

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2015

**Centre National de Référence
des Légionelles**

**Année d'exercice
2014**

Dr Sophie Jarraud & Pr Gérard Lina

Centre de Biologie et de Pathologie Est

Institut de Microbiologie

Laboratoire de Bactériologie

59 Boulevard Pinel

69677 Bron cedex

Résumé analytique

Enjeux de santé publique

Un total de **1346 cas** de légionellose a été diagnostiqué et notifié en France en 2014 *versus* 1262 cas en 2013. Ce **chiffre est stable voire augmente** depuis 3 ans malgré l'élargissement de la réglementation de surveillance des eaux chaudes sanitaires (ECS) aux établissements recevant du public. Les objectifs sont de maîtriser les sources de contamination potentielles et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'alors.

La légionellose reste une infection sévère avec une **létaleté globale** estimée à **11%** mais qui peut atteindre plus de 30% chez les patients hospitalisés en réanimation. L'un des objectifs majeur est l'identification de facteurs et/ou de marqueurs associés à la sévérité des légionelloses.

Les axes majeurs de la mission du CNR sont :

- la participation active aux investigations épidémiologiques ce qui implique une amélioration du nombre de souches disponibles, l'amélioration du diagnostic des cas de légionellose notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires et le développement de nouvelles méthodes de typage ;
- l'un des axes majeurs est d'évaluer la place du séquençage de génome complet (de novo whole genome sequencing) de légionelles dans l'épidémiologie moléculaire locale (enquêtes épidémiologiques) et globale (émergence de clones)
- l'identification de nouvelles sources potentielles de contamination ;
- une veille constante sur l'apparition de résistance des légionelles aux antibiotiques ce qui implique le développement de techniques notamment moléculaires permettant cette surveillance ;
- une meilleure compréhension par différentes approches de la part des différents facteurs (environnementaux, bactériens, liés à l'hôte) qui conduisent au développement et à la sévérité d'un cas de légionellose.

Faits marquants en 2014

Une culture de prélèvements pulmonaires a été positive pour **25,3% des cas** diagnostiqués. Ce pourcentage qui reste insuffisant est en augmentation régulière depuis 2008 et stable par rapport à 2013.

En 2014, nous notons une **augmentation du nombre de souches de *L. pneumophila* séro-groupe non 1 et de *Legionella non pneumophila*** (27 souches) (Tableau 2).

Parmi les cas pour lesquels l'antigénurie était documentée (n=20), celle-ci était systématiquement négative. La PCR, nouveau critère de légionellose probable depuis 2011, apparaît comme un outil permettant d'améliorer le diagnostic, en particulier ceux dus à des sérogroupes ou espèces probablement encore sous-estimés.

En 2014, deux observations relativement inhabituelles **d'épisodes de légionellose successifs** ont été décrites chez deux patients. Ces deux observations suggèrent chez l'un une persistance d'une infection à bas bruit malgré une évolution clinique initialement favorable avec un second épisode plus de 2 mois après le 1^{er} ; pour l'autre une nouvelle infection plus de 4 mois après le 1^{er} épisode par une souche identique isolée au domicile du patient.

En 2014 et comme les trois années précédentes, **aucune épidémie (10 cas et plus)** suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée. Au total, **68% des domiciles investigués** semblent être à l'origine de la contamination de cas isolés. Une étude devrait être mise en place avec l'InVS afin de mieux caractériser le rôle du domicile comme source de contamination.

Alors que plus de 1700 Sequence Type (ST) sont répertoriés dans la base de données européenne, près de **50% des souches responsables d'infection humaine** appartiennent à **5 ST (ST1, 23, 37, 47 and 62)**. L'Analyse phylogénétique réalisée à partir des données du génome entier de 365 isolats (dont 337 appartenant à ces 5 ST) révèle que ces ST présentent des origines indépendantes au sein d'une espèce très diverse. Les données montrent une émergence de ces clones et une dispersion sur de longue distance relativement rapide. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que l'homme a récemment créé de **nouvelles niches environnementales facilitant leur émergence**. L'homme pourrait contribuer à la propagation et la sélection de clones qui sont mieux adaptées à l'infection humaine, une théorie qui pourrait expliquer leur émergence récente simultanée, leur propagation et leur propension accrue pour induire la maladie. Ces résultats résultent d'un travail auquel nous avons collaboré réalisé par l'équipe de Carmen Buchrieser (Institut Pasteur Paris), J. Parkhill (Sanger institute, UK), Tim Harrison (PHE, London). L'une des conséquences de ces données est de poursuivre les efforts pour identifier ces niches encore non élucidées notamment pour les souches ST47.

Points clés

- la pratique plus régulière de la PCR *Legionella* sur prélèvements pulmonaires conduits à une augmentation des diagnostics de légionellose notamment à *L. pneumophila* et à *L. pneumophila* non sg1 ;
- la constante augmentation du nombre d'isolats cliniques disponibles est le reflet de l'amélioration des méthodes de culture utilisées par les laboratoires et de l'envoi plus systématique des prélèvements au CNR quand les méthodes ne sont pas disponibles dans les laboratoires ;
- sur le plan épidémiologique, aucune épidémie n'a été identifiée en 2014 ;
- le développement de PCR spécifique de clone devrait participer à l'amélioration de la surveillance des légionelloses et à l'identification de niches spécifiques ;

Avant propos

Le Centre National de Référence des *Legionella* remercie vivement l'ensemble de ses correspondants et partenaires, notamment pour l'envoi de souches et de prélèvements pulmonaires ainsi que pour les renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique.

Table des matières

1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	8
2 ACTIVITES D'EXPERTISE	8
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2014.....	8
2.1.1 <i>Techniques développées ou en développement</i>	8
2.1.2 <i>Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats</i>	10
2.1.3 <i>Techniques transférées vers d'autres laboratoires</i>	12
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE : EVOLUTIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES EN 2014.....	12
2.2.1 <i>Souches d'origine clinique</i>	13
2.2.2 <i>Prélèvements pulmonaires</i>	16
2.2.3 <i>Confirmation de tests urinaires</i>	18
2.2.4 <i>PCR sur prélèvements pulmonaires</i>	19
2.2.5 <i>Souches d'origine environnementale</i>	19
2.2.6 <i>Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats</i>	21
2.2.7 <i>Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués</i>	22
3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE	23
3.1 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	23
3.1.1 <i>Réseau de partenaires</i>	23
3.1.2 <i>Définition de l'échantillon de souches isolées</i>	23
3.1.3 <i>Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances</i>	24
3.2 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX.....	31
3.2.1 <i>Définition de l'échantillon de souches testées</i>	31
3.2.2 <i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	31
3.2.3 <i>Résultats et analyse des tendances</i>	31
3.3 PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE.....	32
3.3.1 <i>Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS</i>	32
3.3.2 <i>Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens</i>	35
3.4 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE.....	36
3.4.1 <i>Evolution génétique de Legionella pneumophila : approche in vivo chez un patient immunocompétent</i>	36
3.4.2 <i>Séquençage d'un clone émergent de Legionella pneumophila</i>	36
3.4.3 <i>Détection rapide par PCR spécifiques des clones majoritaires</i>	36
4 ALERTE	37
4.1 PROCEDURE D'ALERTE DE L'INVS ET DE LA DGS EN CAS DE DETECTION DE PHENOMENE ANORMAL ET EVENEMENTS AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE EN 2013.....	37
4.2 DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX.....	37
5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	39
5.1 ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE, ACCUEIL DE STAGIAIRES.....	39
5.1.1 <i>Accueil de stagiaires</i>	39
5.1.2 <i>Encadrement de thèses d'Université et Master Recherche en lien direct avec le CNR</i> ..	40
5.1.3 <i>Enseignements, formations aux professionnels de santé</i>	40
5.2 GUIDES ELABORES.....	41
5.3 MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET PRODUCTION DU CNR.....	41
5.3.1 <i>Rétro-information aux partenaires</i>	41
5.3.2 <i>Diffusion aux professionnels : conférences, site internet</i>	41
5.3.3 <i>Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activité...)</i>	42
5.3.4 <i>Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)</i>	42
6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	43

6.1	ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS NOTAMMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR	43
6.1.1	<i>Mécanismes de résistance de Legionella aux macrolides</i>	43
6.1.2	<i>Résistance de Legionella aux quinolones</i>	43
6.1.3	<i>Legionella et peptides antimicrobiens</i>	44
6.1.4	<i>Multiple independent pathogenic clones of Legionella pneumophila have emerged recently in unknown niches</i>	44
6.1.5	<i>Recherche de bio-marqueurs de virulence de Legionella pneumophila</i>	44
6.2	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES OU PREVUES EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR	45
6.2.1	<i>Publications nationales</i>	45
6.2.2	<i>Publications internationales</i>	45
6.2.3	<i>Communications nationales</i>	47
6.2.4	<i>Communications internationales</i>	47
6.2.5	<i>Conférences sur invitations</i>	48
7	COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	48
8	PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES	49

Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2007 – 2014.....	13
Tableau 2. Evolution du nombre de souches d'origine clinique isolées en France depuis 2005 et répartition des isolements de légionelles par espèces et sérogroupes.....	14
Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique.....	15
Tableau 4. Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2014.	15
Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.	18
Tableau 6. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des <i>Legionella</i> isolées de prélèvements d'eau des Hospices Civils de Lyon par le CNR en 2013 et 2014.	21
Tableau 7. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.....	25
Tableau 8. Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2014.....	28
Tableau 9. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000.	33
Tableau 10. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2014.	33
Tableau 11. Résultats des investigations réalisées ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination selon le pulsotype.....	34

Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR.	17
Figure 2. Algorithme décisionnel pour la réalisation de PCR ou la mise en culture des prélèvements pulmonaires.	17
Figure 3. Distribution en terme d'espèces des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2014.....	20
Figure 4. Distribution en terme de sérogroupes des <i>L. pneumophila</i> adressées au CNR en 2014.	21
Figure 5. Evolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009.....	22
Figure 6. Pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France.	24
Figure 7. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 309 souches isolées en 2014.....	25
Figure 8. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.....	25
Figure 9. Répartition des 2 sous-groupes Mab 3/1 (+) et Mab 3/1 (-) de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.....	26
Figure 10. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR.	27
Figure 11. Evolution du pourcentage de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique et un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR.	27
Figure 12. Evolution de la distribution des souches des principaux ST en France de 2008 à 2014.	29
Figure 13. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2014.	30
Figure 14. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France en 2014. 30	

1 Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNR des légionelles sont détaillées en annexe. Les modifications importantes ayant eu lieu courant 2014 sont les suivantes :

- Sur le plan technique :

- Les Hospices Civils de Lyon ont mis en place une plateforme dédiée au diagnostic par les techniques de séquençage haut débit nouvelle génération. Cette plateforme compte 1 séquenceur Nextseq Illumina, 2 séquenceurs Ion torrent (1 PGM et 1 Proton) ainsi que tout l'équipement pré et post séquençage (1 Covaris, 1 AB builder, 1 Ion Chef, 2 One touch, 2 ES et 2 stations de travail informatique). Le CNR a accès à cette plateforme et plusieurs applications de ces technologies sont actuellement à l'étude au CNR (Cf. chapitre 3.4 et chapitre 6.1.3).

- Sur le plan des personnels affectés au CNR :

- Christophe Ginevra a été nommé ingénieur des HCL début 2014 et a pour mission importante le développement du NGS appliqué aux thématiques du CNR. Christophe Ginevra travaille au CNR des légionelles depuis 2005.
- Sébastien Payot est devenu cadre 2014 du CNR des légionelles et des staphylocoques en remplacement de Aline Bouillot.
- Dominique Moret technicien 100% a cessé ses activités pour retraite en novembre 2013. Un technicien 50%, Jérémy Reboulet, a été affecté au CNR en avril 2014 pour le remplacer.
- Suite à l'obtention d'un diplôme d'ingénieur CNAM, Nathalie Jacotin, technicienne 100%, a cessé ses activités pour prendre des fonctions d'ingénieur en secteur privé en septembre 2014. Pour la remplacer, Jérémy Reboulet, a été affecté à 100% au CNR et Lucie Chaverot occupera un poste de technicienne 50% à compter de février 2015.
- Suite au départ en retraite de Françoise Forey en janvier 2014, Laetitia Beraud a pris ses fonctions de praticien attaché en mai 2014.
- Ghislaine Descours a été nommée Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier en septembre 2014. Son poste d'assistant hospitalo-universitaire a été pourvu par Anne-Gaëlle Ranc en novembre 2014. L'étude des liens de clonalité est désormais assurée par quatre biologistes : L. Beraud, G. Descours, S. Jarraud et A.G. Ranc.

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en Annexe.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

2.1.1 Techniques développées ou en développement

2.1.1.1 Premiers essais techniques pour mise en place du typage par séquençage du génome entier (WGS)

Le séquençage de génome entier ouvre des perspectives particulièrement intéressantes pour le typage épidémiologique des *L. pneumophila*. Nous avons accès à une

plateforme de séquençage haut débit (NGS) au niveau des hospices civils de Lyon. Sur cette plateforme, 2 technologies de NGS sont disponibles : illumina et lifetechnologies. Nos premiers essais ont consisté à séquençer un isolat avec les 2 technologies (illumina paired-end 150bp vs ion torrent 400bp). L'analyse des résultats obtenus démontre une plus grande fiabilité des résultats obtenus avec la technologie illumina ; néanmoins, la technologie lifetechnologies permet de tester un nombre d'isolats plus faible et plus souple par run (96 isolats/run illumina, 1 à 50 isolats /run lifetechnologies).

Nous avons également développé, en collaboration avec l'équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », UMR CNRS 5558-LBBE Lyon 1, un script permettant d'extraire les séquences des gènes utilisés pour le typage par séquençage multi locus de *L. pneumophila* (SBT). Ceci permet d'utiliser les séquences issues du NGS pour déduire les ST obtenus habituellement par PCR et séquençage Sanger.

2.1.1.2 Développement d'une PCR de détection de la résistance à la rifampicine

Le mécanisme de résistance de *L. pneumophila* à la rifampicine a été décrit dans la littérature, il implique des mutations dans le gène *rpoB*. Nous avons réalisé des mutants *in vitro* et confirmé ce mécanisme. Nous avons ensuite développé une PCR permettant d'amplifier la région comprenant les mutations responsable de 90% des résistances observées *in vitro*. Cette PCR est spécifique de *L. pneumophila*, elle permet l'amplification directement à partir de prélèvement respiratoire. Sa sensibilité est de 5 UG/ μ L. Les mutations sont ensuite identifiées par séquençage Sanger de l'amplicon. Cette PCR vient compléter les outils développés au laboratoire pour détecter les résistances aux macrolides et aux fluoroquinolones.

2.1.1.3 Transfert de la technique d'identification des sérogroupes de *Legionella pneumophila* en ELISA

L'identification des sérogroupes de *Legionella pneumophila* séro groupe non 1 est actuellement réalisée par une technique d'immunofluorescence (IF) à l'aide de 16 anticorps monoclonaux distribués par Christian Lück (CNR, Dresden, Allemagne).

Nous avons transféré cette technique par IF vers une technique ELISA publiée utilisant les mêmes anticorps monoclonaux mais rendant un résultat brut et objectif. Nous avons testé 16 souches de références (séro groupe 2 à 15, au minimum 2 fois chacune) et 10 souches issues de notre souchothèque identifiées par plusieurs techniques. Nous avons comparé nos résultats aux résultats attendus mais également aux résultats obtenus par la technique d'IF.

A l'exception des souches *Legionella pneumophila* séro groupe 9 qui n'ont pas rendu de résultats concluants (4 souches testées dont 2 souches de référence), les autres résultats étaient très satisfaisants avec de rares réactions croisées ne permettant pas de conclure formellement quant au séro groupe mais n'entraînant pas de rendu de résultats erronés.

L'application de la technique ELISA en routine est envisagée pour 2015 après quelques améliorations en cours.

2.1.1.4 Transfert de la technique de typage des *Legionella pneumophila* séro groupe 1 en ELISA

Comme pour l'identification des sérogroupes de *Legionella pneumophila* séro groupe non 1, le typage de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 est actuellement réalisé par une technique d'IF à l'aide de 7 anticorps monoclonaux également distribués par Christian Lück et permettant de définir 9 sous-groupes.

