

**Plan du rapport annuel  
d'activité**

**2017**

**Centre National de  
Référence des Légionelles**

**Année d'exercice  
2016**

**Dr Sophie Jarraud & Pr Gérard Lina**

Centre de Biologie et de Pathologie Nord

Institut des Agents Infectieux

Hôpital de la Croix-Rousse

103, Grande rue de la Croix-Rousse

69317 Lyon Cedex 04

# Résumé analytique

- **Enjeux de Santé Publique**

\* Un total de **1218 cas** de légionellose a été notifié en France en 2016, *versus* 1389 cas en 2015. Ce **chiffre est relativement stable** depuis 2005, variant entre 1200 et 1500 cas, **malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires** de surveillance et traitement notamment des tours aéroréfrigérantes, des réseaux d'eau des établissements de Santé, des hébergements pour personnes âgées, mesures qui ont été étendues récemment aux réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements recevant du public.

Les objectifs sont de maîtriser les sources de contamination potentielles et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'à présent.

\* La légionellose reste une infection sévère avec une **létaleté globale** estimée à **11,4%**.

L'un de nos 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, une 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'évaluation de l'apport 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 ;
- la veille constante sur l'apparition de résistance des légionelles aux antibiotiques ;
- 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 2016**

\* Alors que plus de 2350 *Sequence Type* (STs) sont répertoriés dans la base de données européenne, **8 ST** (ST23, ST1, ST47, ST62, ST259, ST146, ST40, ST20) sont responsables de **plus de 50% des cas de légionellose en France**.

\* Un isolement de *Legionella* par **culture** à partir de prélèvements pulmonaires a été obtenu pour **24,6% des cas** diagnostiqués. Ce pourcentage, qui reste insuffisant, est **stable** par rapport à l'année précédente (24,9%), et plus globalement par rapport aux cinq dernières années. L'amélioration de ce taux d'isolement de souches est une priorité pour :

- documenter les sources de contamination ;
- permettre une meilleure connaissance des clones majoritaires responsables d'infection chez l'Homme et une meilleure compréhension de la maladie.

\* La **PCR**, incluse dans les critères de déclaration d'un cas de légionellose depuis 2011, représente en 2016 **9% des diagnostics** en France.

\* Une des révolutions majeures ces dernières années est l'utilisation du séquençage de génome complet en microbiologie. Nous avons mis progressivement en place et développé les outils bio-informatiques nécessaires pour l'utilisation du séquençage de génome complet de *Legionella* à visée épidémiologique permettant l'analyse de **222 isolats par NGS en 2016**.

\* Le **faible nombre d'épisodes de cas groupés** montre que la réactivité des partenaires impliqués dans la surveillance et la gestion des épisodes au niveau régional est primordiale pour limiter l'ampleur d'un épisode.

\* Une seule investigation a concerné plus de 10 cas et rapportait un excès de cas sur **l'île de la Réunion** où **20 cas** avaient été notifiés **en 6 mois**. Aucune source commune de contamination n'a pu être identifiée lors des investigations.

\* Moins de 5% de l'ensemble des cas de légionellose déclarés chaque année fait l'objet d'investigations environnementales à la recherche de la source de contamination.

\* Plus de **65% des domiciles** investigués semblent être à l'origine de la contamination de cas isolés. Une étude devrait être mise en place avec Santé Publique France afin de mieux caractériser le rôle du domicile comme source de contamination.

\* L'analyse de prélèvements **d'eau froide de cuvettes de toilettes** a permis d'isoler des *Legionella pneumophila* sérogroupe 1, suggérant, à l'aide des données de NGS, cette source de contamination pour un patient.

\* Les cas liés à l'utilisation d'appareils à pression positive continue pour le traitement de l'apnée du sommeil sont moins nombreux qu'en 2015 mais une vigilance de l'utilisation de ces appareils selon les préconisations de l'ANSM est à poursuivre en investiguant systématiquement chaque cas concerné par cette situation.

- **Points clés**

- Seul un nombre restreint de STs est associé à l'infection de l'Homme. Une priorité doit être donnée pour permettre l'identification rapide des sources contaminées par ces souches et pour comprendre la plus grande pathogénicité de ces isolats.
- Alors que certains STs sont associés à l'infection, leur identification dans l'environnement est rare (comme par exemple le ST47) ; le développement de PCR spécifique de clone devrait participer à l'amélioration de la surveillance des légionelloses et à l'identification de niches spécifiques non encore connues.
- Le nombre de cas de légionellose ne diminue pas malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires. L'investigation du rôle exact des domiciles comme source de contamination devient une priorité.

# Avant propos

Le Centre National de Référence des *Legionella* remercie vivement l'ensemble de ses correspondants et partenaires (laboratoires, biologistes, ARS et Délégations Territoriales), 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

---

<b>1</b>	<b>MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ACTIVITES D'EXPERTISE</b>	<b>9</b>
2.1	ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2016	9
2.1.1	Techniques développées ou en développement	9
2.1.2	Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats	12
2.1.3	Techniques transférées vers d'autres laboratoires	14
2.2	ACTIVITES D'EXPERTISE : EVOLUTIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES EN 2016	15
2.2.1	Le diagnostic de légionellose en France en 2016 – données de Santé Publique France	15
2.2.2	Activités du CNR pour 2016 et son évolution depuis 2012	16
2.2.3	Souches d'origine clinique	17
2.2.4	Prélèvements pulmonaires pour culture et PCR	20
2.2.5	Confirmation de résultats d'antigénurie positive	21
2.2.6	PCR sur prélèvements pulmonaires	22
2.2.7	Souches d'origine environnementale	22
2.2.8	Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	25
2.2.9	Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués	25
<b>3</b>	<b>ACTIVITES DE SURVEILLANCE</b>	<b>27</b>
3.1	SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	27
3.1.1	Réseau de partenaires	27
3.1.2	Définition de l'échantillon de souches isolées et méthodologies utilisées	27
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	28
3.2	SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	34
3.2.1	Définition de l'échantillon de souches testées	34
3.2.2	Définitions utilisées pour exprimer la résistance	34
3.2.3	Résultats et analyse des tendances	35
3.3	PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE	35
3.3.1	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France	35
3.3.2	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens	39
3.4	ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	39
3.4.1	Détection rapide par PCR spécifiques des clones majoritaires	39
<b>4</b>	<b>ALERTE</b>	<b>41</b>
4.1	PROCEDURE D'ALERTE DE SANTE PUBLIQUE FRANCE 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 2016	41
4.2	DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	41
4.2.1	Cas groupés de légionellose à La Réunion	41
4.2.2	Cas groupés et phénomènes de sur-incidence	42
4.2.3	Infections extra-pulmonaires	43
4.2.4	Infection persistante	43
4.2.5	Analyses environnementales particulières (humidificateur, spa, WC, ...)	44
<b>5</b>	<b>ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL</b>	<b>45</b>
5.1	ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE, ACCUEIL DE STAGIAIRES	45
5.1.1	Accueil de stagiaires	45
5.1.2	Encadrement de thèses d'Université et Master Recherche en lien direct avec le CNR	45
5.1.3	Enseignements, formations aux professionnels de santé	45
5.2	GUIDES ELABORES	45
5.3	MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET PRODUCTION DU CNR	46
5.3.1	Rétro-information aux partenaires	46
5.3.2	Diffusion aux professionnels : conférences, site internet	46
5.3.3	Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activité...)	46

