ≥ NI	1 Prél. sur 3 ≥ NI
Streptocoques Fécaux	90 % Prél. ≤ NG	/	/	/

* Technique de filtration :

Voici la méthode qui a été utilisée pour isoler les salmonelles de l'eau de Riverside :

Echantillon : 2 litres d'eau prélevés au robinet.

Séparation : filtration sur membrane de **0,45 µm** de taille de pores (**Millipore**).

Enrichissement : la membrane est transférée dans un tube contenant 10 ml de 'bouillon au tétrathionate avec vert brillant'; incubation à 37 °C pendant **24, 48** et 72 h.

Isolement : à 24, 48 et 72 h, on prélève une partie du bouillon pour l'isoler sur une gélose **vert-brillant + sulfadiazine** de sodium (60 mg/l); incubation à 37 °C pendant 24 h.

chaque colonie suspecte est repiquée sur un milieu : "Triple **Sugar Iron Agar**".

Confirmation : les bactéries donnant une réaction positive avec ce dernier milieu sont identifiées en utilisant les caractères biochimiques et sérologiques.

Caractères biochimiques de *Salmonella* :

Test	Réaction
coloration de Gram	=
mobilité	+
fermentation du glucose	+
fermentation du lactose	=
fermentation du saccharose	=
production d'uréase	=
production d' indole	=

* Méthode en milieu liquide NPP :

On peut emprunter plusieurs voies pour parvenir à l'isolation des salmonelles : soit on enrichit **directement** l'échantillon, soit on le pré-enrichit puis on l'enrichit.

- Revivification des germes :

enrichissement direct de 10 ml d'échantillon dans : 2 x 100 ml de milieu Rappaport
et 2 x 100 ml de milieu Selenite Brilliant Green (SBG).

pré-enrichissement : 10 ml d'échantillon dans de l'eau peptonée **tamponnée (Difco B 118)** à 37 °C pendant 24 h,



puis enrichissement par 10 ml de pré-enrichissement transférés dans les milieux suivants :

- Rappaport, à incuber à 37 °C.
- SBG à incuber à 43 °C.
- Muller-Kauffmann au tétrathionate (Oxoid CM 329) à incuber à 43 °C.

- Isolement : après 24 à 48 h d'incubation, tous les milieux d'enrichissement sont inoculés sur un milieu vert-brillant modifié (Oxoid CM 329) par addition de sulphadiazine (120 mg/l); incubation des boîtes à 37 °C et observation à 24 et 48 h. Les colonies qui ne fermentent ni le lactose ni le glucose et qui ressemble à 'une salmonelle doit être identifiée biochimiquement et sérologiquement.

- Enumération de *Salmonella* : un volume de 0,1 ml de solution saline à la dilution appropriée estensemencée par étalement sur la gélose au vert-brillant modifié; les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h. Le comptage se fait à partir des colonies qui agglutinent le sérum "O".

Méthodes utilisées par le LHRSP :

* En milieu liquide (NPP) : NF T 90-4 18

☐ Culture primaire : utilisation d'un bouillon de culture à l'asparagine et à l'éthanol (milieu de **Drake** 10);
incubation à 37 °C pendant 48 h.

☐ Lecture : retenir les tubes positifs et suspects : ceux présentant un trouble et une coloration verdâtre, fluorescente, et les repiquer sur une gélose de confirmation.

☐ Confirmation : sur gélose lactée au cétrimide (agent inhibiteur des levures); incubation à **41,5 °C** pendant 24 h puis tester les caractères biochimiques de *Pseudomonas*.

*Filtration sur membrane : AFNOR T 90-4 19

☐ Culture primaire : un choix de 3 milieux :

- glose au cétrimide et à l'acide nalidixique.
- gélose **mPA-B** (base + antibiotiques).
- milieu 19 selon Drake (cétrimide + alcool).

incubation à 37 °C pendant 48 h ou **41,5 °C** pendant 48 h si les échantillons sont susceptibles de contenir un grand nombre d'autres bactéries.