Le transfert de la technique en ELISA est actuellement en cours de développement.

2.1.1.5 Identification des *Legionella* par MALDITOF (base de données SARAMIS)

Actuellement, les fournisseurs des instruments du marché sont Brucker (biotyper) et bioMérieux qui présentent deux bases de données différentes pour l'identification spectrale. Une Base IVD (VITEK MS) et une Base RUO pour la recherche (SARAMIS). Afin d'améliorer les performances pour l'identification des légionelles, la base de données SARAMIS a fait l'objet d'une mise à jour. Dans ce contexte, bioMérieux a contacté le CNR des Légionelles pour réaliser une validation externe de cette mise à jour. Les analyses ont porté sur 124 souches de *Legionella non pneumophila* et 20 *Legionella pneumophila*, provenant toutes de la collection du CNR. Les premiers résultats apparaissent satisfaisants.

2.1.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats

2.1.2.1 Evaluation du test immunochromatographique Sofia *Legionella* FIA (Quidel) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*

Il s'agit d'une étude multicentrique réalisée en collaboration avec le CNR des légionelles de Suisse (Valeria Gaïa). Les résultats ont été soumis à *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. L'abstract est le suivant :

Purpose: The Sofia *Legionella* Fluorescence Immunoassay (FIA) (Quidel) is a recently introduced rapid immunochromatographic diagnostic test for Legionnaires' disease using immunofluorescence technology designed to enhance its sensitivity. The aim of this study was to evaluate its performance for the detection of urinary antigens for *Legionella pneumophila* serogroup 1 in two National Reference Centers for *Legionella*.

Methods: The sensitivity and specificity of the Sofia *Legionella* FIA test were determined on concentrated and non-concentrated urines and before and after boiling in comparison with the BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card (UAC) (Alere).

Results: Compared to BinaxNOW® *Legionella* UAC, the sensitivity of the Sofia *Legionella* test was slightly higher on non-concentrated urine samples and was identical on concentrated urine samples. The specificity of the Sofia *Legionella* FIA test was highly reduced by the concentration of urine samples. On non-concentrated samples, a lack of specificity was observed for 2.3% of samples, all of them resolved by heat treatment.

Conclusions: The Sofia *Legionella* FIA is a sensitive test for detecting *Legionella* urinary antigens without any previous urine concentration. However, all positive samples have to be re-tested after boiling to reach a high specificity. Its reading is automatized on the Sofia analyzer, which can be connected to laboratory information systems, facilitating accurate and rapid reporting of results.

2.1.2.2 Evaluation du test immunochromatographique bioNexia® *Legionella* (bioMérieux) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* (1^{ère} évaluation)

Ces résultats ont été présentés sous forme de communication affichée au 2nd ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) congress qui a eu lieu les 17,18 et 19 septembre 2014 à Barcelone. L'abstract est le suivant :

Objectives: The diagnosis of Legionnaires' disease can be made by urinary antigen detection. The aim of this study was to compare a chromogenic immunochromatographic test, bioNexia® *Legionella* (bioMérieux R&D, Marcy L'Etoile, France), with the BinaxNOW®

Legionella Urinary Antigen Card (UAC) (Alere, Scarborough, Maine, USA) for the detection of *Legionella pneumophila* antigen serogroup 1.

Methods: A total of 179 urine samples (US) were tested, including 150 prospective US submitted for *Legionella* urinary antigen detection, and 29 frozen US from patients with confirmed *Legionella* infection. Performance of bioNexia® test were evaluated with non-concentrated and concentrated urine samples and compared to the BinaxNOW® results which is the reference test of the French Reference Center for *Legionella*. Concentration of US was performed by centrifugal ultrafiltration (Amicon Ultra-4; Millipore Corporation). Both tests were strictly read at 15 min as recommended by manufacturers. US yielding a positive result was retested after heating at 100°C for 5 min and centrifugation for 15 min at 1000 rpm to exclude false positive result. Any US yielding discordant result was tested by a third test, the ELISA Binax® *Legionella* EIA.

Results:

Table 1. Results of bioNexia® test with non-concentrated and concentrated urine sample compared with results of BinaxNOW® test.

		bioNexia® <i>Legionella</i> (bioMérieux)						
		Non concentrated			Concentrated			
		-	+	Total	-	+	Total	
BinaxNOW® <i>Legionella</i> (Alere)	Non concentrated	-	149 ^a	4 ^{b,c}	153	149	4 ^{b,c}	153
		+	1 ^d	25	26	0	26	26
		Total	150	29	179	149	30	179
	Concentrated	-	149 ^a	1 ^b	150	149	1 ^b	150
		+	1 ^d	28	29	0	29	29
		Total	150	29	179	149	30	179

^a: 2 prospective US showed an unclear result (trouble coloration in the migration area) with the bioNexia®, requiring a retesting that conclude to a negative result.

^b: 1 prospective US showed a positive result with the bioNexia®, remaining positive after heating. This urine sample yielded a negative result both with the BinaxNOW® and with the ELISA Binax *Legionella* EIA on concentrated and non-concentrated US. Moreover the sputum culture and the PCR *Legionella* and PCR *Legionella pneumophila* serogroup 1 were negative for this patient.

^c: 3 US from patients with confirmed *Legionella* infection yielded a negative result with the BinaxNOW®. These 3 US yielded a positive result after concentration.

^d: 1 US from patient with confirmed *Legionella* infection by *Legionella pneumophila* subgroup OXFORD (mAb 3/1-), known to be not detected by most of the urinary antigen reagents, yielded a negative result with the bioNexia®. This US yielded a positive result after concentration.

Conclusion: The bioNexia® with non-concentrated US showed performance close to the BinaxNOW® with concentrated US: 177 of 179 US tested presented concordant results. Only 2 US was misclassified, 1 as positive and 1 as negative that was revealed positive after concentration. Moreover, the bioNexia® with non-concentrated US showed better performance than the BinaxNOW® with non-concentrated US (3 positive US misclassified as

negative). These preliminary results are promising. To conclude about the bioNexia® performance a broader study with other independent centers will start soon.

2.1.2.3 Evaluation du test immunochromatographique bioNexia® Legionella (bioMérieux) pour la recherche d'antigènes urinaires de Legionella pneumophila (2ème évaluation)

Objectifs : Suite aux résultats précédents, une étude multicentrique incluant 3 centres dont le Centre National de Référence des Légionelles a été réalisées afin de comparer les performances du test bioNexia® Legionella à celles de 2 autres tests commercialisés : BinaxNOW® (Alere) et Sofia Legionella Fluorescence Immunoassay (FIA) (Quidel).

Matériels et Méthodes : Pour cette étude, le CNR a testé 100 prélèvements d'urines dont 59 en prospectif et 41 congelés provenant de patients présentant une légionellose confirmée. 19 échantillons avaient été prélevés sur tube contenant de l'acide borique. 160 autres échantillons ont été testés dans les autres centres participant à l'étude. Les échantillons d'urines ont été testés concentrés et non concentrés selon la technique de concentration par ultracentrifugation (Amicon Ultra-4; Millipore Corporation).

Résultats / Conclusion : Les résultats de cette étude n'ont pas encore été publiés. Les résultats obtenus au CNR montrent un gain de sensibilité par concentration de l'échantillon lors de l'utilisation du test bioNexia®.

2.1.2.4 Evaluation de différentes marques de filtres pour passage à la nouvelle norme des eaux

Quatre types de membranes filtrantes (provenant de 3 fournisseurs : Millipore, Sartorius et Whatman) ont été comparés lors de la mise en place de la nouvelle méthode d'analyse environnementale des légionelles selon la norme NF T90-431 v.2014. Des échantillons d'eaux réels et des suspensions dopées en Legionella ont été testés en parallèle sur les 4 types de membranes afin de comparer l'aspect des colonies sur ces membranes et leur nombre. Les résultats n'ont pas montré de différence significative en terme de dénombrement, mais des différences d'aspect des colonies et de facilité d'utilisation qui nous ont permis de choisir le modèle désormais utilisé en routine (membrane Millipore non quadrillée).

2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Dr Kahina SOUAMI, Maitre-assistante en biologie clinique/Faculté de Médecine d'Alger / Laboratoire de biologie médicale/Institut Pasteur d'Algérie, a réalisé un stage au CNR afin d'améliorer le diagnostic de légionellose à Alger puis en Algérie en diffusant les techniques de diagnostic biologique utilisées sur les prélèvements cliniques et en améliorant celles qui permettent la détection et la quantification des légionelles dans l'environnement.

2.2 Activités d'expertise : évolutions quantitatives et qualitatives en 2014

Le Tableau 1 résume de façon chiffrée l'activité du CNR pour l'année 2014 et son évolution depuis 2007.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2007 – 2014.

Analyses réalisées	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Sérologie	4609	3741	3271	3187	3100	2535	2744	2505
Culture de prélèvements cliniques	181	209	197	220	275	343	386	329
PCR sur prélèvements cliniques	192	193	110	134	128	104	193*	236*
Co-culture de prélèvements pulmonaires			170	213	205	340	304	262
Recherche d'antigènes urinaires	1615	1835	1977	1733	1913	1858	2035	1601
Identification de souches cliniques	233	213	224	283	263	307	323	340**
Identification de souches environnementales (études incluses)	1268	1144	611	1428	1140	893	1209	1233***
Prélèvements d'eau pour culture	543	640	614	383	512	479	629	640
Prélèvements d'eau pour PCR	67	150	240	53	228	257	166	37
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	55	50	49	44	45	62	51	46
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	490	423	416	711	916	835	575	480****
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested SBT)	-	-	38	93	102	112	140	143*****
Isolats <i>Legionella</i> analysés en SBT	98	232	602	437	415	409	401	382
Isolats <i>Legionella</i> analysés à l'aide de mAbs				669	717	532	581	502
Spoligotypage de souches Paris/ST1							41	101

* PCR *L. pneumophila*, *L. non pneumophila* et *L. pneumophila* séro groupe 1.

** Pour des raisons de cohérence avec les données de l'InVS, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2014 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2014.

*** 458 souches ont été adressées par un laboratoire extérieur, 775 ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL.

**** 358 isolats cliniques (dont doublons) et 122 isolats environnementaux.

***** 59 prélèvements étaient positifs pour au moins 1 gène.

2.2.1 Souches d'origine clinique

Parmi les 1346 cas notifiés en 2014, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 340 cas soit 25,3% des cas (contre 25,6% en 2013). La majorité des souches (333/340 soit 99,9%) était des *L. pneumophila* et 313 d'entre elles (92%) appartenaient au séro groupe 1 (Lp1).

Parmi les Lp1, 68 (21,7%) étaient des souches endémiques, parmi lesquelles 27 souches Louisa (8,6%), 22 souches Paris (7,0%) et 19 souches Lorraine (6,1%). Les autres souches étaient 11 souches Biarritz (3,5%), 25 souches de différents pulsotypes (A à G) (8,0%), 152 souches avec un profil déjà répertorié (48,6%) et 57 souches sporadiques (18,2%).

Comme les années précédentes, nous notons une fréquence importante (17,0%) de souches appartenant au ST23 en France (voir paragraphe 3.1.3).

En 2014, le fait le plus marquant est l'augmentation du nombre de souches de *L. pneumophila* séro groupe non 1 et de *Legionella non pneumophila* qui nous ont été adressées ou que nous avons isolées (respectivement 20 et 7 souches) (Tableau 2).

Parmi les cas pour lesquels l'antigénurie était documentée (n=20), celle-ci était systématiquement négative.

Parmi les 15 cas pour lesquels une PCR était documentée, celle-ci était positive chez 13 cas et non réalisée chez 2 cas pour lesquels c'est la mise en culture du prélèvement malgré une antigénurie négative qui a permis de poser le diagnostic.

Trois années après l'inclusion de la PCR comme critère probable de légionellose (voir paragraphe 2.2.2), celle-ci apparaît comme un outil permettant d'améliorer le diagnostic, en particulier lorsque l'antigène n'est pas détecté dans les urines par les tests commercialisés qui sont limités à la détection des Lp1.

En cas de forte suspicion de légionellose, lorsque l'antigène urinaire est négatif, nous recommandons donc de réaliser une PCR sur prélèvement pulmonaire afin d'améliorer le diagnostic de cas dus à des sérogroupes ou espèces probablement encore sous-estimés.

Nous n'avons pas identifié de facteurs de risque ou de degré de sévérité particulier pour ces 27 patients. En particulier, 5 souches de *Legionella longbeachae* ont été isolées en 2014. Parmi ces patients, nous n'avons pas retrouvé de lien épidémiologique, ni d'exposition à du terreau ou du compost, décrits dans la littérature comme étant associés à cette espèce.

Tableau 2. Evolution du nombre de souches d'origine clinique isolées en France depuis 2005 et répartition des isolements de légionelles par espèces et sérogroupes.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Legionella pneumophila</i>	272	220	224	210	222	280	259	304	321	333
séro groupe 1	263	188	218	203	211	270	248	294	305	313
séro groupe 2	1		1		2	2		2	2	3
séro groupe 3	1	4		1	3	1	2	6	9	6
séro groupe 4				1	1		4			
séro groupe 5	1	1	1	2		1	2		2	1
séro groupe 6	2	2		1	2	2		1	2	2
séro groupe 7		1	2		1		2		1	2
séro groupe 8	2	1	1	1	2	4	1	1		2
séro groupe 10		1								3
séro groupe 14				1						
séro groupe indéterminé*	2	2	1							1
<i>Legionella non pneumophila</i>	4	2	3	3	2	3	4	3	2	7
<i>Legionella dumoffii</i>						1		1	1	
<i>Legionella micdadei</i>		1				1	1			1
<i>Legionella longbeachae</i>	1	1	1	2		1	1	1	1	5**
<i>Legionella anisa</i>			1		1					
<i>Legionella gormanii</i>				1						
<i>Legionella bozemanii</i>	1						2	1		1
<i>Legionella feelei</i>	1									
<i>Legionella ciniciensis</i>	1									
<i>Legionella wadsworthii</i>			1							
<i>Legionella sainthelensis</i>					1					
Total	276	222	233	213	224	283	263	307	323	340

* réactions croisées entre les sérogroupes 5 et 13.

** 5 souches de *Legionella longbeachae* ont été envoyées au CNR pour identification et typage cette année. Ces 5 souches issues de prélèvements pulmonaires de patients (3 provenant de LBA, 1 d'aspiration et 1 non précisé) ont été isolées dans différentes villes (CH d'Avignon, CHU Georges Pompidou à Paris, CH de Tarbes, CHU de Poitiers et Laboratoire Cerba de St Ouen). Les patients étaient 3 hommes et 2 femmes avec une répartition d'âge de 46 à 77 ans. Trois ont été hospitalisés en service de réanimation.

En 2014, les souches d'origine clinique nous sont parvenues de 128 villes en France, pour la grande majorité de laboratoires de Centres Hospitaliers. Ces données qui étaient stables depuis 2011 montrent une légère augmentation de 8% depuis 2013 (Tableaux 3 et 4).

L'isolement de souches d'origine clinique a concerné 77 départements.

Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique.

Année	Nombre de souches d'origine clinique	Nombre de villes différentes d'où sont issues les souches d'origine clinique
2000	134	45
2001	150	52
2002	179	56
2003	181	53
2004	229	92
2005	276	83
2006	222	82
2007	233	103
2008	213	93
2009	224	100
2010	279	99
2011	263	115
2012	307	114
2013	323	119
2014	340	128

Tableau 4. Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2014.