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...)	47
<b>6</b>	<b>TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR</b>	<b>47</b>
6.1	ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS NOTAMMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR	47
6.1.1	Mécanismes de résistance de <i>Legionella</i> aux macrolides	47
6.1.2	<i>Legionella</i> et peptides antimicrobiens	49
6.1.3	<i>Multiple independent pathogenic clones of Legionella pneumophila have emerged recently in unknown niches</i>	50
6.1.4	<i>Seeding and Establishment of Legionella pneumophila in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease</i>	50
6.1.5	<i>First survey and identification of Legionella pneumophila in tropical countries: environmental isolates from Cameroon, Cambodia and Senegal</i>	51
6.1.6	Recherche de bio-marqueurs de virulence de <i>Legionella pneumophila</i>	52
6.2	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES OU PREVUES EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR	52
6.2.1	Publications nationales	52
6.2.2	Publications internationales	52
6.2.3	Communications nationales	53
6.2.4	Communications internationales	54
6.2.5	Conférences sur invitation	55
6.2.6	Chapitre d'ouvrage en français	56
<b>7</b>	<b>COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES</b>	<b>57</b>

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.</b> Evolution de l'activité du CNR, 2012 – 2016. ....	16
<b>Tableau 2.</b> Répartition en terme d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> des souches d'origine clinique isolées en France, 2007 – 2016. ....	18
<b>Tableau 3.</b> Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique. ....	18
<b>Tableau 4.</b> Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2016. ....	19
<b>Tableau 5.</b> Distribution en termes d'espèces et de sérogroupes des <i>Legionella</i> isolées de prélèvements d'eau des Hospices Civils de Lyon en 2016. ....	24
<b>Tableau 6.</b> Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires. ....	28
<b>Tableau 7.</b> Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2016. ....	31
<b>Tableau 8.</b> Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000. ....	36
<b>Tableau 9.</b> Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2016. ....	37
<b>Tableau 10.</b> Investigations épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2015. ....	37
<b>Tableau 11.</b> Résultats des investigations réalisées ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination selon le pulsotype. ....	37

## Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2016. ....	15
<b>Figure 2.</b> Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2016. ....	15
<b>Figure 3.</b> Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France. ....	17
<b>Figure 4.</b> Algorithme décisionnel pour la réalisation de PCR ou la mise en culture des prélèvements pulmonaires. ....	20
<b>Figure 5.</b> Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012 – 2016. ....	21
<b>Figure 6.</b> Distribution en termes d'espèces des souches de <i>Legionella</i> spp d'origine environnementale adressées au CNR en 2016. ....	23
<b>Figure 7.</b> Distribution en termes de sérogroupes des <i>L. pneumophila</i> adressées au CNR en 2016. ....	24
<b>Figure 8.</b> Evolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009. ....	26
<b>Figure 9.</b> Taux d'incidence par classe d'âge et par sexe des cas de légionellose notifiés en France en 2016. ....	28
<b>Figure 10.</b> Distribution du taux d'incidence standardisé* de la légionellose selon la région (nouvelle) de domicile en France métropolitaine, 2016. ....	29
<b>Figure 11.</b> Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro-groupe 1 (A) parmi les 2561 souches d'origine clinique isolées entre 2008 et 2016 et (B) parmi les 281 souches d'origine clinique isolées en 2016. ....	30
<b>Figure 12.</b> Evolution de la distribution des 3 principaux ST associés à l'infection en France de 2008 à 2016. ....	32
<b>Figure 13.</b> Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2016. ....	33
<b>Figure 14.</b> Evolution de la distribution des souches des ST en France en 2016. ....	33

# **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 2016 sont les suivantes :

- Sur le plan organisationnel :
  - L'année 2016 a été marquée par la préparation du déménagement des locaux du CNR pour une implantation en janvier 2017 à l'Institut des Agents Infectieux (IAI) à l'Hôpital de la Croix Rousse. Le CNR est désormais installé au 1<sup>er</sup> étage du bâtiment où il bénéficie de locaux spécifiquement adaptés à son activité, d'un environnement favorable à des activités transversales, et a accès à des équipements spécialisés.
  
- Sur le plan des personnels affectés au CNR :
  - Brigitte Bon, technicienne 100% a cessé ses activités pour un départ en retraite en décembre 2016. Son remplacement a été assuré par un passage à temps plein de Lucie Chaverot (technicienne déjà affectée à 50% au CNR) et par le recrutement d'une technicienne, Isabelle Royet, sur un mi-temps.
  
- Sur le plan technique :
  - Sur le plan plus spécifique des techniques de Next Generation Sequencing (NGS), 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 2 séquenceurs Nextseq Illumina, 2 séquenceurs Ion torrent (1 PGM et 1 Proton) et 1 séquenceur MinION Oxford Nanopore ; ainsi que tout l'équipement pour la préparation des banques : 1 Covaris, 1 AB builder, 1 Ion Chef, 2 One touch, 2 ES-one touch, 2 automates de pipetage (1 Sciclone et 1 Zéphir, Caliper). La plateforme possède également les ressources pour l'analyse et le stockage des données générées avec 6 stations de travail informatique Windows et/ou Linux équipées de plusieurs logiciels d'analyses, 2 serveurs de stockage sécurisés à la direction du système d'information et de l'informatique des Hospices Civils de Lyon (DSII), un accès sécurisé à un cluster de calcul haute capacité (Université de Bourgogne) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologistes développant conjointement des outils d'analyse mutualisés pour les différents services. Le Logiciel BIGSDG, permettant notamment la gestion des bases de données NGS, est en cours d'installation sur un autre serveur sécurisé à la DSII. Le CNR a accès à cette plateforme et plusieurs applications de ces technologies sont actuellement en développement au CNR.

## 2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en Annexe.

### 2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2016

#### 2.1.1 Techniques développées ou en développement

##### 2.1.1.1 Accréditation des analyses de Biologie Médicale (selon la norme 15189)

Deux analyses réalisées par le CNR ont fait l'objet d'une évaluation par le COFRAC en 2016, dans le cadre d'une demande d'extension d'accréditation à la sous-famille « Bactériologie » au sein des Hospices Civils de Lyon.