☐ Lecture : dénombrement des colonies suspectes; exemple : sur gélose au cétrimide, les colonies sont verdâtres, fluorescentes; repiquage de quelques colonies pour confirmation.

☐ confirmation : milieux de culture :

- hydrolyse de la caséine : gélose cétrimide au lait; incubation à **41,5 °C** pendant 24 h.
- production de pyocyanine : gélose King A; incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h. .

Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*

Test	Réactions typiques*
hydrolyse de la caséine	+
croissance à 41,5 °C	=
fluorescence (sous rayons UV uniquement)	+
@ment de pyocyanine (bleu-vert)	+

* Il existe des réactions atypiques provoquées par l'interférence d'autres micro-organismes.

La méthode décrite ci-dessous est tirée d'un article [28] traitant de l'énumération **d'*Aeromonas hydrophyla*** par la méthode de filtration.

* Filtration : filtration de l'échantillon sur membrane Millipore (47 mm de diamètre et **0,7 µm** de taille de pore);

La membrane est ensuite placée sur le milieu **mA** et incubée en position renversée pendant 20 h à **35-37 °C**; le milieu primaire **mA** contient du tréhalose comme source de carbone et de l'ampicilline et de l'éthanol comme inhibiteurs sélectifs.

* Lecture :

Les colonies typiques sont circulaires, convexes, jaunes et de 1 à 3 mm de diamètre.

La couleur jaune provient de la fermentation du tréhalose (fermenté par toutes les espèces **d'*Aeromonas***).

* Tests d'identification :

⊖ test au mannitol : après la première incubation, les colonies jaunes sont repiquées sur un milieu au mannitol (composition et préparation détaillée dans l'article [28]); les colonies **d'*Aeromonas*** doivent être mannitol +.

⊖ test de l'oxidase : les filtres sont d'abord transférés sur un support saturé en solution tamponnée saline et phosphatée pendant 60 secondes. Cela neutralise partiellement la production d'acides organiques qui pourraient modifier la réaction colorée au test de l'oxydase.

les filtres sont ensuite transférés sur un support saturé en réactif oxydase.

La lecture se fait après 10 à 15 secondes; les colonies entourées d'un halo pourpre sont considérées positives.

Les colonies tréhalose +, **mannitol +**, oxydase + sont ***Aeromonas hydrophyla***.

*** MISE EN CULTURE :**

Préparation de l'échantillon :

La référence bibliographique n° nous donne une méthode pour préparer l'échantillon à l'analyse:

1ml ou 1mg d'échantillon est mixé avec **5ml** de solution saline phosphatée tamponnée et filtrée à travers un filtre stérile. La suspension est centrifugée à **800 G pendant** 30 secondes et les 5 ml de surnageant sont filtrés sur membrane Millipore de **0,45 µm** puis centrifugés à nouveau à 800 G, mais pendant 15 minutes.

Des gouttes de **0,02 ml** de filtrat non-dilué ou de **filtrat dilué à 1/10, 1/100, 1/1000** dans la tryptone-sel sont inoculées en double dans chacun des trois milieux de Ellinghausen.

La méthode éprouvée et mise en pratique par le LHRSP repose sur la base de trois filtrations :

- une pré-filtration sur papier-filtre pour éliminer les grosses particules.
- une première filtration sur membrane (Sartorius) de **0,45 µm** effectuée sur Büchner pour éliminer les bactéries de taille importante.
- une deuxième filtration sur membrane (Nucléopore) de **0,22 µm** effectuée sur une rampe pour retenir les leptospires.

Milieux utilisés :

(voir tableau page suivante)

Les milieux senti-liquides en boîtes de Pétri permettent un dénombrement des colonies qui sont reconnues morphologiquement et biochimiquement comme étant des leptospires. On dénombre en fonction du volume d'inoculum.