Villes	Nombre de souches	Villes	Nombre de souches
Aix-en-Provence	3	Libourne	2
Ajaccio	1	Lille	3
Alès	1	Limoges	1
Amiens	2	Longjumeau	1
Angers	2	Lons le Saulnier	1
Angoulême	2	Lourdes	1
Annecy	3	Lyon	17
Arcachon	3	Marmande	1
Armentières	1	Marseille	1
Auch	3	Martignes	3
Aulnay sous Bois	2	Metz	5
Aurillac	2	Meaux	1
Avignon	3	Monaco	2
Bar le Duc	1	Montfermeil	1
Bayonne	5	Montbéliard	3
Beaune	2	Montpellier	3
Beauvais	2	Moulins	1
Belfort	8	Mulhouse	1
Besançon	2	Nancy	3
Béthune	1	Nantes	5
Béziers	2	Neufchâteau	1
Bordeaux	2	Nevers	2
Bourg en Bresse	3	Nice	5
Bourgoin Jallieu	2	Nîmes	1
Brest	2	Orléans	1
Cabestany	1	Paris	23

Caen	4	Pessac	1
Cahors	2	Poitiers	4
Castelnau le Lez	1	Pringy	4
Cergy Pontoise	2	Privas	1
Chalon sur Saône	2	Quimper	1
Chambéry	6	Reims	5
Charleville Mezière	1	Remiremont	1
Chartres	2	Rennes	1
Chaumont	2	Roanne	3
Cholet	1	Rodez	2
Clamart	5	Roubaix	2
Clermont Ferrand	6	Rouen	3
Colmar	5	Saint Briec	1
Colombes	4	Saint Denis	1
Compiègne	1	Saint Denis La réunion	2
Contamine sur Avie	2	Saint Dizier	1
Cornebarrieu	1	Saint Etienne	5
Creil	2	Saint Flour	1
Créteil	8	Saint Ouen	3
Dax	1	Saint Quentin	1
Dieppe	5	Sallanches	6
Dijon	1	Saverne	3
Dunkerque	5	Saint Claude	1
Fréjus St Raphael	3	Saint Martin d'Herès	1
Garches	1	Strasbourg	7
Grenoble	5	Tarbes	1
Hagueneau	1	Toulon	2
Hyerès	3	Toulouse	7
Ivry	1	Tourcoing	2
Jossigny	1	Tours	2
Kremlin Bicêtre	1	Valence	3
La Roche/Yon	2	Verdun	1
Laval	1	Versailles	4
Lavaur	1	Vesoul	7
Le Chesnay	1	Vienne	3
Le Havre	1	Villefranche de Rouergue	1
Le Mans	3	Villefranche sur Saône	3
Le Puy en Velay	3	Villeneuve d'Ornan	1

2.2.2 Prélèvements pulmonaires

Nous avons, conjointement avec l'InVS et les ARS, encouragé les laboratoires à adresser les prélèvements pulmonaires au CNR en cas d'antigénurie *Legionella* positive, lorsque la culture était négative ou qu'elle n'était pas réalisée dans le laboratoire d'origine. Par ailleurs, un nombre croissant de prélèvements nous a été adressé dans un contexte de forte suspicion de légionellose malgré un antigène urinaire négatif, afin que nous réalisions une PCR *Legionella*.

L'évolution de ces envois est présentée en Figure 1.

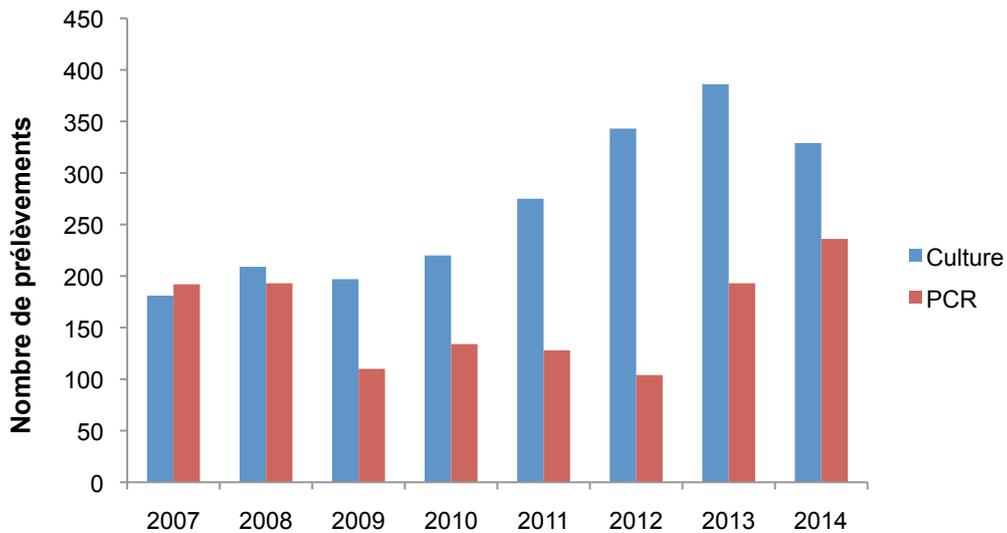


Figure 1. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR.

Le nombre de prélèvements mis en culture a régulièrement augmenté jusqu'en 2013. En 2014, la diminution de ce nombre (329 contre 386, soit -14,8%) est à relier à la mise en place d'un nouvel algorithme diagnostique permettant de mieux cibler l'indication de la culture, tout en intégrant la PCR dans la démarche diagnostique (Figure 2). En effet toutes les données de la littérature et les données du CNR montrent que la sensibilité de la PCR est constamment supérieure à la culture.

Le nombre de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires a ainsi augmenté en 2014 (236 contre 193 en 2013, soit +22,3%).

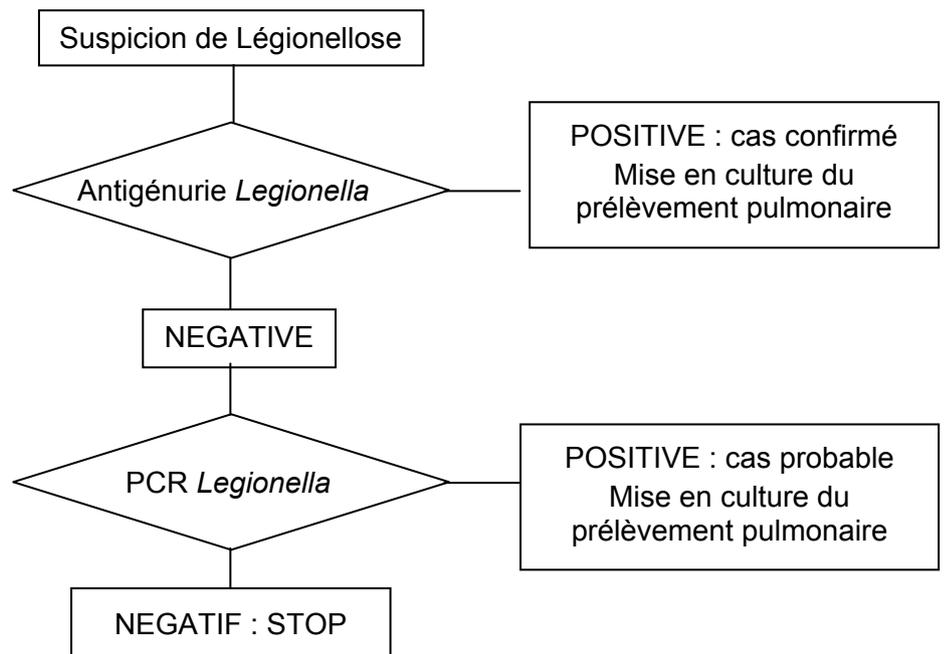


Figure 2. Algorithme décisionnel pour la réalisation de PCR ou la mise en culture des prélèvements pulmonaires.

En 2014, sur 329 prélèvements pulmonaires mis en culture conventionnelle (avec AgU positif ou PCR positive), 146 ont permis d'isoler des *Legionella* (44,4%). Parmi ces prélèvements, 262 ont également été mis en co-culture sur tapis amibien et 79 ont été retrouvés positifs pour *Legionella* (30,2%) dont 9 positifs en co-culture uniquement. Au total, des *Legionella* ont été isolées pour 155 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, soit 47,1%.

Lorsque la culture et la co-culture sont négatives, la Nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement.

En 2014, 143 prélèvements ont été analysés par Nested-SBT. Ces prélèvements appartiennent pour la plupart à des patients pour lesquels le diagnostic de légionellose a été posé par la détection d'antigènes urinaires et plus rarement par une PCR positive pour *L. pneumophila*.

Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 15 prélèvements. Pour 44 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié (Tableau 5).

Une absence d'amplification a été observée pour 59% des prélèvements analysés, ce qui confirme la tendance déjà observée en 2013 (57% en 2013).

Depuis ces dernières années, nous avons amélioré la sensibilité des techniques culturales pratiquées au CNR. La négativité de la Nested-SBT sur des prélèvements pour lesquels la culture est négative suggère que ces prélèvements présenteraient un faible inoculum bactérien.

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.

Année	Nombres de gènes pour lesquels un résultat est disponible								Nombre total de prélèvements
	7	6	5	4	3	2	1	0	
2009	16	5	2	4	2	2	4	2	37
2010	26	11	12	5	6	5	7	5	77
2011	14	10	7	6	3	8	12	3	63
2012	16	6	6	2	8	4	20	50	112
2013	16	6	4	5	7	11	11	80	140
2014	15	5	5	6	4	6	18	84	143

2.2.3 Confirmation de tests urinaires

En 2014, 27 urines testées avec différents kits mis sur le marché ont été reçues pour confirmation de résultats.

Pour la moitié d'entre elles (13/27), des résultats négatifs obtenus au CNR après chauffage (obtenus avec le test Binax™ EIA (Alere)) suggèrent des résultats faussement positifs obtenus dans le laboratoire expéditeur. Un chauffage des urines (5 min, 100°C) est vivement recommandé afin de diminuer le nombre de résultats faussement positifs (négatation après chauffage).

Les 14 autres urines nous ont été adressées pour confirmation de résultats positifs :

- soit parce que le résultat observé dans le laboratoire expéditeur était faiblement positif ;
- soit parce que le laboratoire expéditeur observait une discordance entre deux résultats (entre deux antigénuries successives ou entre une antigénurie et une PCR sur prélèvement respiratoire) ;

- soit parce que le laboratoire expéditeur utilisait depuis peu un nouveau test pour effectuer la recherche d'antigènes urinaires *Legionella* et qu'il voulait confirmer ses premiers résultats.

2.2.4 PCR sur prélèvements pulmonaires

Parmi les 236 PCR *Legionella* réalisées (kit commercial), 34 ont été positives permettant de poser le diagnostic de 27 légionelloses à *L. pneumophila* et 6 à *L. non pneumophila*. Les PCR sont réalisées en première intention chez les patients présentant un tableau clinique évocateur de légionellose mais une antigénurie négative.

Des PCR spécifiques de *L. pneumophila* séro groupe 1 (technique « maison », N. Merault et al. AEM 2011) ont été réalisées pour 21 des 27 cas de PCR positive à *Legionella pneumophila*. Dix étaient positives, dont 3 confirmées par culture et 5 par nested-SBT. Parmi les 11 PCR *Legionella pneumophila* séro groupe 1 négatives, 3 prélèvements ont présenté une culture positive pour *Legionella pneumophila* séro groupe non 1 (Lp2, Lp6, Lp7).

La PCR Lp1 est réalisée depuis 2014 sur l'ensemble des PCR positives pour l'espèce *L. pneumophila* afin de préciser la prévalence des cas de *L. pneumophila* séro groupe non 1. En cas de forte suspicion clinique, elle peut être également réalisée lorsque la (les) PCR *L. spp* et/ou *L. pneumophila* est (sont) négative(s) en raison d'une meilleure sensibilité. En 2014, la PCR Lp1 a été réalisée sur 3 prélèvements positifs en *L. spp* uniquement et sur 10 prélèvements négatifs en *L. spp* et *L. pneumophila*. Elle s'est révélée positive pour un cas pour lequel les PCR *L. spp* et *L. pneumophila* étaient négatives et pour un cas pour lequel seule la PCR *L. spp* était positive.

L'usage croissant des techniques de PCR pour le diagnostic de légionellose explique ainsi le nombre croissant d'infections documentées à *Legionella non pneumophila*, à *Legionella pneumophila* séro groupe non 1, mais également à Lp1.

Enfin, une PCR ciblant l'espace intergénique 23S – 5S et permettant un diagnostic d'espèce a été réalisée sur 3 des 6 cas pour lesquels seule la PCR *L. spp* était positive. Pour un cas, *L. bozemanii* a été identifiée par cette technique. Pour les 2 autres cas, la PCR 23S – 5S n'a pas permis de conclure quant à l'espèce en cause. Cette PCR n'a pas été réalisé sur les 3 autres prélèvements, du fait d'un faible signal en PCR *L. spp*. et d'une faible sensibilité connue de la PCR 23S-5S.

Les tendances observées en PCR montrant une augmentation du diagnostic des légionelloses à *L. pneumophila* séro groupe non 1 et *Legionella non pneumophila* sont donc superposables à celles observées par méthode culturale (voir paragraphe 2.2.1).

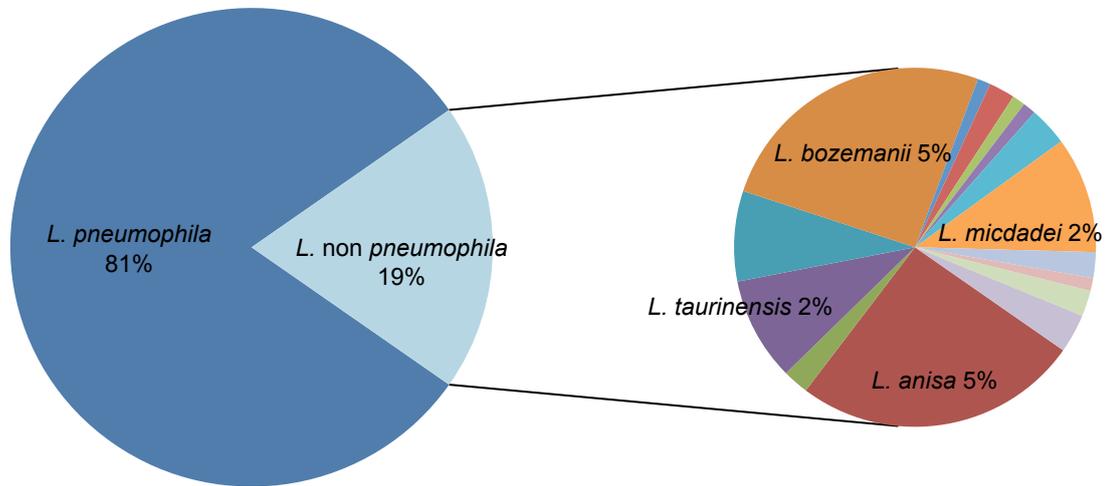
2.2.5 Souches d'origine environnementale

Parmi les 1233 souches d'origine environnementale identifiées au CNR en 2014, 458 souches ont été adressées par un laboratoire extérieur, et 775 ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL.

Les souches environnementales sont adressées au CNR (i) pour identification précise, ou (ii) pour typage lors de l'investigation de cas. La distribution des *L. non pneumophila* et des différents séro groupes de *L. pneumophila* des souches adressées au CNR est représentée dans les Figures 3 et 4.

Sur les 458 souches qui nous ont été adressées par un laboratoire extérieur, 16 n'étaient

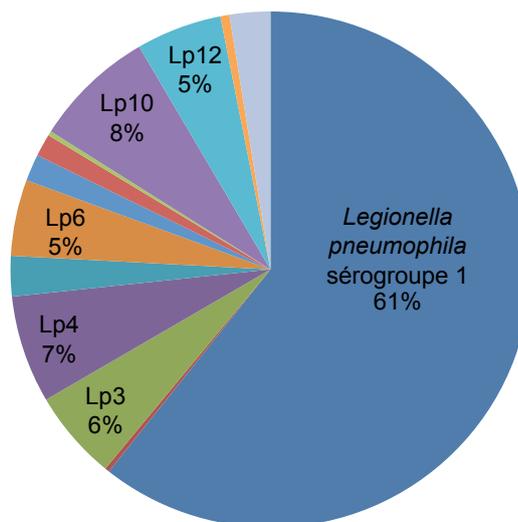
pas des *Legionella*. Parmi les 442 souches de *Legionella*, 19% étaient des *Legionella non pneumophila* (contre 7% en 2013) avec une diversité d'espèces plus importante (14 espèces différentes retrouvées en 2014 contre 6 en 2013). L'identification de ces souches a été réalisée par séquençage du gène *mip* (technique de référence) ou de l'espace intergénique 23S – 5S.