Les antigènes urinaires de légionelles (ligne de portée BA7) recherchés par technique immunochromatographique à l'aide du kit BinaxNOW® *Legionella* (Alere) ont été présentés en portée B (adaptation d'une méthode fournisseur) car les étapes de concentration préalable des urines et de chauffage des échantillons positifs ne sont pas décrites dans la notice.

La PCR *Legionella. spp / L pneumophila* sur prélèvement respiratoire (ligne de portée BA8), évaluée en 2008 puis mise en place en routine au CNR est réalisée à l'aide du kit commercial Diagénode, selon les données du fournisseur. Elle a donc été présentée en portée A (méthode fournisseur).

##### 2.1.1.2 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 mis en place conjointement avec le CNR des staphylocoques une analyse mensuelle des souches de *Legionella* par séquençage de génome entier (WGS) dans le cadre de la surveillance épidémiologique, des enquêtes environnementales et plus ponctuellement pour la caractérisation d'espèces non identifiables par les méthodes standard.

Au niveau de l'analyse des données, nous nous orientons vers plusieurs options détaillées ci-dessous :

#### - **Choix du cgMLST comme méthode de typage des *Legionella* au niveau international - Interprétation des données**

Suite aux travaux réalisés par David S. *et al.* (Sanger Institute et PHE), le groupe de travail international ESGLI-NGS auquel le CNR participe a décidé de choisir le cgMLST 50 gènes comme méthode internationale de typage des *Legionella*. En effet, cette méthode atteint un haut pouvoir de discrimination de 0.990 en gardant une bonne concordance épidémiologique. Cette méthode est standardisable, évolutive, et possède une nomenclature approuvée. Il a été décidé en plus de ces 50 gènes de faire un choix d'environ 1000 à 1500 gènes pour augmenter le pouvoir discriminant quand nécessaire. Nous participerons à l'évaluation internationale de ce cgMLST. Pour cela nous évaluerons des solutions « open source » telles que BIGSdb (en déploiement actuellement pour le CNR des légionelles et des staphylocoques) et SRST2, ainsi que des solutions commerciales telles que Ridom SeqSphere+ et Bionumerics.

- **Interprétation des données de WGS par cartographie des *Single Nucleotide polymorphism* (SNPs) pour l'investigation de cas groupés**

Plusieurs outils seront évalués pour l'analyse des données de WGS par cartographie des SNPs. Ce type d'analyse sera plutôt réalisé dans des contextes épidémiques. Cette analyse repose sur le mapping des reads sur une séquence de référence, suivi d'un appel de variant. BWA, Bowtie et SMALT seront évalués pour le mapping, le logiciel « naive variant caller » ainsi qu'un pipeline utilisant SAMtools, mpileup et BCFtools seront évalués pour l'appel de variant. L'impact des recombinaisons sera également évalué en utilisant le logiciel Gubbins. Nous étudions également le « pipeline » d'analyse *nullarbor* (*Nullarbor* v 1.20, Seemann T, Goncalves da Silva A, Bulach DM, Schultz MB, Kwong JC, Howden BP. *Nullarbor* Github <https://github.com/tseemann/nullarbor>), dédié aux analyses NGS en Microbiologie de données Illumina « pair-end ». Il a été testé, adapté et implémenté aux besoins du CNR. Ce pipeline permet de réaliser des analyses « par souche » et des analyses comparatives entre « groupes de souches ». Il inclut des étapes de nettoyage des reads (*Trimmomatic* v 0.36), d'identification d'espèce (*Kraken* v 0.10.5-beta), d'assemblage *de novo* (*SPAdes* v 3.10.0), d'annotation des génomes (*Prokka* v 1.11), de détermination de MLST (*mlst* v 2.7), de détection du résistome (*abricate* v 0.3), de détermination de variants (polymorphismes d'un ou plusieurs nucléotides, insertions et délétions) (*Snippy* v 3.1), de reconstruction d'un arbre phylogénétique basé sur les SNPs du core génome (*FastTree* v 2.1.8 Double precision), de détermination de la matrice de distance de Seps (script PERL *afa-pairwise.pl* du outil *Newick-Utils*), de détermination du pan-génome basée sur la présence et/ou absence de gènes dans les génomes comparés à partir des résultats obtenus par *Prokka* (*Roary* v 8.0), et la production d'un rapport incluant le tableau des souches, les informations sur le séquençage (rendement, couverture, etc), l'identification de l'espèce (*Kraken*), le MLST, le résistome, le bilan de l'assemblage, le résumé du core-génome, la phylogénie.

- **Développement d'un *Sequence Based Typing* utilisant 4 gènes à la place de 7 gènes**

La méthode SBT utilisant 7 gènes est devenue plus onéreuse que le WGS. Seuls quelques pays de l'Europe vont dans les années à venir transférer l'ensemble de leur typage précédemment réalisé en SBT par WGS.

La large base de données européennes / internationales de plus de 10 000 isolats pourra néanmoins être suivie car il est possible par l'utilisation de pipeline d'extraire le *Sequence Type* (ST) à partir des données de WGS. Il reste néanmoins à résoudre le problème de l'un des allèles, *mompS*, qui peut exister en double copie. Un pipeline (*mompS tool*) est en cours d'étude pour pallier à ce problème.

Dans certaines conditions, il peut être intéressant d'avoir une méthode à moindre coût que le SBT actuel notamment pour les pays d'Europe qui n'ont pas la possibilité actuellement d'utiliser le WGS.

Nous avons comme objectif avec le PHE et les membres du groupe de travail NGS de proposer une méthode SBT utilisant 4 gènes avec un meilleur pouvoir de discrimination que le SBT actuel et une meilleure typabilité. Le choix des gènes est devenu possible grâce aux données de centaines de génomes de souches connues comme étant reliées épidémiologiquement ou non reliées. Un total de 10 gènes a été sélectionné par Sophia David (Sanger Institute), le choix des 4 gènes par le groupe est en cours. Le CNR (Christophe Ginevra) a été missionné pour le choix de ces 4 gènes en collaboration avec Massimo Mentasti (PHE, Londres). Le design du test permettrait de l'utiliser sur souche (SBT) ou directement sur prélèvements cliniques ou environnementaux (Nested-SBT).

2.1.1.3 Typage des *Legionella pneumophila* par MALDITOF-MS

Nous évaluons également une autre application potentielle de la technologie MALDI-TOF : le typage des légionelles.