Les milieux liquides en tubes donnent le Nombre le Plus Probable (**NPP**), par lequel on déduit une concentration de leptospires dans l'inoculum.

Lecture :

Méthode utilisée au LHRSP :

L'observation des leptospires se fait au microscope optique sur fond noir (éventuellement en contraste de phase). Il faut rechercher des longs bacilles très mobiles.

Observation des cultures à l'état frais, entre lame et lamelle à l'objectif 100 (**+goutte** d'huile à immersion), tous les deux jours de la première semaine puis une fois par semaine.

Si l'observation microscopique est positive : repiquer 1 ml de bouillon dans un nouveau bouillon pour leptospires. Laisser incuber à 30 °C pendant une semaine et procéder à une nouvelle observation microscopique. Si elle donne des résultats positifs, envoyer à l'Institut Pasteur de Paris pour confirmation.

*** METHODES IMMUNOLOGIQUES :**

Etant donné que les leptospiroses sont des maladies immunisantes, l'organisme répond par la **production** d'anticorps. La détection des leptospires est ainsi facilitée par la recherche des complexes antigènes-anticorps **déTECTABLES**.

Plusieurs types de réactions ont été ainsi répertoriées [2] :

* la réaction d'agglutination de Martin et Pettit (**RAL**) : très sensible, reste la méthode de référence. "Elle met en jeu les propriétés agglutinantes et lytiques du sérum du malade vis-à-vis du sérotype ou du sérogroupe correspondant."

Elle consiste à mettre en présence, dans de petits tubes stériles, des cultures de divers sérotypes de leptospires (antigènes), avec des dilutions croissantes du sérum à tester.

Le contact est maintenu 1 ou 2 heures à l'étuve à 37 °C. Les cultures sont préalablement examinées au microscope à fond noir afin d'éliminer celles présentant des amas, des agglutinations spontanées, des germes ayant tendance à se lyser ou à s'accrocher.

La lecture se fait avec un grossissement de 100 à 150, comparativement à un témoin constitué de la culture **seule**. On apprécie trois paramètres :

- la proportion de leptospires seuls.

- l'intensité de l'agglutination : massive (**+++**) : amas denses et brillants hérissés de leptospires, moyenne (**++**) : amas ternes, plus lâches, faible (+) : résilles brillantes ou **échevaux** ternes en cas de lyse.

- l'intensité de la lyse, qui peut être forte (**F**), faible (**f**) ou nulle (-).

* les réactions macroscopiques : on cherche à réaliser des réactions plus rapides et plus simples, pouvant être lues à l'oeil nu.

On dénombre trois types de réactions:

- en tubes capillaires : (STOENNER 1953)

Une réaction positive se traduit par des amas floculants, plus ou moins abondants, observés par lecture sur fond noir en lumière transmise.

- sur lame pour le dépistage : (GALTON 1958)

Ce test emploie un mélange de 4 antigènes, composés, chacun de 3 sérotypes différents. Si le test est positif, on observe des agglutinats.

- réaction du latex :

La sensibilité des antigènes est accrue par addition des particules de latex. La réaction est effectuée dans des tubes qui, après incubation, sont centrifugés rapidement. La lecture se fait sur fond noir par l'observation des agrégats éventuels.

* réactions de groupe :

Les réactions de groupe permettent de montrer que les sérums prélevés (parmi la multiplicité des sérotypes existants) sont positifs à la recherche du **genre *Leptospira***. A cette étape primaire succède l'étude, plus fine, des sérums vis-à-vis d'antigènes spécifiques.

- réaction de fixation du complément (manque de spécificité) : intéressante pour le diagnostic des cas récents et dans les régions où les leptospires sont très différents.

- réaction hémagglutinante et hémolytique (simple et pratique) : elle utilise des globules rouges humains 0, ou de mouton, sensibilisés par l'antigène leptospire; on observera soit l'agglutination, soit la lyse, en présence de complément par les anticorps correspondants.