<i>L. non pneumophila</i>	Nombre de souches
<i>L. anisa</i>	22
<i>L. bozemanii</i>	22
<i>L. micdadei</i>	9
<i>L. taurinensis</i>	8
<i>L. nagasakiensis</i>	3
<i>L. londiniensis</i>	3
<i>L. rubrilucens</i>	2
<i>L. erythra</i>	2
<i>L. quinlivanii</i>	2
<i>L. maceachernii</i>	2
<i>L. dumoffi</i>	1
<i>L. feeleii</i>	1
<i>L. jordanis</i>	1
<i>L. shakespearei</i>	1
<i>L.spp</i> (non identifiée)	7
Total	86

Figure 3. Distribution en terme d'espèces des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2014.

Sérogroupe <i>L. pneumophila</i>	Nombre de souches
1	216
2	1
3	20
4	24
5	9
6	17
7	6
8	5
9	1
10	27
12	19
14	2
Indéterminé*	9
Total	356



* Réaction croisée entre deux sérogroupe.

Figure 4. Distribution en terme de sérogroupe des *L. pneumophila* adressées au CNR en 2014.

Au total, 775 souches ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL au CNR (Tableau 6).

Tableau 6. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupe des *Legionella* isolées de prélèvements d'eau des Hospices Civils de Lyon par le CNR en 2013 et 2014.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre de souches (2013)	Nombre de souches (2014)
<i>L. anisa</i>	304	472*
<i>L. fallonii</i>	3	0
<i>L. jordanis</i>	5	0
<i>L. micdadei</i>	7	0
<i>L. spp</i>		2
<i>L. pneumophila</i>	401	301
Total	720	775

* Un nombre croissant de *L. anisa* a été isolé en comparaison à 2013. La surveillance systématique de circuits d'eau de fauteuils dentaires à Lyon a permis d'identifier une colonisation récurrente de certains fauteuils par *L. anisa* malgré des traitements de l'eau. Cette surveillance reste active car des cas de légionelloses ont été décrits dans la littérature suite à la colonisation d'unit dentaires à *L. anisa*.

2.2.6 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats

En 2014, le CNR a répondu à 7 demandes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour des souches cliniques isolées chez des patients évoluant défavorablement sous antibiothérapie. Chez ces patients, la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques a été évaluée par réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide. Aucune résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine n'a été détectée phénotypiquement.

Parallèlement, suite au développement en 2013 d'une PCR permettant de détecter les mutations impliquées dans la résistance aux macrolides, nous avons recherché cette résistance pour 243 des 329 souches cliniques qui nous ont été adressées entre janvier et

septembre 2014. Les résultats étaient interprétables pour 233 souches. Nous avons également recherché les mutations associées à cette résistance directement sur 33 prélèvements pulmonaires, pour lesquels seulement 11 étaient interprétables en raison d'une moindre sensibilité de la technique lorsqu'elle est appliquée directement sur un échantillon clinique. Aucune *Legionella* résistante aux macrolides n'a été mise en évidence parmi les souches et prélèvements testés.

Dans le cadre d'une collaboration avec le CHU de Grenoble (laboratoire de Bactériologie, Pr Max Maurin) portant sur la résistance aux quinolones chez *Legionella*, le développement de techniques moléculaires permettant de détecter simultanément les mécanismes de résistance antibiotique aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine est en cours (voir paragraphe 8).

2.2.7 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués

- ADN de *L. pneumophila* séro groupe 1 Paris, Rita Rocha, Structural Biochemistry Group, IBMC - Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal.
- 5 isolats de ST345 envoyés à Christian Lück au centre de référence national allemand (ST responsable de l'épidémie en Allemagne en 2014).
- 3 ADN d'isolats ST109 et 10 ADN d'isolats ST47 envoyés à Tim Harrison au PHE de Londres dans le cadre de notre collaboration sur la mise au point d'une PCR spécifique du clone ST47.
- ADN génomique de 30 isolats ST1, 30 isolats ST47, 30 isolats ST23 et 6 isolats de ST proches du ST23 envoyés à Carmen Buchrieser à l'institut Pasteur de Paris dans le cadre de notre collaboration (paragraphe 6.1.3).
- 4 prélèvements d'urines à bioMérieux pour évaluation de leur réactif bioNexia[®]. Ces échantillons recueillis chez des patients présentant une légionellose confirmée étaient positifs avec le test BinaxNOW[®] *Legionella* (Alere) et Sofia FIA (Quidel).
- ADN à Christophe Sola (Infection Genetics Emerging Pathogens Evolution (IGEPE) Team, CEA-CNRS-Université Paris Sud) pour le spoligotypage (ADN témoin négatif : LG 1008 2010 et ADN témoin positif : HL 0428 3017, ADN souche CIP PARIS).
- distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à 31 laboratoires environnementaux dont 6 étrangers (Belgique, Danemark, Allemagne, Canada) (Figure 5).

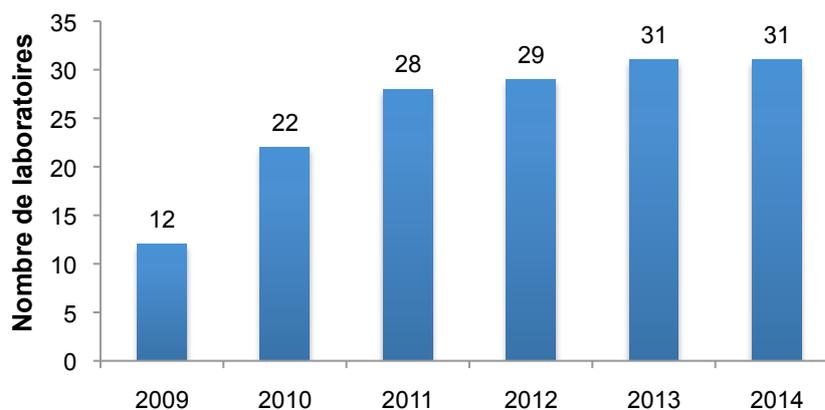


Figure 5. Evolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.1.1 Réseau de partenaires

Nos partenaires sont l'InVS, les Agences Régionales de Santé (ARS), la Direction Générale de la Santé (DGS), le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, les Cellules Inter-Régionales d'Epidémiologie (CIREs), les Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL), les laboratoires de microbiologie de CHG et de CHU, les laboratoires d'analyses environnementales, les équipes d'hygiène opérationnelles (EHO) et les cliniciens.

En 2014, nous avons été en contact avec 184 correspondants de Centres Hospitaliers pour l'activité clinique et 74 correspondants pour l'environnement (laboratoires privés et CH). Le réseau couvre l'ensemble du territoire Français. Nous avons été en contact lors d'investigations de cas avec près de 20 ARS et Délégations Territoriales associées.

La couverture et la représentativité de ce réseau s'est nettement améliorée depuis la mise en place conjointement avec la DGS et l'InVS de fiches de demande de typage de souches environnementales envoyées d'une part par l'ARS et d'autre part par le laboratoire environnemental après accord de l'InVS (fiches disponibles sur le site internet du CNR).

3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Depuis 2008, toutes les souches d'origine clinique reçues au CNR des légionelles et les souches d'origine environnementale reçues pour comparaison avec une souche clinique, sont systématiquement typées par 3 méthodes :

- utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs) ;
- analyse des profils de macrorestriction de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis* ou PFGE) ;
- amplification et séquençage nucléotidique (« Sequence Based Typing », SBT) de 7 gènes sélectionnés, qui est la méthode de référence européenne.

Pour les souches *L. pneumophila* séro groupe non 1, seules les techniques SBT et PFGE peuvent être appliquées. Pour les souches *L. non pneumophila*, seule la méthode PFGE peut être appliquée mais celle-ci n'a pas été développée pour toutes les espèces. Le pouvoir discriminant de cette méthode n'est pas clairement déterminé pour ces espèces.

Enfin la méthode de spoligotypage permet de sous-typier les souches *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1/pulsotype Paris.

En 2014, les cas avec souches isolées représentaient **25,3%** de l'ensemble des cas notifiés. Ce chiffre est en constante augmentation depuis 2008 et stable par rapport à 2013 (Figure 6).

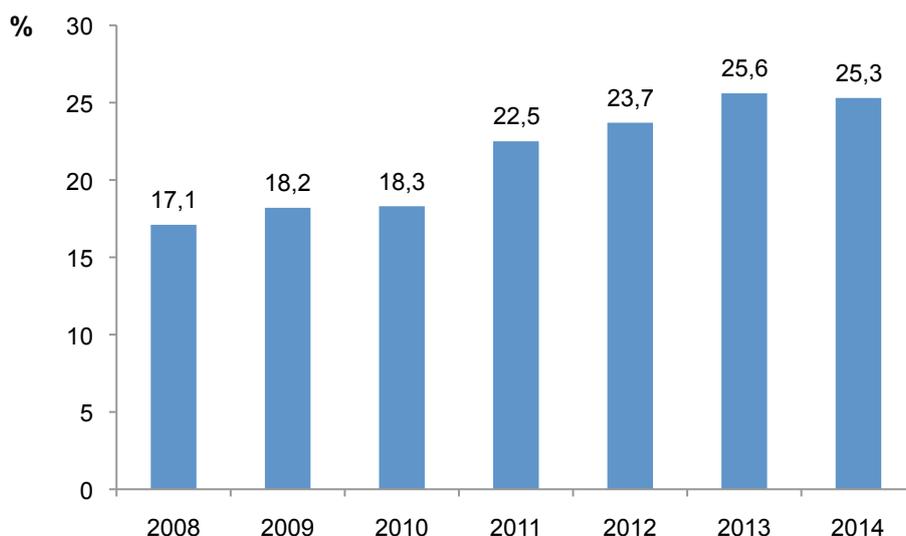


Figure 6. Pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France.

En Europe, 45% des isolats d'origine clinique disponibles sont isolés en France (323 / 720 isolats disponibles) (données ECDC Surveillance Report, Legionnaires' disease in Europe, 2013) ; les données de 2014 ne sont pas disponibles.

En 2014, 480 souches (358 souches humaines (dont des doublons) et 122 souches environnementales) ont été analysées par PFGE, 382 par SBT et 502 par anticorps monoclonaux.

3.1.3 Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances

- **Sous-groupage des souches *L. pneumophila* séro groupe 1**

La proportion des différents sous-groupes de *L. pneumophila* séro groupe 1 est relativement constante suivant les années avec une proportion importante des sous-groupes France / Allentown et Knoxville (Figure 7, Tableau 7).

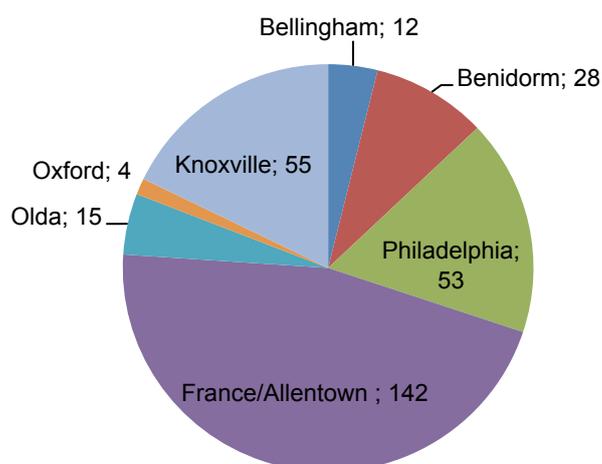


Figure 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 309 souches isolées en 2014.

Tableau 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.

Sous-groupe de Lp1	Nombre de souches	Pourcentage (%)
France/Allentown	936	49,3
Philadelphia	357	18,8
Knoxville	305	16,1
Benidorm	136	7,2
Sous total Mab 3/1 positive	1734	91,3
Olda	85	4,5
Bellingham	50	2,6
Oxford	24	1,3
Camperdown	7	0,4
Heysham	0	0,0
Sous total Mab 3/1 négative	166	8,7
TOTAL	1900	100,0

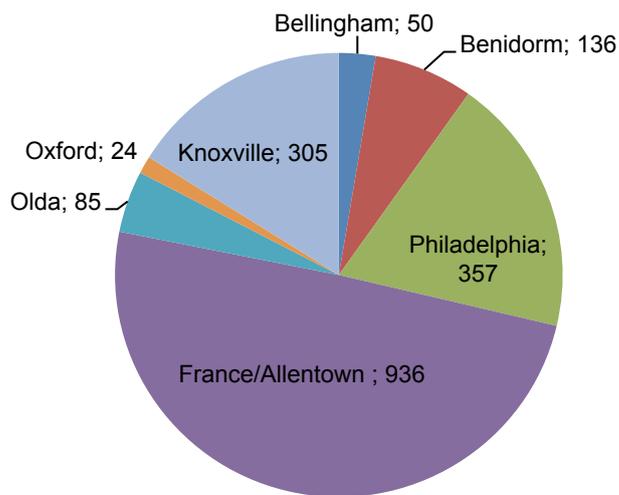


Figure 8. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.

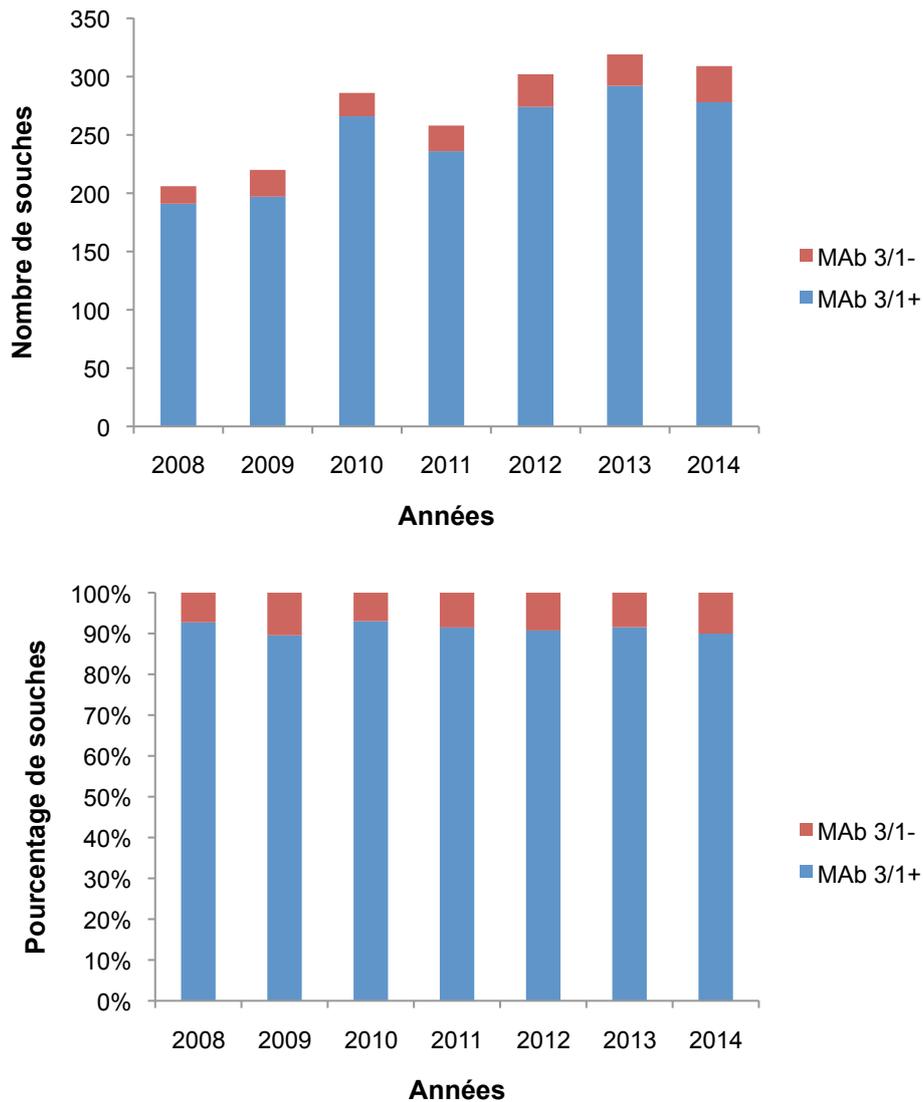


Figure 9. Répartition des 2 sous-groupes Mab 3/1 (+) et Mab 3/1 (-) de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 1900 souches isolées entre 2008 et 2014.

- **PFGE**

L'analyse systématique par PFGE des souches d'origine clinique depuis 15 ans montre une diminution chaque année de la proportion de souches sporadiques par rapport à l'ensemble des souches analysées (Figures 10 et 11). Cette diminution est liée en grande part à l'augmentation du nombre de profils présents dans notre base de données.