Le coût important du SBT et du WGS limite l'analyse d'un nombre important d'isolats environnementaux lors des investigations. L'objectif est de disposer d'une méthode de

screening permettant d'analyser en WGS uniquement les souches préalablement caractérisées comme potentiellement semblables par MALDI-TOF. De même, ce screening pourrait avoir un intérêt pour exclure un environnement grâce à l'analyse d'un nombre plus conséquent d'isolats.

L'analyse d'un échantillon bactérien par MALDI-TOF-MS permet de générer un grand nombre de données (pics dans les profils protéiques), dont seulement une faible partie est utilisée pour l'identification bactérienne. Nous évaluons actuellement plusieurs méthodes de traitement de l'échantillon (extractions protéiques, test de différentes matrices, de différents inocula...) et d'analyse des profils protéiques obtenus (test de différents algorithmes d'analyses, de différents logiciels : Anagnostec, Bionuméric) pour évaluer le potentiel de cette technologie en matière de typage épidémiologique des légionelles.

Nos premiers résultats montrent que la méthode MALDI-TOF appliquée à 336 isolats appartenant aux 47 ST de Lp1 les plus fréquemment isolés en Europe montre des performances prometteuses, permettant la différenciation de Lp1 au niveau du Complexe Clonal.

Nous souhaitons poursuivre cette évaluation afin de pouvoir proposer dans les prochains mois cette méthodologie. Ce travail se fait en collaboration avec la société BioMérieux. Une communication (eposter) a été acceptée pour le congrès ECCMID 2017 :

Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. Anne-Gaëlle Ranc, Priscillia Courault, Sarah Bidah, Sandrine Mailler, Irène Maffre, Alexandra Miclot, Réhane Ottaviani, Alexandre Bricout, Caroline Chavent, Maud Arzac, Céline Vidal, Christophe Ginevra, Laetitia Beraud, Ghislaine Descours, Martin Welker, Francois Vandenesch, Géraldine Durand, Victoria Girard, Sophie Jarraud, Olivier Dauwalder.

#### 2.1.1.4 APT (*Amoebae Plate Test*) pour la détection de légionelles dans les environnements complexes

Depuis 2015, la technique d'APT qui consiste en une co-culture amibienne sur milieu gélosé est utilisée par le CNR sur les prélèvements cliniques. Son intérêt réside surtout dans la lyse des bactéries associées non intracellulaires, ce qui permet un gain de sensibilité totale lorsque les deux techniques (culture conventionnelle et APT) sont associées. Dans les prélèvements environnementaux complexes, tels que l'eau résiduelle des appareils d'aérosolthérapie, nous sommes souvent confrontés aux problèmes de contaminations des cultures par d'autres bactéries que *Legionella*. Ainsi, nous avons souhaité transférer la méthodologie de l'APT utilisée initialement pour les prélèvements pulmonaires aux environnements complexes.

Un premier essai sur l'eau résiduelle d'un appareil type humidificateur s'est révélé concluant et a permis d'isoler une souche *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 alors que la technique de culture selon la norme NF T90-431 n'avait pas permis de répondre en raison d'une contamination massive des milieux par *Pseudomonas aeruginosa*. Une étude plus large a été menée d'avril à juin 2016 et a montré une très bonne sensibilité de la technique permettant de détecter la présence de *Legionella* dès 1 UFC/mL quel que soit le milieu utilisé et ceci même en présence d'autres bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*). L'étude d'eaux dites propres a montré que la technique d'APT permettait l'obtention de résultats similaires à la technique de la norme NF T90-431. Nous avons initié en 2016 une étude collaborative européenne (Angleterre, Suisse, France) pour évaluer l'intérêt de cette méthode sur un nombre et une diversité plus importants de prélèvements.

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

### 2.1.2.1 Evaluation du test immuno-chromatographique *Legionella* K-Set® de la société Coris BioConcept accompagné d'un lecteur automatique

Ces résultats ont été présentés sous forme de communication affichée au *ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) Congress* qui a eu lieu en septembre 2016 à Amsterdam et à la 36<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) qui s'est déroulée les 12 et 13 décembre 2016 à Paris.

Le résumé soumis était le suivant :

#### Objectifs :

La détection des antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 est la technique la plus utilisée pour le diagnostic de légionellose. Le but de cette étude est d'évaluer les performances du test *Legionella* K-set® et de son lecteur (Coris BioConcept, Gembloux, Belgique) en comparaison avec le test immuno-chromatographique BinaxNOW® *Legionella* UAC (Alere, Scarborough, Maine, USA).

#### Méthodes :

250 urines, dont 200 urines prospectives envoyées au laboratoire pour recherche d'antigénurie *Legionella* et 50 urines congelées provenant de patients avec une légionellose confirmée, ont été testées. Les performances des deux tests, lus après 15 minutes, ont été évaluées sur urines concentrées (UC). Le test *Legionella* K-set® était évalué par une lecture visuelle (LV) et par lecture automatisée (LA) par le lecteur Coris BioConcept Strip reader prototype avec l'utilisation de 2 seuils de positivité (rapport intensité bande échantillon sur intensité bande contrôle). Les urines positives étaient retestées après chauffage. Chaque urine entraînant un résultat discordant était analysée par un 3<sup>ème</sup> test, le Binax<sup>TM</sup> *Legionella* EIA.

#### Résultats :

Tableau 1. Résultats du *Legionella* K-set® sur UC après lecture automatique et visuelle en comparaison au BinaxNOW® UAC.

		<i>Legionella</i> K-set®					
		Lecture visuelle		Lecture automatisée			
				Seuil : > 0,070		Seuil : > 0,051	
		-	+	-	+	-	+
BinaxNOW® <i>Legionella</i>	-	200	0	200	0	200	0
	+	1 <sup>a</sup>	49	2 <sup>a,b</sup>	48	1 <sup>b</sup>	49
	Total	201	49	202	48	201	49

<sup>a</sup> Positivité faible par LV à 3 h (hors recommandations fournisseur), non détectée par le lecteur.

<sup>b</sup> Positivité faible par LV, non détectée par le lecteur. Positif en LV et LA à 1 h.

Après chauffage, toutes les urines positives étaient concordantes avec les 2 tests. Trois urines étaient ininterprétables en raison d'une absence de bande contrôle liée à un défaut de migration. Les bandes tests étaient néanmoins fortement positives.

#### Conclusion :

Nos résultats montrent des performances concordantes entre les tests *Legionella* K-set® et BinaxNOW® *Legionella* UAC sur UC sur toutes les urines négatives analysées (spécificité 100%) ainsi que sur 49 des 50 urines positives (sensibilité : 98% en LV, 96 ou 98% en LA). L'existence d'un lecteur permet la traçabilité avec photo du test et réduit la variabilité

opérateur dépendante en donnant un ratio d'intensité de la bande échantillon par rapport à la bande contrôle. Les résultats obtenus en LA au seuil > 0.051 étaient similaires à ceux obtenus par LV. D'autres études sont nécessaires pour déterminer avec plus de précision le meilleur seuil de positivité.