- technique des anticorps fluorescents : immuno-fluorescence indirecte pour rechercher des anticorps anti-leptospires (réaction spécifique de genre, non de sérotype)

“IL y a deux avantages théoriques à la technique d'immuno-fluorescence : d'une part, les leptospires sont colorés et cette coloration repose sur la réaction anticorps-antigène spécifique. D'autre part, elle permet non seulement de reconnaître morphologiquement les leptospires, mais aussi de les distinguer des artefacts trompeurs.” [2]

- réaction utilisant l'antigène Biflexa Patoc.

Leptospira Biflexa Patoc est un sérotype saprophyte, donc non dangereux pour le manipulateur, qui possède une fraction commune au **genre *Leptospira***. Le parallélisme entre les réactions positives pour les antigènes pathogènes et pour l'antigène Patoc est satisfaisant. Cette souche donne une réaction positive quelque soit le sérotype en cause.

Les réactions à l'aide d'antigènes de groupe sémblent constituer une méthode d'avenir : les sérums examinés seraient ainsi triés avant d'être étudiés en réactions d'agglutination-lyse.

Milieux utilisés

Milieux	Composition	Mode d'inoculation	Temps et températures d'incubation	Fréquences de lecture
3 milieux de Ellinghausen [23]	premier milieu : sérum de lapin (1%) agar (1,5%) deuxième milieu : premier milieu + 5-FU (100 µg/ml) tamphotécine B (50 µg/ml) troisième milieu : premier milieu + sulphathiazole (50 mg/ml) + tétracycline (5 mg/ml) + tetracycline (0,5 mg/ml)	Par étalement	incuber à 29 °C pendant 6 semaines à l'obscurité	tous les 2 jours pendant 1 semaine puis 1 fois par semaine
Reiter et Ramme [28]	sérum de lapin eau physiologique huile de vaseline	"ensemencer largement"	incuber à l'obscurité entre 28 et 32 °C	Nombre maximum vers le dixième jour
Johnson et Harris [24]	milieu au Tween 80-albumine rendu semi-solide par addition d'agar (0,2%) + 5-FU (100 µg/ml)	Par étalement	incuber 30 jours à la température de la pièce	à partir de 30 jours
Fletcher (Standard Methods)	semi-solide sérum de lapin (10%)	inoculation par un volume de 0,5 à 1 ml de préparation	incuber à 30 °C pendant 6 semaines	examiner chaque tube 1 fois par semaine
Bouillon nutritif à base de Stuart (Standard Methods)	(Stuart : sérum de lapin 10% + asparagine) 10 ml de Stuart + 0,8 ml d'enrichissement + 0,5 ml de 5-FU à 1%	mettre les tubes dans les bouillons de milieu	13 °C, 5 jours pour les saprophytes 30 °C, 5 jours pour les pathogènes	comme Ellinghausen

* La littérature m'a fournit trois techniques d'analyses, à comparer :

Paramètres	Technique utilisée en Floride [31]	Technique de l'Institut Pasteur de Lille [13]	Technique utilisée en Espagne [11]
Volume de prélèvement	50 à 100 gallons (189,3 à 378,5 litres)	30 litres	1 litre
Méthode de séparation	2 filtrations : * filtrer l'eau sur une colonne de silice d'Ottawa, de dimensions : 38,1 cm de diamètre et 60 cm de long au débit de 1 gallon/mm . Le filtrat est placé dans des jarres stériles de 1 ou 2 litres. * le contenu des jarres est filtré sur membrane de 5 µm (Millipore)	Filtration du prélèvement sur une membrane Pour concentrer les germes obtention d'un volume de 1, 10 ou 100 ml	Filtration du prélèvement par le vide sur une membrane 1,2 µm
Revivification des germes	Mélange de l'échantillon avec 400 à 600 ml d'extrait de viande à 1 % . Nécessité d'une re-séparation des germes : après décantation, surnageant centrifugé par 200 ml à 500 G pendant 30 mn après centrifugation, 80 ml de surnageant sont pipetés et jetés; culot remis en suspension, centrifugé à 500 G pendant 15 mn; surnageant jeté		Membrane placée sur une boîte de Pétri contenant de l'agar non-nutritif dans de l'eau et incubée à 27 °C pendant 24 h.
Inoculation	Au centre de la boîte de Pétri contenant une suspension d' Enterobacter aerogenes	Inoculation sur une gélose non-nutritive ensemencée d' Enterobacter	Addition d'une suspension d' E. coli
Incubation	Incubation à 43-44 °C	Incubation à 44°C	Incubation à 27 °C