La caractérisation du caractère « sporadique » d'une souche est exacte lors de l'analyse et lors de la comparaison à la base de données mais évolue au cours du temps du fait de l'analyse des souches suivantes. Il est donc extrêmement difficile de mettre à jour ces données. La méthode PFGE a surtout une grande utilité lors des investigations de cas car c'est la méthode la plus discriminante disponible. Pour l'analyse plus globale de la population des *Legionella* présentes en France, la méthode SBT est utilisée.

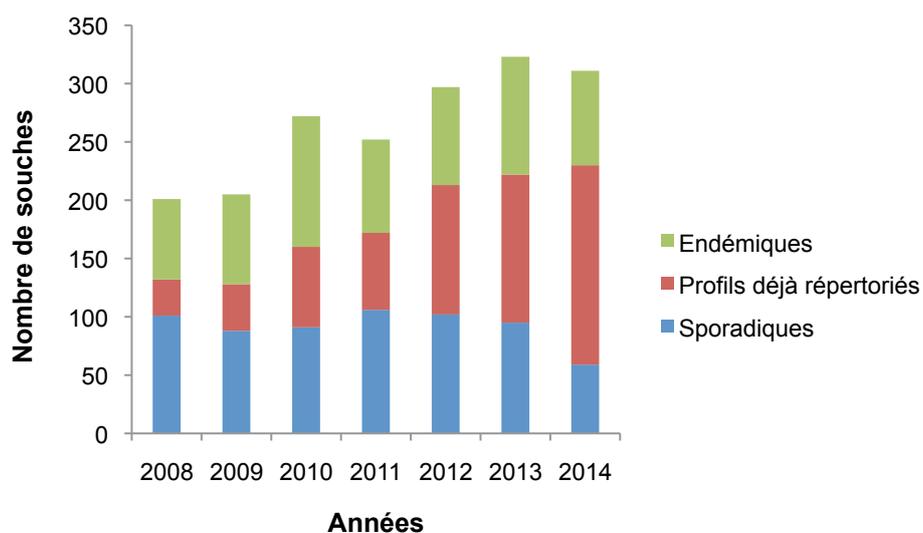


Figure 10. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR.

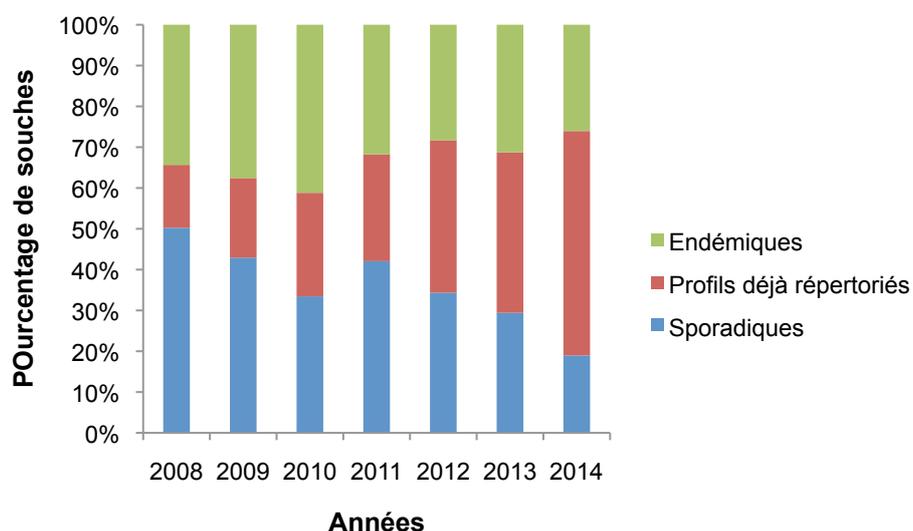


Figure 11. Evolution du pourcentage de souches présentant un pulsotype sporadique, endémique et un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes des souches cliniques du CNR.

- **Sequence Based Typing (SBT)**

En 2014, l'ensemble des Lp1 étudiées appartenait à 74 Sequence Type (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans le tableau 8. **Plus de 53% des souches appartiennent à 8 ST, les ST23, ST47, ST1, ST62, ST259, ST40, ST20, ST701.**

L'analyse de la distribution des différents STs a été réalisée sur une période de 7 ans de 2008 à 2014 (Tableau 8).

Tableau 8. Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2014 *.

ST	Années							TOTAL	%
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014		
23	40	47	55	57	53	57	57	366	19%
1	20	30	31	22	26	35	28	192	10%
47	23	14	31	30	26	29	20	173	9%
259	3	3	14	2	16	8	16	62	3%
40	6	11	11	2	7	11	15	63	3%
62	5	11	12	17	11	19	14	89	5%
701	0	6	4	5	5	8	11	39	2%
20	7	11	8	8	8	8	11	61	3%
444	4	2	4	5	6	4	10	35	2%
82	6	3	9	17	9	7	9	60	3%
94	3	3	8	0	7	9	8	38	2%
37	3	0	0	3	1	2	8	17	1%
42	1	4	4	4	9	11	7	40	2%
146	6	13	14	5	11	18	6	73	4%
9	5	2	4	4	12	3	6	36	2%
65	4	0	2	2	3	3	5	19	1%
44	2	3	3	3	5	4	5	25	1%
224	2	1	4	3	3	4	4	21	1%
75	4	2	1	4	4	3	4	22	1%
48	2	5	2	8	3	3	4	27	1%
Autres	67	63	71	63	85	89	79	517	26%
TOTAL	213	234	292	264	310	335	327	1975	100%

*Ces données sont issues des souches *L. pneumophila* reçues au CNR aux dates indiquées. Les chiffres indiqués peuvent être différents des chiffres des tableaux 1 et 2 qui prennent en compte les souches *L. pneumophila* et *L. non pneumophila* isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2014 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2014.

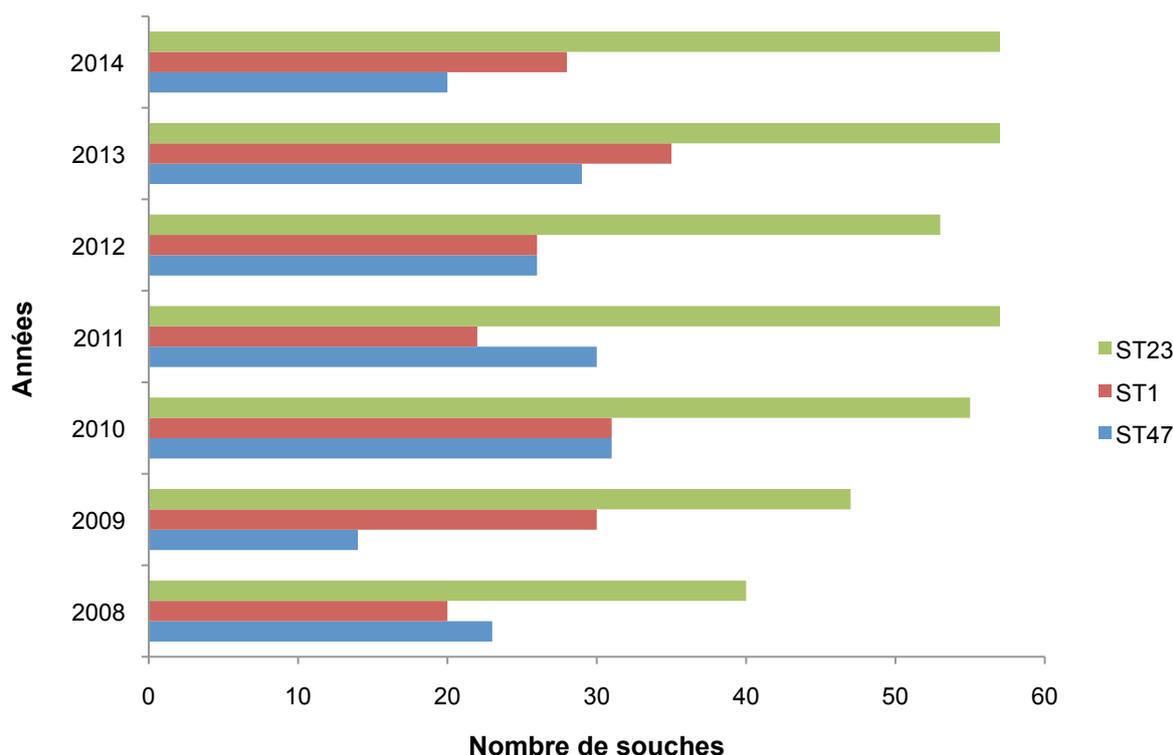


Figure 12. Evolution de la distribution des souches des principaux ST en France de 2008 à 2014.

Faits marquants depuis quelques années :

- **Prédominance des souches ST 23.**

Un des faits les plus marquants et qui persiste depuis plusieurs années est la fréquence importante des souches appartenant au ST 23 en France (près de 20% de l'ensemble des souches).

Nous avons mené et/ou participé à plusieurs études sur ce clone (voir paragraphe 3.4.2 et 6.1.3)

- **Emergence de différents ST**

Différents ST identifiés de façon plus ou moins régulière dans le passé semblent émergés ces dernières années. Il s'agit des ST20, 37, 40, 44, 62, 259 et 701. Le nombre de souches de chacun de ces ST n'atteint pas celui des 3 clones principaux isolés en France (ST1, ST23 et ST47) ; néanmoins, leur fréquence de détection augmente. D'après la base de données EWGLI, les ST 20, 40, 44 et 701 sont principalement isolés en France. Les ST 37 et 259 sont également isolés dans d'autres pays. Le ST259 a été identifié principalement aux Etats-Unis, le ST37 a été principalement identifié en Angleterre, aux Pays Bas et aux Etats-Unis.

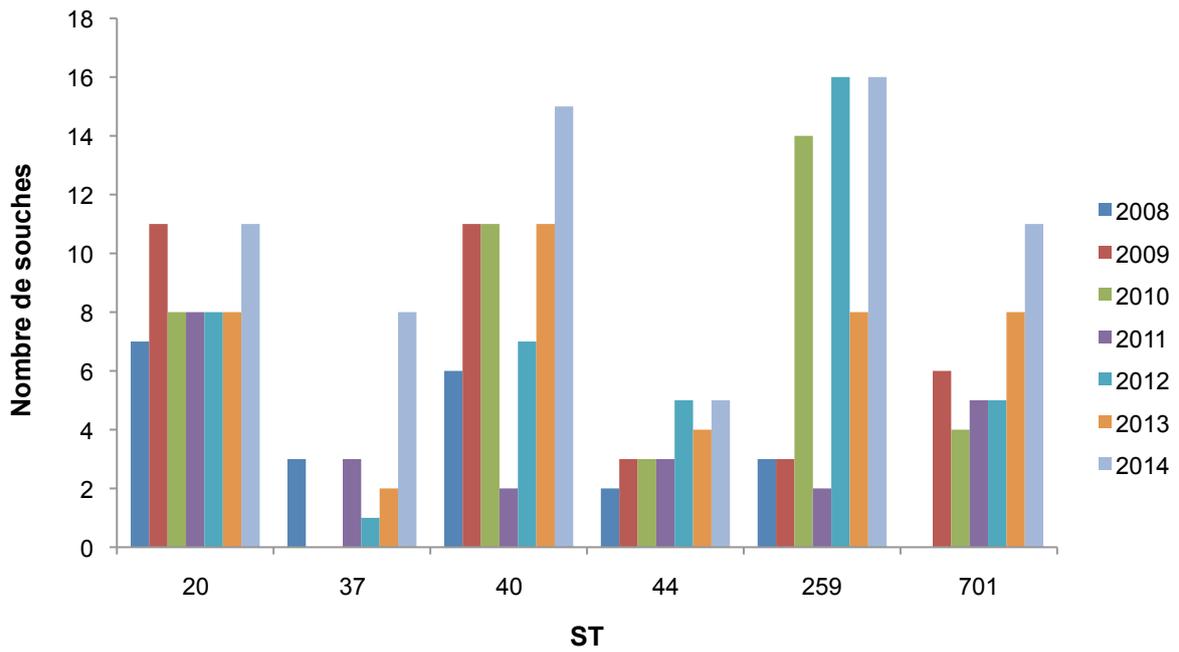


Figure 13. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2014.

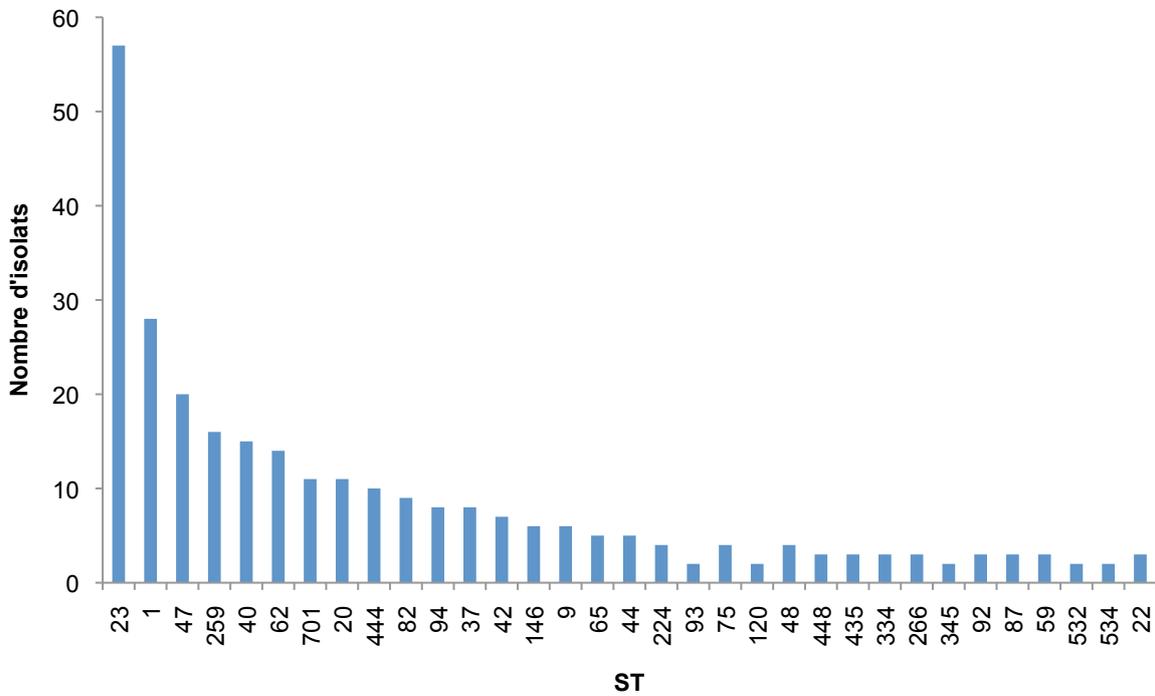


Figure 14. Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France en 2014.

3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées

La première souche clinique résistante aux fluoroquinolones a été décrite par Bruin *et al.* en 2014 (*J Antimicrob Chemother*, 2014 Oct;69(10):2869-71) chez un patient évoluant défavorablement sous ciprofloxacine. Cette première description justifie une veille constante sur l'apparition de résistance, notamment par la poursuite de nos travaux sur la résistance de *Legionella* aux antibiotiques.

La détermination de la sensibilité des souches cliniques de *Legionella* aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine n'est actuellement pas réalisée systématiquement au CNR. Elle apparaît justifiée et est réalisée dans les cas d'échecs thérapeutiques (cliniques et biologiques) pouvant faire suspecter une acquisition de résistance. L'échantillon de souches testées reste ainsi limité mais ciblé.

Néanmoins, en 2014, dans le cadre de l'évaluation d'une PCR détectant les mutations impliquées dans la résistance de *Legionella* aux macrolides, nous avons recherché cette résistance sur 243 souches cliniques et 33 prélèvements (voir paragraphe 2.2.6).

3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Aucune méthode de référence pour la réalisation des antibiogrammes de *Legionella* n'est actuellement définie.

Depuis 2009, le CNR dispose de techniques phénotypiques de détection de la résistance :

- méthode extracellulaire par microdilution en plaques multi puits, permettant de déterminer les CMI des antibiotiques ;
- méthode intracellulaire sur lignée monocyttaire permettant de déterminer les CMIE.