#### 2.1.2.2 Evaluation de l'impact de la concentration des prélèvements d'urines sur le test immuno-chromatographique BinaxNOW® Legionella de la société Alere

Ces résultats ont été présentés sous forme de communication affichée au *ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) Congress* qui a eu lieu en septembre 2016 à Amsterdam et à la 36<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) qui s'est déroulée les 12 et 13 décembre 2016 à Paris.

Le résumé soumis était le suivant :

##### Objectifs – Introduction :

La recherche d'antigénurie *Legionella* est la technique la plus utilisée pour le diagnostic de légionellose. Les données de la littérature montrent une augmentation de sensibilité des tests immuno-chromatographiques par concentration des urines. L'objectif de cette étude était d'évaluer en prospectif l'impact de la concentration sur les performances du test BinaxNOW® *Legionella*.

##### Matériels et méthodes :

D'avril 2015 à mars 2016, 13 laboratoires utilisant le test BinaxNOW® sur urines concentrées (UC) ont participé à l'étude. Les échantillons inclus étaient des UC positives avant et après chauffage. La concentration était réalisée par centrifugation ultrafiltration sur colonnes Amicon Ultra-4 (Millipore). Le centre participant réalisait alors un second test BinaxNOW® sur urines non concentrées (UNC). Les résultats, ainsi que les prélèvements d'urines et les prélèvements respiratoires étaient envoyés au Centre National de Référence (CNR) des légionelles pour expertise ou conservation.

Les résultats discordants correspondaient à un résultat positif sur UC puis négatif sur UNC. Les urines étaient alors expertisées au CNR par Binax™ *Legionella* EIA. Un questionnaire renseignant les facteurs de risque de légionellose, les traitements habituels, la prise en charge et des données clinico-biologiques a été complété pour chacun des cas discordants.

##### Résultats :

Durant la période de l'étude, 90 prélèvements d'urines ont été inclus. Le CNR a reçu 86 de ces échantillons et 32 souches ont été isolées par culture de prélèvement respiratoire.

Huit échantillons inclus par 3 centres différents ont abouti à des résultats discordants. Ils ont tous été confirmés positifs par l'EIA et négatifs sur UNC avec un lot de BinaxNOW® différent de celui utilisé initialement. Le questionnaire montrait que 5 des patients avaient reçu un remplissage vasculaire et un 6<sup>ème</sup> était traité par diurétique. Aucune souche de légionelle n'a pu être isolée des 3 prélèvements respiratoires reçus.

##### Conclusion :

La concentration des urines pour le diagnostic de légionellose par antigénurie avec le test BinaxNOW® n'entraîne pas de perte de spécificité. Elle apporte un gain de sensibilité avec 8 diagnostics sur 90 obtenus uniquement sur UC. Les paramètres pouvant influencer la sécrétion des antigènes *Legionella* n'expliquent pas l'ensemble des discordances. Les particularités liées à la souche responsable de l'infection n'ont pas pu être étudiées.

### 2.1.2.3 Evaluation du lecteur pour le test immunochromatographique BinaxNOW® Legionella de la société Alere

Cette étude débutée en novembre 2016 a pour but d'évaluer les performances du lecteur de la société Alere mis récemment sur le marché. Ce lecteur permet l'analyse des tests immuno-chromatographiques BinaxNOW® en rendant à l'utilisateur un résultat positif, négatif ou invalide. Au-delà de l'apport de cet outil pour la traçabilité et donc l'accréditation, l'objectif de l'évaluation en cours est de vérifier l'influence du lecteur sur le test en termes de sensibilité et de spécificité. Pour cela, le résultat obtenu par le lecteur est comparé à celui obtenu par une lecture visuelle du test par un technicien du CNR. Cette étude est encore en cours. Par ailleurs nous avons reçu des urines de laboratoire en France pour confirmation des discordances entre lecture visuelle et lecture par le lecteur (voir 2.2.5).

### 2.1.2.4 Evaluation du prototype de test immuno-chromatographique de la société Biosynex pour la recherche d'antigènes urinaires, accompagné d'un lecteur automatique

Cette étude a débuté en novembre 2016 et est actuellement en cours. Elle a pour but de comparer les performances du prototype de la société Biosynex et du test BinaxNOW® d'Alere. Cette étude est réalisée sur 200 urines négatives, 50 positives, toutes concentrées et confirmées après chauffage en cas de résultat positif.

## **2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

### 2.1.3.1 Institut Pasteur, Algérie

Nous avons débuté une collaboration avec le Dr Kahina SOUAMI, Maitre-assistante en biologie clinique à la Faculté de Médecine d'Alger et au Laboratoire de biologie médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie depuis plusieurs années. En 2016, de nombreux échanges se sont poursuivis par messagerie électronique. Ils ont permis de la conseiller sur les techniques à utiliser pour faire le diagnostic de légionellose et isoler des légionelles à la fois de prélèvements cliniques et environnementaux. Près de 20 cas de légionellose ont été diagnostiqués par le Dr Souami principalement par tests d'antigénurie. Nous avons reçu des échantillons d'urines et des prélèvements broncho-pulmonaires pour confirmation de ces cas et expertise d'autres cas suspects. Trois souches cliniques ont été isolées.

### 2.1.3.2 Amoebae Plate Test au Public Health England (PHE) à Londres et à Porton en Angleterre

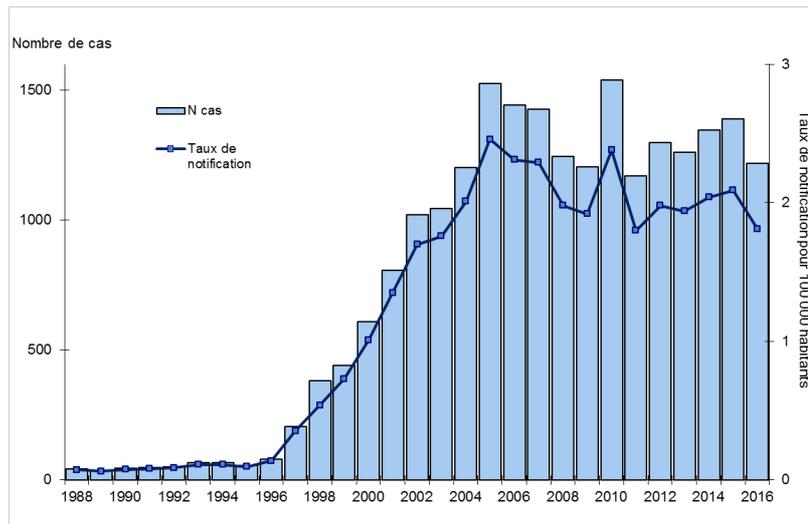
En 2016, nous avons transféré la méthode d'APT au laboratoire environnemental du PHE à Porton (Royaume uni) (Samuel Collins) et au laboratoire des pathogènes respiratoires au PHE à Londres (Vicki Chalker, Massimo Mentasti). Ce transfert a concerné la mise à disposition du mode opératoire, l'envoi de la souche témoin délétée dans le gène *dotA* et l'envoi d'amibes ainsi que 2 jours de formation sur place à Porton dans le cadre de la mobilité de S. Jarraud.