* Observation-Lecture :

On observe les amibes à partir des cultures faites selon les techniques précédentes (ou d'autres éventuellement)

- microscopique :

On observe l'échantillon au microscope de phase (grossissement 800).

“A la coloration de Giemsa et à l'hématoxyline, les amibes montrent des pseudopodes, un noyau de type vésiculeux dont la membrane nucléaire entoure un gros karyosome et des vacuoles. Ce sont des amibes de **22,5 µm** sur **15,5 µm** dont le cytoplasme renferme de nombreux granules ou cristaux colorés en noir par l'hématoxyline et les mitochondries.” [20]

L'addition d'eau distillée à des cultures riches en amibes permet d'observer après 2 heures, mieux après 24 ou 48 heures, l'apparition d'éléments flagellés (2 flagelles visibles au microscope de phase) qui peuvent retourner à l'état **amibien**.

- technique d'immuno-fluorescence indirecte : [31]

L'antisérum est préparé par des lapins qui produisent des anticorps contre l'espèce de **Naegleria** pathogène ou l'espèce non-pathogène qui leur a été inoculée. Cet antisérum (spécifique à l'antigène de l'espèce inoculée) **réagira** ou restera inerte face à une espèce testée. S'il réagit, l'espèce testée est donc identique à l'espèce inoculée -qui a permis de produire les anticorps. Cette technique a pour objectif de **reconnaitre** les espèces cultivées.

Une suspension de trophozoïstes dans la PBS (Phosphate-Buffered Saline) est distribuée pour pré-désignation sur des plaques d'immuno-fluorescence de Clay Adams et laissée en repos pendant 10 mn à la température de la pièce.

Une série d'antisérum diluée (**1/20** à **1/2500**) est additionnée pour fixer les amibes sur les plaques. Après 30 mn à **37 °C** en atmosphère humide, les plaques sont lavées à la PBS par 2 fois, puis laissées 15 mn à la température de la pièce. Une substance fluorescente anti-globuline de lapin diluée au **1/20** dans la PBS est ajoutée à chaque préparation antigène-anticorps.

Incubation à **37 °C** pendant 30 mn en chambre humide avant un nouveau lavage.

Les plaques sont examinées au microscope sous source lumineuse spéciale (HBO-200) avec filtres.

ANNEXE N°9 : Isolation de *Vibrio cholerae* 0:1

La méthode de recherche des vibrions cholériques est d'autant moins aisée que leur concentration est relativement faible dans les eaux et leur survie y est difficile. Il y a donc obligation de concentrer les échantillons à partir de volumes importants d'eau et d'utiliser des milieux d'enrichissement sélectifs pour inhiber la croissance des nombreuses bactéries apportées par le grand volume d'eau.

Pour l'enrichissement, l'utilisation d'un bouillon à pH alcalin permet la régénération des vibrions et l'inhibition des autres germes à un tel pH.