Une résistance est définie par une augmentation significative des CMI ou CMIE des antibiotiques de la souche testée par rapport aux CMI ou CMIE définies pour la souche de référence Paris.

En 2013 puis en 2014, afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche, le CNR a développé des méthodes moléculaires de détection de résistance aux trois classes d'antibiotiques indiquées dans l'antibiothérapie des légionelloses :

- mutations ribosomiques associées à un haut niveau de résistance aux macrolides (d'après des travaux réalisés au CNR en 2013);
- mutations sur l'ADN gyrase associées à la résistance aux fluoroquinolones (d'après les travaux décrits par Almahmoud *et al.*, 2009);
- mutations sur l'ARN polymérase associées à la résistance à la rifampicine (d'après les travaux de Nielsen *et al.*, 2000) (voir paragraphe 2.1.1.2)

Une résistance est définie par la présence d'une mutation attendue sur l'ADN amplifié.

Le développement et l'évaluation de ces PCR est décrit dans le paragraphe 8.

3.2.3 Résultats et analyse des tendances

Aucune résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones et/ou à la rifampicine n'a pour le moment été décrite pour des souches et prélèvements cliniques testés au CNR, suggérant une implication faible de ces mécanismes dans les échecs thérapeutiques.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

3.3.1.1 Périodicité

Les échanges avec l'InVS sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, fax, courriers postaux) et ont pour objectifs :

- de valider les cas de légionellose posant problème ;
- de s'informer des investigations en cours (résultats de typage, prélèvements adéquats à réaliser, etc) ;
- d'élaborer de nouvelles études ou analyses communes.

3.3.1.2 Echanges de données

- Notification du CNR à l'InVS des diagnostics par culture (par email et télécopie). L'InVS recoupe les informations avec les DO reçues. Cette notification systématique a pour objectif d'identifier les cas n'ayant pas fait l'objet d'une déclaration à l'ARS. En 2014, toutes les souches signalées sur la DO ont été transmises au CNR.
- L'InVS fournit toutes les informations utiles au CNR lors des investigations épidémiologiques. En retour, le CNR fournit par courrier les résultats de typage épidémiologique de la(les) souche(s) clinique(s) isolée(s) et de(s) souche(s) environnementale(s). Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.
- Un fichier Excel commun a été mis en place permettant d'associer des données du CNR et de l'InVS. Chaque fin d'année, les données de ce fichier concernant les cas de légionellose validés par l'InVS et le CNR sont finalisées par l'InVS (Christine Campese) et le fichier est renvoyé au CNR. Le bilan d'activité du CNR concernant la surveillance des cas de légionellose s'appuie sur ces données.

En 2014, dans le cadre du diagnostic des cas de légionellose et de l'investigation de cas, **496 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à l'InVS. Ce chiffre est relativement stable par rapport à l'année 2013 (557 courriers).

3.3.1.3 Analyses communes

- **Contribution à l'investigation des sources de contamination pour les cas sporadiques**

Parmi les 1346 cas de légionellose diagnostiqués en 2014 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2014), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **46 cas sporadiques** soit **3,4%** de l'ensemble des cas (Tableau 9).

Un isolement de *Legionella* par culture a été obtenu dans 25,3 % des cas. Une comparaison entre souche environnementale et souche clinique a ainsi été réalisée pour **13,5 %** des cas de légionellose avec souche.

Parmi les 46 investigations réalisées, les profils génomiques des souches cliniques et environnementale(s) se sont révélés identiques pour 31 cas (67%). Si le nombre total d'investigations réalisées en 2014 est plus faible que celui observé les années précédentes, les investigations semblent mieux ciblées avec un taux de positivité particulièrement élevé en 2014 (67%) (Tableau 9).

Ces souches environnementales étaient isolées de réseaux d'eaux sanitaires appartenant à 16 hôpitaux, 7 domiciles, 6 établissements de tourisme et 2 autres établissements (Tableau 10). Si l'on compare ces valeurs à celles de 2013, on note une augmentation du nombre de sources hospitalières identifiées comme l'origine de contamination (16 *versus* 9). Ces données sont à corréler au nombre d'investigations de réseaux d'eaux hospitalières réalisées (22 en 2014 *versus* 11 en 2013).

A noter que le nombre de tours aéro-réfrigérantes (TAR) investiguées en 2014 est limité et qu'aucune investigation n'a permis d'identifier une TAR comme source de contamination.

Tableau 9. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000.

Année	Total des investigations		Investigations positives	
	N		N	(%)
2000	25		13	52
2001	27		20	74
2002	25		15	60
2003	25		17	68
2004	39		22	56
2005	59		26	44
2006	49		26	53
2007	61		31	51
2008	50		26	53
2009	49		34	69
2010	48		29	61
2011	50		25	50
2012	66		29	44
2013	55		30	55
2014	46		31	67
Total	671		374	55

Tableau 10. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2014.

	Investigations positives		Investigations négatives		Total des investigations	
	N	%	N	%	N	%
Domicile	7	70%	3		10	22%
Tourisme	6	75%	2		8	18%
Hôpitaux	16	73%	5		22*	47%
Autre	2	67%	1		3	7%
TAR	0	0%	3		3	7%
TOTAL	31	67%	14		46	100

* Une investigation n'a pas permis de conclure formellement quant à la source de contamination.

Au total,

- parmi les domiciles investigués, 70% semblent être à l'origine de la contamination ; ce chiffre est similaire à 2013 ;
- près de la moitié des investigations (47%) l'ont été au sein d'un établissement de santé
- parmi les hôpitaux investigués, 73% semblent être à l'origine de la contamination ; ce chiffre est en augmentation par rapport à 2012 (54%) mais diminution par rapport à 2013 (82%). Sept cas sur 16 sont dus à des souches de pulso type Paris (ST1) (Tableau 11).

Tableau 11. Résultats des investigations réalisées ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination selon le pulsotype.

	Profil souches cliniques / environnementales							
	identique						différent	
	Total	Autres	Paris	Louisa	Lorraine	Mondial	Biarritz	
Domicile	10	5	1	0	0	0	1	3
Tourisme	8	6	0	0	0	0	0	2
Hôpitaux	21	7	7	0	0	0	2	5
Autre	3	2	0	0	0	0	0	1
TAR	3	0	0	0	0	0	0	3
TOTAL	45	20	8	0	0	0	3	14

3.3.1.4 Etudes collaboratives

- **Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue de cas de légionellose en France de 2010 à 2012**

- Communication en congrès Européen en 2014 (voir Paragraphe 3.3.1.5)
- Rapport publié en Juillet 2014 et mis sur le site de l'ANSES en Novembre 2014 : <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/EAUX2014-Ra-CNRLINVSRa.pdf>
- Publication internationale programmée en 2015

- **Analyse des facteurs de risque (facteurs d'hôte, exposition) associés aux trois génotypes principaux (ST23, ST1, ST47)**

Publication parue en 2015 dans *New Microbes and New Infection*.

Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires' disease cases in France

P. Cassier, C. Campese, Y. Le Strat, D. Che, C. Ginevra, J. Etienne and S. Jarraud

Abstract: In France, approximately 1200 cases of Legionnaires disease (LD) are reported annually, and isolates are available for approximately 20% of cases identified since 2000. All Legionella pneumophila serogroup 1 (sg1) isolates are characterized by sequence-based typing at the National Reference Centre. LD cases caused by L. pneumophila sg1 reported from 2008 through 2012 were considered for the study. Our study objective was to describe cases according to their sequence type (ST). We also constructed multivariable modified Poisson regression models to estimate the incidence rate ratio (IRR) and to identify characteristics potentially associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones. We studied 1192 patients infected by ST1 (n = 109), ST23 (n = 236), ST47 (n = 123) or other STs (n = 724). The geographic distribution of the ST23 cases across the country was significantly different compared to other ST groups. This genotype was significantly associated with the absence of corticosteroid therapy compared to ST1 (IRR = 0.56; p 0.016). Concerning exposure, the ST23 genotype was significantly less associated with hospital-acquired infections compared to ST1 (IRR = 0.32; p 0.001), but it was more associated with infections acquired in hospitals and elderly settings compared with ST47. Finally, the ST23 genotype was less frequently associated with travel than other STs. Despite the large number of cases of ST23 infection, we did not identify any characteristics specific to this ST. However, we identified independent associations between ST1 and nosocomial transmission and steroid therapy. These findings should encourage further exploration, especially in terms of environmental diffusion, strain virulence and host factors.

- **Etudes programmées pour 2015 :**
 - **Investigation du rôle de l'eau chaude sanitaire des domiciles dans la survenue des cas de légionellose.**
- La discussion de la mise en place d'un protocole d'étude est prévue en 2015.
 - **Investigation du rôle des appareils d'aérosolthérapie / d'apnée du sommeil dans la survenue des cas de légionelloses**

Pour chaque cas de légionellose utilisant ce type d'appareil, des prélèvements d'eau sont réalisés afin d'isoler des souches environnementales et de les comparer à la souche du patient. Aucune souche de légionelles n'a actuellement été isolée de ces appareils. Pour une investigation, une PCR Lp1 effectuée sur l'eau récoltée d'un appareil a été détectée positive et un *Sequence Type* (ST) a été identifié. Le ST était différent du ST de la souche isolée chez le patient. Ces investigations nécessitent une collaboration étroite entre l'InVS, les ARS et le CNR.

- **Impact de la météorologie pour expliquer le gradient Est / Ouest des cas de légionelloses en France.**

Cette étude sera menée principalement par l'InVS.

3.3.1.5 Publications / Communications communes en 2014

- Campese C, Descours G, Poirier R, Lhospitalier J, Che D, Jarraud S. Nuclear plants: are they a source of exposure for cases of Legionnaires' disease? Communication orale, 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014.
- Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires' disease cases in France. *New Microbes New Infect.* 2014 Nov 12;3:29-33.

3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Le CNR collabore au réseau européen de surveillance des légionelloses ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Le CNR participe tous les ans aux réunions et aux activités de ce réseau. Dans ce cadre, il est nommé comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau européen.
- Les données de typage par SBT de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation sont systématiquement envoyées afin de renseigner la base de données du réseau EWGLI (www.ewgli.org). En 2014, les données de 368 souches ont été renseignées, correspondant à 326 souches de patients et 42 souches environnementales. Au total, les données de 2698 souches ont été renseignées sur le site.
- Coordination avec Valeria Gaia (Suisse) d'une étude européenne sur l'évaluation des kits pour la détection des antigènes urinaires (groupe de travail, Soren Uldum, Tim Harrison). Cette étude sera proposée et rediscutée au prochain congrès ELDSNet / ESGLI à Londres.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.4.1 Evolution génétique de *Legionella pneumophila* : approche *in vivo* chez un patient immunocompétent

Objectifs : Identifier les facteurs d'adaptation chez le patient d'une souche de *L. pneumophila* et confronter ces données à celles de la littérature obtenues *in vitro*. Nous disposons au laboratoire de 17 isolats d'un même patient, isolés sur une période de 6 semaines. Nous avons séquencé le génome complet du 1^{er} et du dernier isolat dans le but d'identifier des marqueurs d'adaptation de la bactérie sélectionnés chez ce patient. Ces données ont été comparées aux résultats obtenus *in vitro* par Ensminger *et al.* après évolution de la bactérie dans une lignée cellulaire de macrophages. Chez le patient, la bactérie a été soumise à une pression de sélection antibiotique. Le séquençage du génome de l'isolat tardif pourrait permettre de mettre en évidence des marqueurs de résistance aux antibiotiques utilisés au cours du traitement.

Partenaires : Ces deux isolats ont été séquencés par la plateforme Genomic Technologies Facility de l'université de Lausanne. Le premier a été annoté par l'équipe LABGeM du génoscope.

Etat d'avancement & principaux résultats : Les deux génomes ont été séquencés, assemblés et annotés, l'analyse des séquences est en cours. Ils présentent néanmoins très peu de variations. Aucune différence observée entre les deux génomes n'est commune avec celle décrite par Ensminger *et al.*, aucune n'est liée à la résistance aux antibiotiques. L'analyse de la méthylation de ces génomes est en cours.

3.4.2 Séquençage d'un clone émergent de *Legionella pneumophila*

Un clone de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ST23 émerge ces dernières années en France (voir paragraphe 3.1.3). Nous avons séquencé et assemblé le génome d'un isolat clinique de ce clone par la combinaison des technologies Illumina et Pacbioscience. L'annotation de ce génome est en cours au niveau du Génoscope. La comparaison avec les génomes de référence disponibles est également en cours. Trente isolats de ce clone et six proches de ce clone ont également été séquencés dans le cadre du projet de séquençage massif de génome de *Legionella* (voir paragraphe 6.1.3).

3.4.3 Détection rapide par PCR spécifiques des clones majoritaires

Amélioration de la prévention de la légionellose et de la caractérisation de nouveaux réservoirs par **détection rapide par PCR spécifiques du clone *Legionella pneumophila* ST47 Lorraine**. Certains clones, notamment le ST47 sont responsables de près de 10% des cas de légionellose avec souche isolée alors que leur réservoir n'a pas été identifié. En effet ces souches ST47 sont exceptionnellement isolées dans l'environnement. La mise au point d'une PCR spécifique de ce clone ST47 permettrait d'investiguer des environnements en s'affranchissant de la culture.

Etude en cours réalisée par un étudiant en thèse d'Université (Pierre Cassier) et en collaboration avec le PHE de Londres (Tim Harrison). Ces travaux seront publiés en 2015.

4 Alerte

4.1 Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal et événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte en 2013

L'alerte de l'InVS est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Agnès Lepoutre et Christine Campese. La DGS est alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr). Aucune alerte n'a été lancée en 2014.

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

En 2014 et comme les trois années précédentes, aucune épidémie (10 cas et plus) suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée.

Parmi les 46 investigations réalisées, certaines ont retenu notre attention.

- **Investigation d'une augmentation du nombre de cas associés à la même souche à Aurillac depuis 2008**

Une alerte a été lancée suite à une augmentation du nombre de cas de légionellose diagnostiqués dans la région d'Aurillac depuis 2008. Sur la période 2008-2014, 13 cas de légionellose ont été dénombrés. Une souche clinique a été isolée pour 8 d'entre eux : il s'agissait d'une souche de *L. pneumophila* sérotype 1, pulsotype F, ST 259 et sous-groupe Philadelphia dans 7 cas sur 8.

Ces patients présentaient comme point commun :

- soit de résider à Aurillac ;
- soit de résider dans un périmètre de 10-15 km et d'être venu au moins une fois à Aurillac dans la période d'incubation.

Ces données font suspecter une origine de contamination commune. Des interrogatoires des cas ou de leur entourage concernant toutes les expositions possibles (grandes surfaces fréquentées, station de lavage de voiture...) ont été réalisés systématiquement pour chaque cas par l'ARS-DT15 et n'ont pas permis d'identifier d'origine commune.

Les investigations se sont ensuite portées sur de potentielles sources d'exposition commune :

- il existe dans l'agglomération d'Aurillac 3 sites industriels avec 5 à 6 tours aéro-réfrigérantes (TAR) connues. L'autosurveillance de ces TAR dans le périmètre d'investigation est réalisée par les industriels. En 2013, des contrôles inopinés avaient été effectués en présence de l'inspecteur des ICPE et de l'ARS et n'avaient pas mis en évidence de dépassement de seuil réglementaire. Fin 2014, une souche environnementale (isolée en quantité inférieure au seuil) a néanmoins été adressée au CNR pour comparaison : elle présentait des caractéristiques différentes des souches cliniques ;
- Une usine de plasturgie possédant une installation avec 8 laveurs d'airs (fonctionnant sur le même principe qu'une TAR) a été identifiée et également investiguée par l'ICPE et l'ARS en 2013 sans succès. Bien qu'il n'existe pas de réglementation spécifique pour ce type d'installation, dans ce contexte, des contrôles seraient mis en place au moins 2 fois par an.

Les données recueillies pour les souches ST 259 (83 souches, principalement cliniques) dans la base de données européenne (EWGLI) montrent une prédominance en France et suggèrent une potentielle source de contamination particulière.