Ce transfert a pour objectif de réaliser une étude collaborative européenne sur l'apport de cette méthodologie dans les investigations mettant en cause des environnements complexes.

## 2.2 Activités d'expertise : évolutions quantitatives et qualitatives en 2016

### 2.2.1 Le diagnostic de légionellose en France en 2016 – données de Santé Publique France

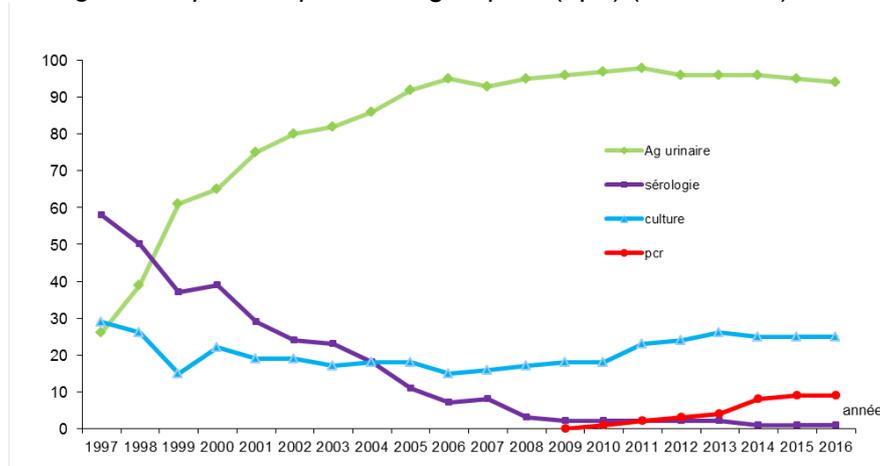
En 2016, **1 218 cas de légionellose** ont été notifiés en France. Parmi eux, 24 cas étaient des résidents des DOM dont 16 à l'île de la Réunion et 23 étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine était de 1,8 / 100.000 habitants (Figure 1). Le nombre de cas en 2016 est inférieur à celui de 2015 où 1 389 cas avaient été notifiés avec une incidence de 2,1/100 000 habitants.



**Figure 1.** Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2016.

Au niveau national, les données issues de la déclaration des cas sur la répartition des **méthodes diagnostiques** montrent la part toujours très majoritaire (~ 94%) des cas diagnostiqués par la détection des antigènes urinaires (Figure 2). Cette répartition est similaire à ce que l'on observe en Europe.

La part du diagnostic réalisé par PCR a commencé à augmenter en 2012 mais reste stable depuis 2015 ; la PCR était positive pour 109 cas (9%) et pour 32 d'entre eux, la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique en 2016. La majorité des cas était relative à l'espèce *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (Lp1) (1168/1218).



**Figure 2.** Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2016.

## 2.2.2 Activités du CNR pour 2016 et son évolution depuis 2012

Le Tableau 1 résume de façon chiffrée l'activité du CNR pour l'année 2016 et son évolution depuis 2012.

**Tableau 1.** Evolution de l'activité du CNR, 2012 – 2016.

Nombre de prélèvements ou souches	2012	2013	2014	2015	2016
<b>EXPERTISE</b>					
<b>Expertise microbiologique</b>					
Sérologie (IF)	1410	1526	1393	1109	944
Culture de prélèvements cliniques	343	386	329	391	362
PCR sur prélèvements cliniques*	104	193	236	309	284
Co-culture de prélèvements pulmonaires	340	304	262	252	177
Expertise antigènes urinaires	20	16	27	41	55
Identification de souches cliniques	307	323	340	346	300**
Expertise souches environnementales	893	489	458	515	445
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	2	8	11	9	4
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	1	5	3	3	3
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	-	-	7	5	7
<b>Développement et validation de tests diagnostiques (nombre d'échantillons ou de souches testés)</b>					
Antigènes urinaires	220	378	100	250	440
<i>Amoebae Plate Test</i>	-	20	-	133	59
<b>SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE</b>					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	62	51	46	64	74
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	835	575	480	604	510***
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	112	140	143	223	166*** *
Isolats <i>Legionella</i> analysés en SBT	409	401	382	429	352
Isolats <i>Legionella</i> analysés à l'aide de mAbs	532	581	502	584	448
<b>Développement et validation de méthodes de typage (nombre d'échantillons ou de souches testés)</b>					
Typage par Maldi TOF			50	79	257
NGS				114	228

\* PCR *L. pneumophila*, *L. non pneumophila* et *L. pneumophila* sérotype 1.

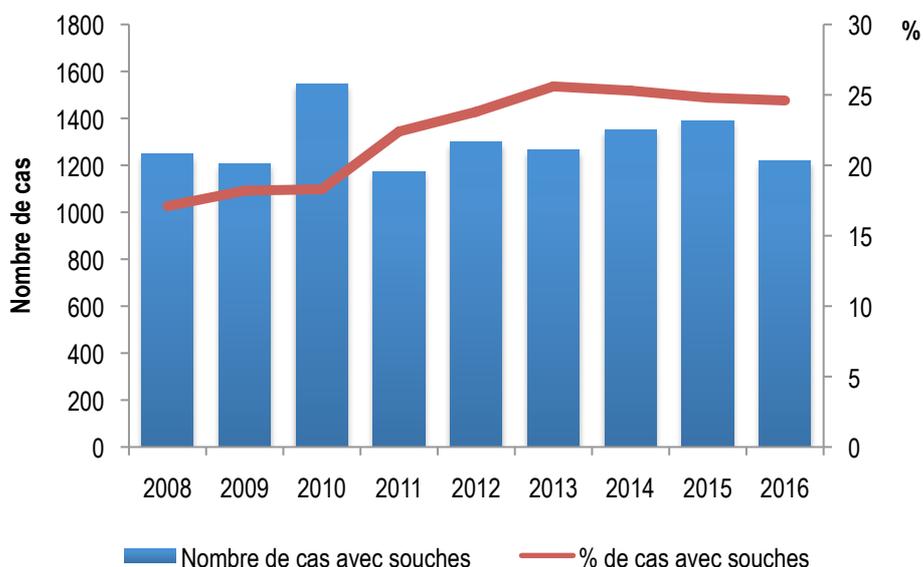
\*\* Pour des raisons de cohérence avec les données de Santé Publique France, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2016 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2016.