Pour l'isolement, l'article "Isolation of *Vibrio cholerae*" [1] propose les milieux suivants :

- milieux non-sélectif :

meat **extract** agar (**MEA**) : gélose à l'extrait de viande à pH **8,5**
 gélatine agar (**GA**) à pH **8,2** à **8,5**

- milieux sélectifs :

thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) à pH **8,6**
 taurocholate-tellurite-gélatine-agar (TTGA) à pH **8,5**

Pour l'identification, les vibrions cholériques répondent à ces critères :

Test	Réaction
coloration de Gram	(bacilles fin ⁻ et incurvés)
mobilité	+
cytochrome oxydase	+
indole	+
fermentation du glucose	+
lactose	=
H₂S	=

En ce qui concerne la confirmation des résultats par un laboratoire spécialisé, **FULP** s'adresse à :

Mr le professeur Monteil
 Institut de Bactériologie
 3, rue Koeberlé
 67 000 STRASBOURG

tel : 88 36 06 22

Expression des résultats :

Les méthodes décrites ci-dessus sont plus des méthodes de recherche que de dénombrement. Les résultats seront donc exprimés en "présence" ou "absence" de **vibrions** dans le volume d'échantillon.

Le tableau ci-dessous présente les méthodes des laboratoires d'hydrologie ULP et LHRSP, en grandes parties communes :

Paramètres	Méthode utilisée par l'ULP	Méthode utilisée par le LHRSP
Volume de prélèvement	prélèvement d'1 litre	volume \geq 1 litre jusqu'à 10 litres pour les eaux potables
Concentration des germes	filtration sur membrane (Millipore) de 0,45 μm de pores et de 47 mm de diamètre (si l'eau est très sale, utiliser plusieurs filtres pour 1 litre d'eau)	filtration sur membrane
Enrichissement	introduction des filtres dans 50 ml de bouillon à pH 9. incubation à 37 °C pendant 24h.	3 bouillons différents sont proposés : - eau peptonée alcaline (pH 9,0) - eau peptonée hypersalée 3 % (pH 8,6) - eau peptonée au tellurite ou au taurocholate (pH 9,2) incubation à 35-37 °C pendant 18h ou à température ambiante 4 à 6h puis 35-37 °C pendant 10-12h .
Isolement	faire un isolement à l' ance de platine sur une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose) décharger l'oeuse au maximum : épuiser toute l'oeuse sur une ou plusieurs boites pour bien isoler les colonies. incubation à 37 °C pendant 24h.	isolement sur gélose TCBS ou sur gélose alcaline incubation 37 °C pendant 24h.
Lecture des isoléments	les vibrions apparaissent sous forme de colonies jaunes sur TCBS.	sur TCBS : colonies jaunes-vertes (saccharose +) (certains vibrions sont saccharose -) sur gélose alcaline : colonies petites, transparentes, bleutées
Confirmation	sur colonies jaunes, tester : - oxydase (vibrions oxydase +) - Gram (bacilles Gram -) quand ces deux caractères sont vérifiés : ensemencer une galerie API 20 NE (si présence de vibrions cholériques, envoyer la souche pour confirmation en laboratoire spécialisé) ou repiquer la colonie dans l'eau peptonée simple (EPS), incubé à 37 °C pendant 24h puis faire un état frais et rechercher l'indole.	identifications biochimiques : mobilité Gram \Rightarrow formes caractéristiques oxydase + uréase - \Rightarrow faire une galerie complète identification sérologique : antigène O spécifique de <i>V. cholerae</i> A, B, C: - variété Ogawa (A+B) - variété Inaba (A+C) - variété Hikojima (A+B+C)