En l'absence de source de contamination identifiée en 2014, d'autres investigations se poursuivent ou sont programmées :

- prélèvements de compost industriel ;
- campagne de prélèvements inopinés sur TAR et laveurs d'air déjà identifiés ;
- identification et investigation de potentielles TAR non répertoriées par l'ARS-DT15 en lien avec la préfecture du Cantal ;
- prélèvements dans une station d'épuration située dans le sud d'Aurillac.

Une vigilance particulière sera apportée par les différents acteurs (CNR, InVS et ARS-DT15) aux nouveaux cas déclarés en 2015.

- **Episodes successifs de légionellose chez deux patients**

En 2014, nous avons investigué, chez deux patients, deux épisodes de légionellose successifs par une même souche.

Ces deux observations relativement inhabituelles posent la question :

- d'une persistance d'une infection à bas bruit malgré une évolution clinique initialement favorable ;
- d'une nouvelle infection par une souche identique ;
- d'une récurrence de l'infection en lien avec une colonisation du tractus respiratoire qui jusqu'ici n'a jamais été démontrée.

Cas n°1

Il s'agit d'un homme de 75 ans, non fumeur, présentant une glomérulonéphrite secondaire à une polyangéite microscopique (PAM) avec atteinte pulmonaire prise en charge par corticothérapie et hémodialyse.

Dans un contexte infectieux sans point d'appel initial pulmonaire évident, une antigénurie *Legionella* revient positive. Un prélèvement de crachats permettra d'isoler des *L. pneumophila* séro-groupe 1, pulsotype Paris, ST 1, sous-groupe Olda. Une antibiothérapie par macrolide / fluoroquinolone permettra une évolution rapidement favorable (retour à domicile à J6, traitement total de 16 jours). Sur le plan de l'imagerie, un scanner pulmonaire montre à J63 une amélioration au niveau du parenchyme pulmonaire mais avec persistance de façon moins marquée des 2 foyers de condensation pulmonaire présents initialement.

Un second épisode de légionellose survient après 2 mois de guérison apparente et à J2 de l'introduction d'un traitement par rituximab (Ac anti-CD20) pour la rechute pulmonaire de la PAM. La PCR spécifique *Legionella* puis la culture reviennent positives sur un nouveau prélèvement de crachats. Cette seconde souche Lp1 présente les mêmes caractéristiques que celle du premier épisode. Une antibiothérapie par macrolide permettra à nouveau une évolution favorable.

Les antibiogrammes réalisés sur ces deux souches ne montreront pas de résistance. Aucune mutation associée à la résistance aux macrolides ne sera retrouvée par PCR.

Les investigations sur les réseaux d'eau chaude sanitaire du domicile du patient et de l'hôpital ne permettront pas d'identifier la source de contamination.

L'association de la légionellose à une récurrence pulmonaire de la polyangéite microscopique rend difficile la définition de la date de début des symptômes et de la période d'incubation.

La persistance des foyers primitifs et l'absence d'apparition de nouveaux foyers objectivés au scanner, le délai relativement court entre les deux diagnostics, un traitement par Ac anti-CD20 initié avant le second épisode, l'identité des caractéristiques des deux souches cliniques isolées et l'absence d'identification d'une source de recontamination rendent vraisemblable l'hypothèse d'une guérison incomplète du 1^{er} épisode plutôt que celle d'une ré-infection. Néanmoins, l'hypothèse d'une colonisation du tractus respiratoire (jamais démontrée) ne peut être formellement exclue.

Cas n°2

Il s'agit d'une femme de 70 ans atteinte d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) admise en réanimation pour SDRA sévère. L'antigénurie *Legionella* est négative. La PCR *Legionella* réalisée à partir d'un prélèvement de mini-LBA reviendra positive. On note également une co-infection virale à HSV et virus respiratoires. La culture permettra d'isoler des *L. pneumophila* séro-groupe 3, pulsotype sporadique, ST 87. L'évolution sera favorable après 20 jours de bi-antibiothérapie par macrolide et rifampicine.

La patiente sera à nouveau admise en réanimation pour un second épisode de SDRA plus de 4 mois plus tard. Entre temps, on note une évolution défavorable de sa LLC sur le plan hématologique. La PCR sur prélèvement naso-pharyngé puis la culture à partir d'un prélèvement distal protégé reviendront positives avec une souche identique à celle isolée lors du 1^{er} épisode. Un traitement par macrolide et fluoroquinolone est instauré. L'évolution sera à nouveau favorable.

Les antibiogrammes réalisés sur ces deux souches ne montreront pas de résistance. Aucune mutation associée à la résistance aux macrolides ne sera retrouvée par PCR.

Les investigations sur les réseaux d'eau chaude sanitaire du domicile de la patiente mettront en évidence des caractéristiques identiques entre les souches environnementale et clinique.

Dans ce second cas, les données cliniques et les investigations réalisées au domicile ne permettent pas de conclure quant à récurrence de l'infection ou à une ré-infection à domicile, qui néanmoins semble plus probable que dans le 1^{er} cas du fait de la colonisation du réseau d'ECS du domicile de la patiente. A l'inverse du cas n°1, l'absence de scanner ne permet pas de confirmer la persistance ou non d'un foyer pulmonaire.

- **Episode de cas groupés dans un établissement de santé sur plusieurs années confirmé par la méthode de spoligotypage**

Quatre cas de légionellose ont été diagnostiqués chez des patients ayant fréquenté le même service hospitalier sur une longue période : 1 cas en 2009, 1 cas en 2011 et 2 cas en 2014. Une souche était disponible pour les cas diagnostiqués en 2011 et 2014. Les souches présentaient les mêmes caractéristiques : ST 1, profil PFGE Paris, sous-groupe Philadelphia. Des souches environnementales isolées en 2009 et 2014 présentaient les mêmes caractéristiques. Cette souche étant endémique en France, la source de contamination ne pouvait être formellement identifiée, certains cas étant des cas nosocomiaux probables. La méthode de spoligotypage a permis de confirmer la source de contamination : les 3 souches d'origines cliniques (2009 et 2014) et les 2 souches environnementales (2009 et 2014) présentent le même spoligotype : SPL34. Parmi les 400 isolats ST 1 isolés dans toute la France et analysés en spoligotypage, seul un isolat issu d'une autre investigation présentait ce même spoligotype.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

5.1.1 Accueil de stagiaires

- Marie-Josèphe SOLAREK et Chantal MARTINET, formation pratique et théorique sur la recherche de *Legionella* dans les eaux, Laboratoire BOUVIER, ROANNE, 24 et 25 février 2014
- Docteur Kahima SOUAMI, Institut Pasteur d'Alger, transfert de techniques utiles au diagnostic des légionelloses, 22 – 26 Septembre 2014
- Joséphine Charavit, IUT Génie Biologique, 2^{ème} année, stage de fin d'études à

- temps plein : détermination de la sensibilité aux antibiotiques de 109 souches de *Legionella pneumophila*, 10 avril – 27 juin 2014
- Sylvain Ichouza, deuxième année de DUT Génie Biologique, 2^{ème} année, stage de fin d'études à temps plein : Caractérisation phénotypique d'une centaine de souches de *Legionella* : comparaison de la multiplication intra et extra cellulaire à l'aide de plasmides fluorescents, 10 avril – 27 juin 2014
- Nour el islem Refoufi : Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire, stage à temps plein : Identification et typage des souches *Legionella pneumophila* par anticorps monoclonaux : transfert méthodologique de l'IFI à l'ELISA, 2 juin – 30 août 2014
- Guillaume Maccio et Nicolas Vernet, Faculté de Pharmacie de Lyon, 5^{ème} année hospitalo-universitaire : participation à l'évaluation du kit urinaire bioNexia[®], avril – septembre 2014
- Réhane Ottaviani, IUT à l'Institut de Formation de Technicien de Laboratoire Médical (IFTLM) : Place de la méthode Maldi Tof pour l'identification et le typage des légionelles, 13 octobre - 19 décembre 2014
- Xavier Bernasconi, Master professionnel « Management des biobanques », Université Catholique de Lyon : mise en place de la base de données Bionumerics, 2 juin – 29 août 2014

5.1.2 Encadrement de thèses d'Université et Master Recherche en lien direct avec le CNR

Master 2

- Clémence Massip : Caractérisation de pompes à efflux TolC-dépendantes et rôle dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides, Master 2 Recherche Infectiologie Fondamentale, Université Lyon 1 (Encadrement G. Descours, septembre 2014 – juin 2015)
- Thomas Verger : Conception et mise en place de la base de données BioNumerics du CNR des Légionelles (Co-encadrement S. Jarraud, O. Dauwalder) (2014 – en cours), Master 2 Management des Biobanques de l'ESTBB (Ecole Supérieure de Biologie – Biochimie – Biotechnologies, Lyon)

Ingénieur Conservatoire des Arts et Métiers (CNAM), Paris

- Nathalie Jacotin : *Legionella pneumophila* et macrolides : développement et évaluation d'une PCR de détection de la résistance (Co-encadrement S. Jarraud, C. Ginevra), 2013-2014, soutenance le 22 mai 2014

Thèses d'Université, Université Claude Bernard Lyon 1

- Pierre Cassier : Particularités du clone ST 47 (Encadrement Jérôme Etienne)
- Marine Vandewalle : Caractérisation de l'effet de peptides antimicrobiens humains sur l'infection par *Legionella pneumophila* (novembre 2013 – en cours) (Co-encadrement C. Ginevra, S. Jarraud)
- Anne Gaëlle Ranc : Etude des facteurs bactériens associés à la sévérité de la légionellose (mars 2014 – en cours) (Co-encadrement G. Lina, S. Jarraud)

5.1.3 Enseignements, formations aux professionnels de santé

- Participation à l'organisation de la session dédiée au typage des *Legionella* - **Postgraduate Educational course – molecular typing methods for pathogens**, sous l'égide de la Société Européenne de Microbiologie et de maladies infectieuses (ESCMID) 30 Juin au 4 Juillet **2014**, Lyon - intervention de 3 groupes

ESCMID (ESGMD, ESGLI and ESGS). Il a regroupé près d'une trentaine de jeunes médecins, microbiologistes et vétérinaires venus de 15 pays différents. Ils ont pu écouter et échanger avec 18 experts européens impliqués dans la caractérisation moléculaire tant au niveau des outils les plus récents développés dans ce domaine que dans leur utilisation au quotidien. La partie théorique était complétée par des démonstrations techniques et par la prise en main des outils informatiques dans des salles équipées et dédiées à ces « travaux pratiques ». Le CNR des Légionelles a plus particulièrement participé par 2 présentations et à l'organisation de 2 après midi sur la technologie PFGE et d'une après midi sur l'analyse de données (PFGE et MLST/SBT).

- « *Legionella*, aspects épidémiologiques », UV Hygiène hospitalière & Stérilisation, Faculté de Pharmacie de Lyon, décembre 2014 (1h30), Lyon
- 2^{èmes} journées du GREPI, table ronde, 4 et 5 décembre 2014, Chantilly
- Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), Rennes
- *Legionella*, aspect diagnostique et épidémiologique, cours de Microbiologie, Institut Pasteur (2h), 3 octobre 2014, Paris
- *Legionella*, de l'amibe au macrophage, Master (2h30), 12 septembre 2014, Tours
- Les légionelloses à *Legionella* non Lp1 ; les mécanismes de résistance et les moyens de dépister la résistance aux antibiotiques, séminaire Hôpital Bichat, 6 juin 2014, Paris

5.2 Guides élaborés

Aucun guide n'a été élaboré en 2014.

5.3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

5.3.1 Rétro-information aux partenaires

- Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>) et d'un site spécifique dédié à l'ADN étalon en français et en anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon (voir ci-dessous).
- Les données de surveillance peuvent être publiées en collaboration avec d'autres institutions notamment l'InVS dans des journaux internationaux à comité de lecture :
Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. **Med Mal Infect.** 2015 Mar;45(3):65-71.
- Sur le site web EWGLI : mise en ligne de nos données de SBT dans la base de données européenne de SBT.

5.3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, site internet

Le site internet pour le Centre National de Référence des Légionelles est hébergé par le serveur de l'Université Claude Bernard Lyon 1 : cnr-legionelles.univ-lyon1.fr
Le portail des CNR (cnr.univ-lyon1.fr) comprend le CNR des Staphylocoques, le CNR des Légionelles, un site dédié à l'ADN étalon de *Legionella* (Légionelles ADN étalon) et ce même site en langue anglaise (*Legionella* standard DNA). Il propose des informations sur le

fonctionnement et les activités du CNR (prélèvements analysés, techniques utilisées...), les fiches téléchargeables pour l'envoi d'échantillons et les modalités d'envoi ainsi que des informations ponctuelles (enquêtes en cours ou symposium).

Le rythme des actualisations dépend de l'actualité mais une révision est prévue au minimum une fois par an. Le site sera révisé avant l'été 2015. Ce dernier rapport d'activité sera mis en ligne prochainement.

5.3.3 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activité...)

- Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne 5 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes (conseil diagnostique, thérapeutique, typage) et ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage). Les appels téléphoniques sont redistribués en fonction des demandes par les secrétaires. Les spécificités des correspondants (diagnostic clinique, lien de clonalité, environnement...) et leurs coordonnées sont indiquées sur les lettres de rendu de résultat ou au niveau du site internet. Depuis 2014, les appels téléphoniques sont consignés dans un fichier informatique Excel disponible pour chaque acteur du CNR qui annote les coordonnées du correspondant, le message/demande et l'action entreprise.
- Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation. Près de 500 courriers postaux ont été envoyés en 2014. Si une demande d'investigation a été faite, ces courriers sont doublés d'un message électronique résumant les résultats.
- Glossaires envoyés avec les courriers de résultats explicitant les méthodes de typage des souches employées et les souches endémiques décrites, mis à jour annuellement.

5.3.4 Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

- Nomination comme « *contact point – laboratory expert* » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010)
- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (Maud Baume)
- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : NF T90-431 Septembre 2003 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation (Maud Baume)
- Expertises de projet pour :
 - o Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
 - o Actions concertées Inter-Pasteuriennes (ACIP), Paris
 - o Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), Québec

6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours notamment celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1 Mécanismes de résistance de *Legionella* aux macrolides

Introduction :

Lors de travaux antérieurs (2013), nous avons sélectionné douze lignées de mutants hautement résistants aux macrolides à partir de la souche de *L. pneumophila* « Paris ». Nous avons identifié des mutations affectant les gènes codant l'ARN 23S et les protéines ribosomiques L4 et L22 et nous avons démontré leur rôle dans la résistance aux macrolides (Descours *et al.*, données non publiées).

Une étude bio-informatique a montré que les protéines Lpp2879 / Lpp2880 de la souche Paris présentent des homologies de séquence avec les protéines AcrA / AcrB d'*E. coli*, qui s'associent à la protéine TolC pour former une pompe à efflux (Gilbert *et al.*, données non publiées). Des travaux antérieurs sur *L. pneumophila* souche Lens ont montré que la protéine TolC jouait un rôle dans la multi-résistance, en particulier à l'érythromycine, chef de file des macrolides (Ferhat, Atlan *et al.* 2009).

Parmi les douze lignées résistantes aux macrolides, deux lignées présentent des mutations en amont de l'opéron *lpp2879-lpp2880* dans des régions pouvant correspondre au promoteur et au site de fixation du ribosome. Ces mutations pourraient majorer l'expression des protéines Lpp2879/Lpp2880 et induire une résistance par efflux via une pompe TolC-dépendante.

L'efflux pourrait ainsi constituer un mécanisme de résistance additionnel aux mécanismes ribosomiques identifiés lors de nos travaux antérieurs.

Objectifs :

- déterminer le rôle de Lpp2879 / Lpp2880 / TolC dans l'efflux des macrolides chez *L. pneumophila* souche Paris ;
- définir l'impact des mutations observées sur l'expression de cette pompe à efflux putative et leur contribution dans la résistance aux macrolides.

Etat d'avancement & principaux résultats :

Ces travaux sont actuellement menés par une étudiante en Master 2 Recherche (paragraphe 5.1.2). Dans un 1^{er} temps, à partir d'une souche Paris, nous avons délété les gènes codant les protéines Lpp2879 / Lpp2880. Les premiers résultats montrent une sensibilité accrue aux macrolides pour ces souches délétées, suggérant le rôle de la pompe à efflux Lpp2879 / Lpp2880 / TolC dans une résistance de bas niveau aux macrolides. Les travaux de complémentation sont en cours. L'étape suivante sera de définir l'impact des mutations observées en amont de la séquence codante par fusion traductionnelle avec un gène rapporteur.