\*\*\*\* 327 isolats cliniques (dont doublons) et 183 isolats environnementaux.

\*\*\*\* 66 prélèvements étaient positifs pour au moins 1 gène.

### 2.2.3 Souches d'origine clinique

Parmi les 1218 cas notifiés en 2016, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 300 cas soit 24,6% des cas. Ce pourcentage était comparable à celui de 2015 (24,8%) (Figure 3). La majorité des souches (296, soit 98,7%) était des *L. pneumophila* et 281 d'entre elles (93,7%) appartenaient au sérotype 1 (Lp1) (Tableau 2).



**Figure 3.** Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France.

Parmi les Lp1, 70 (24,9%) étaient des souches endémiques, parmi lesquelles 29 souches Louisa (10,3%), 18 souches Paris (6,4%), 15 souches Lorraine (5,3%), 6 souches Biarritz (2,1%) et 2 souches profil Mondial (0,7%). Parmi les autres souches, nous avons identifié 154 souches avec un profil déjà répertorié dans notre base de données (54,8%), 37 souches sporadiques (13,2%), 19 souches de différents pulsotypes (A à G) (6,7%) et 1 souche de profil Belfort.

**Tableau 2.** Répartition en terme d'espèces de *Legionella* et de sérogroupe de *L. pneumophila* des souches d'origine clinique isolées en France, 2007 – 2016.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements									
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<i>Legionella pneumophila</i>	224	210	222	280	259	304	321	333	342	296
sérogroupe 1	218	203	211	270	248	294	305	313	328	281
sérogroupe 2	1		2	2		2	2	3		
sérogroupe 3		1	3	1	2	6	9	6	3	1
sérogroupe 4		1	1		4					1
sérogroupe 5	1	2		1	2		2	1	1	
sérogroupe 6		1	2	2		1	2	2	4	6
sérogroupe 7	2		1		2		1	2	3	1
sérogroupe 8	1	1	2	4	1	1		2		1
sérogroupe 10								3	1	3
sérogroupe 13										1
sérogroupe 14		1								
sérogroupe indéterminé*	1							1	2	1
<i>Legionella non pneumophila</i>	3	3	2	3	4	3	2	7	4	4
<i>Legionella dumoffii</i>				1		1	1			
<i>Legionella micdadei</i>				1	1			1		2
<i>Legionella longbeachae</i>	1	2		1	1	1	1	5	2	
<i>Legionella anisa</i>	1		1						1	
<i>Legionella tucsonensis</i>										
<i>Legionella gormanii</i>		1								
<i>Legionella bozemanii</i>					2	1		1	1	1
<i>Legionella feelei</i>										
<i>Legionella cincinatiensis</i>										
<i>Legionella wadsworthii</i>	1									
<i>Legionella sainthelensis</i>			1							
<i>Legionella maceachernii</i>										1
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>213</b>	<b>224</b>	<b>283</b>	<b>263</b>	<b>307</b>	<b>323</b>	<b>340</b>	<b>346</b>	<b>300</b>

\* réactions croisées en immunofluorescence directe.

En 2016, les souches d'origine clinique nous sont parvenues de 136 villes de France, pour la grande majorité de laboratoires de Centres Hospitaliers. Ce nombre de laboratoires en augmentation depuis 2012 reflète l'amélioration de la mise en culture de prélèvements respiratoires pour recherche de *Legionella* en France (Tableaux 3 et 4).

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

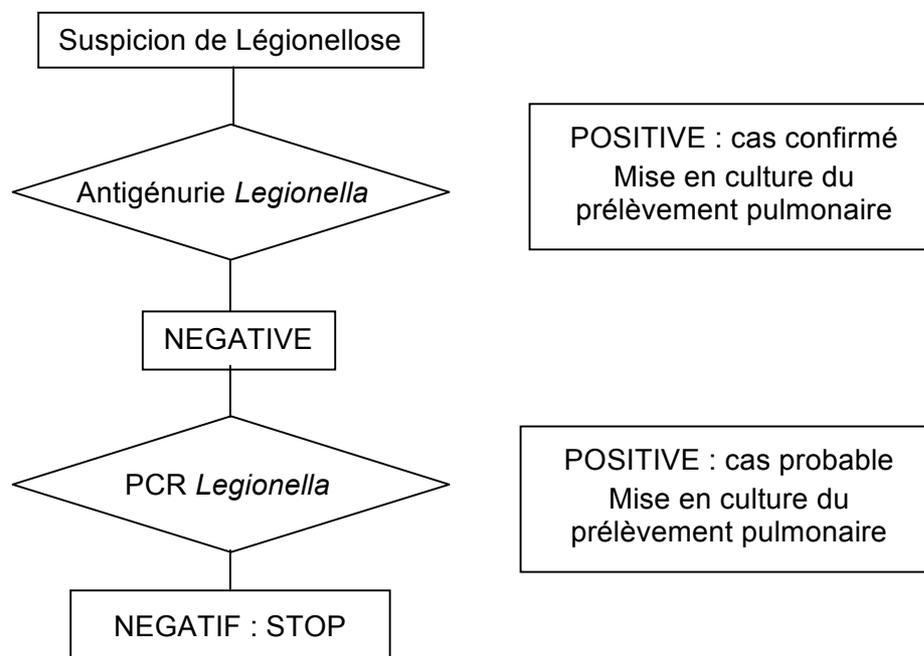
Année	Nombre de souches d'origine clinique	de Nombre de villes différentes d'où sont issues les souches d'origine clinique
2007	<b>233</b>	103
2008	<b>213</b>	93
2009	<b>224</b>	100
2010	<b>279</b>	99
2011	<b>263</b>	115
2012	<b>307</b>	114
2013	<b>323</b>	119
2014	<b>340</b>	128
2015	<b>356</b>	133
2016	<b>300</b>	136