- *1§ Isolation of *V. cholerae* O:1 in peripheral laboratory.
Manuel for labo. invest, 1987, annexe, , pp8
- *2§ Microbiologie BEHRING, , , 9, pp6
- 03§ Choléra
Encyclopédie Universalis, , 4, , pp
- *4§ **Encyclopédie** Universalis, , 9, , pp3
- 05§ Alonso, **Garay**, Hernandez
Membrane **filter procedure** for enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water
Wat. Res., 1989, 23, 12, pp4
- *6§ Bordner
Microbiology : methodology and quality assurance
Journal WPCF, 1989, 55, 6, pp10
- 07§ Boring, Martin and Elliott
Isolation of *Salmonella typhi-murium* from municipal water, Riverside, California, 1965.
American Journal of Epi, 1970, 93, 1, pp6
- 08§ Cabelli, **Dufour**, **McCabe**, **Levin**
A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis
Journal WPCF, 1983, 55, 10, pp5
- *9§ Conseil canadien des ministres de l'environ.
Recommandation pour la qualité de l'eau
↓ 1992, ↓ , PP
- *10§ Craun et al
Prevention of waterborne choléra in the USA
Journal AWWA, 1991, , , pp6
- *11§ Crespo, Margarita, Ares, **Fernandez** and Combarro
Isolation of *Amoeba* of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* from public fountains in Galicia (SPAIN)
, 1990, ↓ ↓ , PP5
- *12§ D. Zmirou et al.
Risque sanitaire lié à la contamination bactériologique des eaux de baignade en rivière: le cas du bassin de l'Ardèche.
Concours médical, 1987, ?, ?, pp5

- *13§ Delattre, Oger, Aprosi
Interrelations between Amoeba and bacteria in the Moselle river, France
Water Science and Techn, 1991, 24, 2, pp3
- *14§ G. Larbaigt
Une meilleure connaissance des risques sanitaires liés à la baignade.
Incidence sur la réglementation et la prévention.
Revue des Sciences de 1, 1989, 2, 2, pp7
- *15§ Geldreich
Microbiology of water
Journal WPCF, 1989, 55, 6, pp12
- *16§ Harf, Monteil
Pathogenic Microorganisms in Environmental Waters : a potential Risk for
Human Health
Water International, 1989, , 14, pp5
- *17§ Haslay, Leclerc
Microbiologie des eaux d'alimentation
, 1993, , , PP
- *18§ Henry, Johnson
Distribution of the genus Leptospira in soil and water
Applied and environ. mic, , , , pp
- *19§ Henry, Johnson, Bohool, Schmidt
Detection of leptospira in soil and water by immunofluorescence staining
Applied microbiology, 1971, 21, 5, pp4
- *20§ Jadin, Hermanne, Robyn, Willaert, Van Maercke
Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers,
Belgique
Ann. Soc. belge Med. tr, 1971, 51, 2, pp11
- *21§ Leclerc, Festy, Lazar
Connaissances actuelles de la pathologie hydrique
Rev. Epidém. et Santé P, 1982, 30, , pp23
- *22§ Leclerc, Georges
Amibes "libres" pathogènes dans les eaux échauffées
Cons. Sup. Hygiène Publiq. , , , pp10
- *23§ Lewin, Jones, Redhead
The fate of bacterial pathogens in sewage treatment processes
Wat. Pollut. Control, 1981, 80, 4, pp12
- *24§ Perollet, Postic, Baranton
Leptospira
Manuel de Bactériologie, 1992, 2, , pp11

- *25§ R. Philipp, E. J. Evans, A. O. Hugues et al.
Health risks of snorkel swimming in untreated water.
International Journal o, 1985, 14, 4, pp4
- *26§ R. F. Lacey and E. B. Pike
Water recreation and risk
3/8 , ?, ?, pp14
- *27§ R. L. Calderon and E. W. Mood
Epidemiological studies of otitis externa
Environmental Protectio, 1981, , 81-053, pp3
- *28§ Rippey et Cabelli
Membrane filter procedure for enumeration of Aeromonas hydrophyla in fresh
waters
Applied and environ. mi, 1979, 38, 1, pp6
- *29§ Turner
Special article : Leptospirosis 3
Trans. of Tropic. Medec. a, 1970, 64, 4, pp24
- *30§ V. K. Ktsanes, A. C. Anderson, J. E. Diem
Health effects of swimming in Lake Pontchartrain at New Orleans
Environmental Protectio, 1981, , 81-027, pp2
- *31§ Wellings, Amuso, Chang and Lewis
Isoiation and identification of pathogenic Naegleria from Florida lakes.
Applied and Environ. Mi c, 1977, 34, 6, pp7