6.1.2 Résistance de *Legionella* aux quinolones

Suite à une collaboration depuis plusieurs années avec le laboratoire de Bactériologie de Grenoble (Pr Max Maurin) sur la résistance des légionelles aux quinolones, une publication a été soumise début 2015 à *Lancet Infectious Diseases* : *Hidden selection of bacterial resistance to antibiotics in humans: the Legionella pneumophila paradigm*. Lubana Shadoud, Iyad Almahmoud, Sophie Jarraud, Jérôme Etienne, Sylvie Larrat, Carole Schwebel, Jean-François Timsit, Dominique Schneider, Max Maurin.

6.1.3 Legionella et peptides antimicrobiens

Objectifs : Evaluer la sensibilité aux peptides antimicrobiens (PAM) humains de différents isolats cliniques afin d'éventuellement comprendre la différence de prévalence de certains sérogroupes et de certains clones de *L. pneumophila*.

Partenariat et apport du CNR : Il n'y a pas de partenariat extérieur, l'apport du CNR est lié à son importante collection de souches caractérisées phénotypiquement et génotypiquement.

Etat d'avancement & principaux résultats : Nous avons pu démontrer l'importance de la phase de croissance de la bactérie dans sa sensibilité au peptide antimicrobien LL-37. La bactérie est sensible à LL-37 en phase exponentielle de croissance et résistante en phase post exponentielle. Nous avons également pu mettre en évidence l'implication de la modification du LPS dans la résistance à ce peptide.

6.1.4 Multiple independent pathogenic clones of Legionella pneumophila have emerged recently in unknown niches

Sophia David, Christophe Rusniok, Massimo Mentasti, Laura Gomez-Valero, Simon Harris, Christophe Ginevra, Laurence Ma, Christiane Bouchier, Anthony Underwood, Sophie Jarraud, Timothy Harrison, Julian Parkhill and Carmen Buchrieser.

Soumis à *The Lancet*, début 2015.

Background: *Legionella pneumophila* are environmental bacteria but also the causative agent of Legionnaires' disease, a severe pneumonia that may be fatal. Recently, five particular disease-associated strains defined by sequence types (ST) (STs 1, 23, 37, 47, 62) accounting for nearly half of the identified cases in Western Europe have been described. We aimed to understand their success in disease and how and when they evolved.

Method: Whole genome analysis was performed on 365 isolates, including 337 from the five disease-associated STs isolated between 1981 and 2013 (except one from 1947). Further 32 isolates representative of the species diversity were used to investigate their species context.

Findings: Single nucleotide polymorphism (SNPs) analyses revealed that over 96% of SNPs in all but the ST47 lineages have arisen *via* recombination. Non-recombinant mutations were very low (182 - 867 SNPs/lineage). Surprisingly, lineage ST47 showed no recombination and only a maximum of 19 SNPs between any pair of the 123 isolates analysed. Time-dependent phylogenetic reconstruction (BEAST) estimated that the ST37 and ST47 lineages emerged only in the second half of the last century. Strikingly, mutation rates are amongst the lowest observed in bacteria (0.71 and 0.22 substitutions/genome/year). Similar results were obtained for the remaining STs.

Interpretation: Dominant *L. pneumophila* disease-associated strains show high diversity originating from recombination events, a process likely allowing their rapid adaptation to environmental changes, despite their extremely low mutation rates. The few vertically inherited SNPs identified, suggest a very recent emergence. Intriguingly, the ST47 lineage shows no recombination, very few vertically inherited SNPs and their environmental source is not known. Thus, humans may have created new niches facilitating the emergence of disease causing strains. Furthermore one may speculate that ST47 strains have become human-adapted and humans may be acting now as vectors in their spread. This could explain both their recent emergence and spread.

6.1.5 Recherche de bio-marqueurs de virulence de Legionella pneumophila

Objectifs : La Légionellose est une pneumonie aiguë caractérisée par un polymorphisme clinique et une sévérité variable. En France, 98% des cas confirmés de légionellose sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en réanimation. Le taux de mortalité global est d'environ 10% et peut atteindre plus de 30 à 50% pour les patients en unités de soins intensifs. Dans une étude multicentrique prospective d'une cohorte de 595

cas confirmés de légionellose, nous avons récemment identifié des facteurs clinico-biologiques associés à une plus forte mortalité (C. Chidiac *et al.*, 2012). Cependant, à ce jour aucune donnée n'est disponible sur l'association entre certains facteurs bactériens et l'évolution péjorative de la légionellose. Les données de séquences génomiques complètes de souches Lp1 montre une diversité importante du génome accessoire (jusqu'à 10%). Le suivi épidémiologique régulier des souches Lp1 appartenant à la collection du CNR des Légionelles suggère que toutes les souches Lp1 n'ont pas le même potentiel pathogène vis-à-vis de l'Homme. L'objectif de ce projet est de réaliser une étude à large échelle d'expression différentielle de gènes (DGE) par RNA-Seq sur une trentaine de souches qui nous permettra d'identifier les déterminants de pathogénicité au niveau transcriptomique. En parallèle, le séquençage du génome de ces mêmes souches sera réalisé. Ces souches responsables d'infections sévères et non sévères seront issues de l'enquête nationale (2007-2009).

Partenaires :

Ce travail sera fait en collaboration avec G. Perrière, UMR CNRS 5558-LBBE, équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », Lyon 1 (projet financé par la FRM) qui apporte les compétences en analyses bio-informatiques.

Etat d'avancement & principaux résultats :

Les génomes de 32 souches ont été séquencés par la technologie Illumina Paired-end 300bp. Après contrôle qualité et nettoyage des séquences, ces données ont été utilisées pour évaluer la qualité des assemblages obtenus par 6 assembleurs. Le pipeline contrôle qualité, nettoyage et assemblage des séquences a été transféré du laboratoire de bio-informatique au CNR. La comparaison de ces génomes est en cours.

6.2 Publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

6.2.1 Publications nationales

Travaux réalisés en 2014, publiés en 2015

1. Campese C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, Jarraud S. Legionnaires' disease in France. **Med Mal Infect.** 2015 Mar;45(3):65-71.

6.2.2 Publications internationales

1. Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaire's disease cases in France. **New Microbes New Infect.** 2014 Nov 12;3:29-33.
2. Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C. Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. **Genome Biol.** 2014;15(11):505.
3. Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refrégier G, Jacotin N, Sola C, Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. **J Clin Microbiol.** 2014 Jul;52(7):2410-5.

4. Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. **J Microbiol Methods**. 2014 Mar;98:119-21.
5. Abdel-Nour M, Duncan C, Prashar A, Rao C, Ginevra C, Jarraud S, Low DE, Ensminger AW, Terebiznik MR, Guyard C. The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation and pathogen-phagocyte interactions. **Appl Environ Microbiol**. 2014 Feb;80(4):1441-54.

Patents

In vitro method for detecting *Legionella pneumophila* strain resistant to fluoroquinolones comprises detecting mutation on specified position or equivalent in relation to specified amino acid sequence in DNA gyrase subunit A protein.

Patent number(s): FR3007770-A1 ; WO2014207347-A1. Inventor(s): Maurin M, Schneider D, Shadoud L, Jarraud S, Timsit JF, Etienne J.

Travaux réalisés en 2014 ou précédemment et soumis en 2015

1. Fabrice Compain, Benjamin Rossi, Clémence Richaud, Emmanuel Guerot, Hidayeth Rostane, Sophie Jarraud, and Isabelle Podglajen. A 44-year-old kidney transplant patient with pneumonia, accepté dans *Journal of Clinical Microbiology*.
2. Beraud L, Gervasoni K., Freydiere AM, Descours G, Ranc AG, Vandenesch F., Lina G, Gaia V., Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA in comparison with the BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card in two national reference centers. Soumis en 2015 à *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
3. Botelho-Nevers E, Grattard F, Jarraud S, Marcuccilli A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P. Diagnosis of pneumonia in hospitalized patients: comparison of real time PCR on sputum, culture, urinary antigens and serology assays for diagnosis of Legionnaires' disease, soumis en 2015 à *Journal of Clinical Microbiology*.
4. Sophia David, Christophe Rusniok, Massimo Mentasti, Laura Gomez-Valero, Simon Harris, Christophe Ginevra, Laurence Ma, Christiane Bouchier, Anthony Underwood, Sophie Jarraud, Timothy Harrison, Julian Parkhill and Carmen Buchrieser. Multiple independent pathogenic clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently in unknown niches, soumis en 2015 à *Lancet*.
5. Lubana Shadoud, Iyad Almahmoud, Sophie Jarraud, Jérôme Etienne, Sylvie Larrat, Carole Schwebel, Jean-François Timsit, Dominique Schneider, Max Maurin. Hidden selection of bacterial resistance to antibiotics in humans: the *Legionella pneumophila* paradigm, soumis à *Lancet Infectious Diseases* en 2015.
6. Cassier P, Bénét T, Nicolle MC, Brunet M, Buron F, Morelon E, Béraud L, Descours G, Jarraud S, Vanhems P. Community-acquired Legionnaires' disease in a renal transplant recipient with unclear incubation period: the importance of molecular typing. Case report soumis en 2015.

6.2.3 Communications nationales

Communications nationales orales

- Gérard Lina, 2^{èmes} journées du GREPI, table ronde Légionellose, Chantilly, les 4 et 5 décembre 2014

Communications nationales affichées

Néant

6.2.4 Communications internationales

Communications internationales orales

1. Campese C*, Descours G, Poirier R, Lhospitalier J, Che D, Jarraud S. Nuclear plants: are they a source of exposure for cases of Legionnaires' disease? 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
2. Rusniok C*, David S, Mentatsi M, Gomez-Valero L, Ginevra C, Underwood A, Jarraud S, Harrison T, Buchrieser C, Parkhill J. Whole genome sequencing identifies multiple independent recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
3. Evgeni Tsvitsivadze, Tjeerd van der Ploeg, Nico J Nagelkerke, Jeroen W Den Boer, Sophie Jarraud, Carmen Pelaz, Maria L Ricci, Maria Scaturro, Stefano Fontana, Sjoerd M Euser, Jacob Bruin, Frank Schuren. Semi-supervised domain adaptation approach for development of microarray-based data prediction models of *L. pneumophila* strains. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014

Communications internationales affichées

1. Jacotin N, Ginevra C, Beraud L, Descours G, Jarraud S. Hospital-acquired Legionnaires' disease cases confirmation using microbeads-based spoligotyping. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
2. Beraud L, Maccio G, Vernet N, Descours G, Jarraud S, Freydière AM. Evaluation of the bioNexia[®] *Legionella* in comparison with the BinaxNOW[®] *Legionella* urinary antigen card : preliminary results. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014
3. Freydière AM., Gervasoni K., Descours G., Vandenesch F., Lina G., Gaia V., Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA in comparison with the BinaxNOW[®] *Legionella* Urinary Antigen Card in two centers. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
4. Lück C., Jarraud S., Ehricht R., Engelmann I., Jacotin N., Meyer T., Petzold M., Slickers P., Ziegler A. and Monecke S. Microarray-based strain assignment of *Legionella pneumophila* isolates. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
5. Descours G., Jacotin N., Forey F., Chastang J., Etienne J., Lina G., Ginevra C., Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014

6. Cassier P., Campese C., Le Strat Y., Che D., Jarraud S. Association between ST1 clone of *Legionella pneumophila* and hospital exposure: what's the trigger? 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin 2014
7. C. Rusniok, S. David, M. Mentasti, L. Gomez-Valero, S. Harris, C. Ginevra, A. Underwood, S. Jarraud, T. Harrisson, C. Buchrieser, J. Parkhill. Whole genome sequencing identifies recently emerged clones of *Legionella pneumophila*. Microbiology after the genomics révolution: Genomes 2014, Institut Pasteur, Paris, France, 24-27 juin 2014

6.2.5 Conférences sur invitations

1. Descours G. Detecting *Legionella* in environmental and clinical samples. A critical review of the current methods. 2nd ESGLI congress, Barcelone, Espagne, 17-19 septembre 2014.

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Du fait de l'écologie des légionelles, Le CNR des légionelles n'a pas de lien avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR.

Collaborations dans le domaine de l'environnement :

- Participation active au groupe de travail de la révision de la norme AFNOR NFT90-431 (Maud Baume) ;
- Distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à 31 laboratoires environnementaux dont 6 étrangers (Belgique, Danemark, Allemagne, Canada) ;
- Partenariat avec LGC Standards, distributeur de matériaux de référence en microbiologie, afin qu'ils distribuent l'ADN étalon et le CQE auprès des potentiels clients à l'étranger. Ces matériaux sont disponibles sur le site : <http://www.lgcstandards.com>.
- Accueil de stagiaires de laboratoires environnementaux pour la détection des légionelles dans l'environnement (norme NFT90-431) (voir Chap. 5.1.1).

L'une des préoccupations du CNR est l'identification de nouvelles sources de contamination. Les appareils d'aérosolthérapie ou d'apnée du sommeil pourraient constituer une source de contamination. Même si des données épidémiologiques laissent suggérer cette association, aucune preuve microbiologique n'est actuellement disponible. Nous avons donc organisé avec l'InVS et en rapport avec les services environnementaux (ARS, équipes d'Hygiène des hôpitaux) de recevoir l'eau de ces appareils pour analyse microbiologique. Quatre appareils ont été analysés en 2014. La culture a été systématiquement négative. Une PCR Lp1 réalisée sur 2 appareils a été positive pour l'un d'entre eux. La méthode de Nested-SBT appliquée sur l'ADN a permis d'identifier un ST, différent de celui du patient. Néanmoins, nous avons montré que de l'ADN de *L. pneumophila* sérotype 1 était présent dans l'eau d'un appareil d'apnée du sommeil.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Les perspectives et grandes lignes du programme d'activité du CNR pour les deux années à venir sont les suivantes :

1. En 2013, les perspectives pour les années suivantes étaient : l'évaluation de l'apport des nouvelles technologies de séquençage haut débit (NGS) pour le diagnostic clinique, la recherche de variants résistants aux antibiotiques, et la place du séquençage de génome complet dans l'épidémiologie moléculaire et l'évolution de la bactérie chez le patient.

En 2014, nous avons commencé à évaluer la place du séquençage de génome complet (de novo whole genome sequencing) dans l'épidémiologie moléculaire locale (enquêtes épidémiologiques) et globale (émergence de clones) (cf. chapitres 2.1.1.4, 3.4.2 et 6.1.4). Nous avons également étudié l'évolution de la bactérie au cours de l'infection par le séquençage du génome complet d'un isolat précoce et tardif issus d'un même patient (cf. chapitre 3.4.1).

En 2015, nous continuons à mettre en place le séquençage de génome complet à visée épidémiologique.

Nous développons également une approche de recherche de variants résistants aux antibiotiques, en particulier la recherche de sous-populations minoritaires de légionelles résistantes aux traitements, directement à partir du prélèvement respiratoire par séquençage NGS ciblé des régions impliquées dans la résistance aux quinolones, macrolides et rifampicine.

Dans les années suivantes, nous nous intéresserons aux approches utilisant le NGS dans le diagnostic infectieux : l'objectif est de séquencer une ou plusieurs régions spécifiques de microorganismes à partir d'un prélèvement clinique.

- Une approche consiste à amplifier l'ARNr 16S et séquencer l'ensemble des amplicons en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des bactéries présentes dans le prélèvement.
- Une autre approche est la capture ciblée de plusieurs ADN de microorganismes suivi de leur séquençage en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des pathogènes recherchés.

2. Une des grandes implications du CNR sera sur l'étude des facteurs pouvant être impliqués dans la sévérité des légionelloses. Pour cela nous souhaitons :

- étudier les facteurs bactériens par des approches de génomique et transcriptomique associés à la sévérité des cas de légionelloses (projet financé par la FRM) (chapitre 6.1.4) ;
- identifier des facteurs de génétique d'hôte et des facteurs environnementaux (microbiotes pulmonaires au cours de la légionellose) pouvant être associés à la sévérité de l'infection. Pour cela nous souhaitons suivre une cohorte de patients. Un projet a été déposé à l'appel à projet ANR/DGOS.