**Tableau 4.** Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2016.

AJACCIO	2	CLAMART	1	LONGJUMEAU	2	ROANNE	3
ALBI	1	CLERMONT FERRAND	1	LONS LE SAUNIER	3	RODEZ	2
AMIENS	3	COLMAR	3	LUNEVILLE	1	ROMANS SUR ISERE	1
ANGERS	2	COLOMBES	2	LYON	25	ROUEN	3
ANGOULEME	2	COMPIEGNE	1	MAMOUDZOU (MAYOTTE)	1	SAINT DENIS	1
ANNONAY	1	CONTAMINE-SUR- ARVE	2	MARSEILLE	6	SAINT ETIENNE	6
ARGENTEUIL	1	CREIL	3	MARTIGUES	1	SAINT NAZAIRE	1
ARLES	2	CRETEIL	5	MELUN	1	SAINT PIERRE	2
ARMENTIERES	1	DIEPPE	2	METZ	3	SALLANCHES	4
ARRAS	1	DIJON	1	MONACO	1	SALON PROVENCE	DE 1
AUBAGNE	1	DOLE	1	MONTARGIS	3	SARREGUEMINES	1
AUCH	1	DOUAI	2	MONTBELIARD	1	SAVERNE	3
AULNAY SOUS BOIS	1	DRAGUIGNAN	2	MONTCEAU MINES	LES 2	SETE	1
AURILLAC	1	DUNKERQUE	4	MONTEREAU YONNE	FAULT 1	ST AFFRIQUE	1
AVIGNON	3	EPINAL	1	MONTVILLIERS	1	ST DENIS	2
BEAUVAIS	1	FALAISE	1	MONTPELLIER	2	ST OUEN L'AUMONE	1
BELFORT	5	FIRMINY	1	MULHOUSE	1	STRASBOURG	9
BESANCON	4	FREJUS	2	NANCY	5	TARBES	3
BLOIS	2	GAP	1	NANTES	1	THONON-LES-BAINS	1
BOBIGNY	2	GARCHES	2	NARBONNE	1	TOULON	1
BOULOGNE SUR MER	1	GRENOBLE	2	NEVERS	2	TOULOUSE	8
BOURG-EN-BRESSE	4	GUERET	1	NICE	6	TOURCOING	2
BOURGOIN JALLIEU	1	HAGUENAU	5	OLLIOULES	1	TOURS	2
BREST	1	HYERES	2	ORLEANS	1	TREMBLAY FRANCE	EN 1
BRIVE LA GAILLARDE	1	ISSOIRE	1	ORSAY	2	VALENCE	2
BRON	1	JOSSIGNY	1	PAPEETE	1	VALENCIENNES	3
CAEN	4	LA ROCHE SUR YON	1	PARIS	14	VANNES	2
CANNES	1	LA TESTE DE BUCH	1	PAU	1	VANTOUX	1
CASTELNAU LE LEZ	1	LANGON	1	PERIGUEUX	1	VERDUN	1
CERGY PONTOISE	1	LE CHESNAY	2	POITIERS	3	VESOUL	1
CHALON SUR SAONE	2	LE BICETRE	KREMLIN 3	PONTARLIER	2	VICHY	3
CHAMBERY	5	LE MANS	1	PRINGY	4	VIENNE	2
CHARLEVILLE MEZIERES	2	LIMOGES	2	REIMS	1	VILLEJUIF	3
CHAUMONT	1	LISIEUX	1	RENNES	1	VILLENEUVE LOT	SUR 1

## 2.2.4 Prélèvements pulmonaires pour culture et PCR

Le choix de la réalisation d'une culture ou d'une PCR se base sur l'algorithme diagnostique suivant, qui permet de mieux cibler l'indication de la culture, tout en intégrant la PCR dans la démarche diagnostique (Figure 4). En effet, les données de la littérature et du CNR montrent que la sensibilité de la PCR est constamment supérieure à la culture.

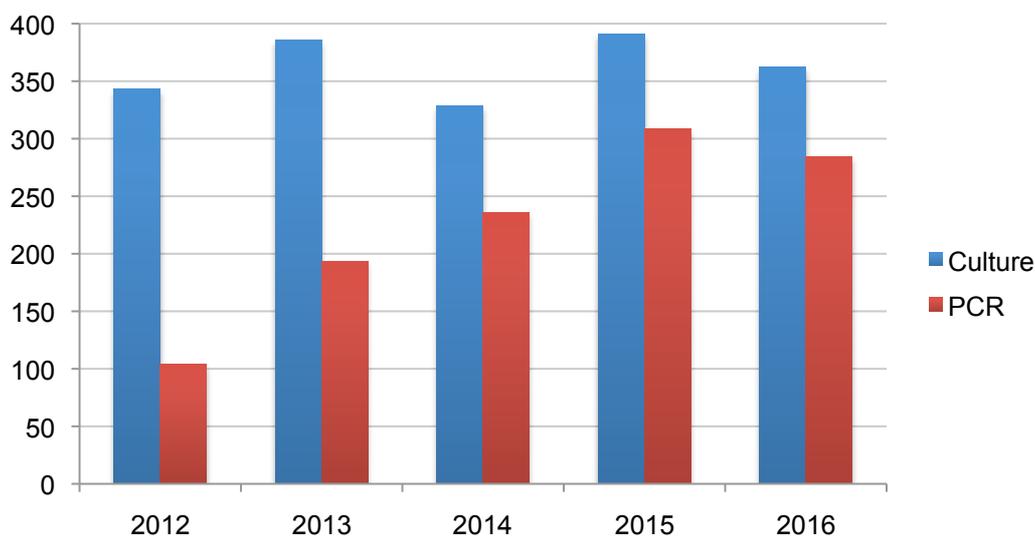


**Figure 4.** Algorithme décisionnel pour la réalisation de PCR ou la mise en culture des prélèvements pulmonaires.

Le CNR des Légionelles continue, conjointement avec Santé Publique France et les ARS, à encourager les laboratoires à lui adresser les prélèvements broncho-pulmonaires en cas d'antigénurie *Legionella* positive, lorsque la culture est négative ou qu'elle n'est pas réalisée dans le laboratoire d'origine.

Des prélèvements broncho-pulmonaires nous sont également adressés dans un contexte de forte suspicion de légionellose malgré un antigène urinaire négatif, afin que nous réalisions une PCR *Legionella*, ou pour contrôle d'un résultat de PCR positive. En effet, le développement des techniques de diagnostic de pneumopathie par approche syndromique (PCR multiplex ciblant différents pathogènes respiratoires, viraux et bactériens) peut conduire à des diagnostics fortuits. Par ailleurs, des prélèvements (ou extraits d'ADN) nous parviennent pour contrôle d'un résultat faiblement positif par PCR. Dans ces contextes, nous réalisons généralement une PCR en 1<sup>ère</sup> intention (kit Diagénode) afin de vérifier le résultat obtenu par le laboratoire expéditeur, puis une mise en culture / un typage dans un second temps, en fonction du résultat obtenu avec la technique du CNR.

L'évolution des envois pour recherche de légionelles par culture et PCR est présentée en Figure 5. Le nombre de prélèvements adressés pour culture et/ou PCR en 2016 est en sensible diminution par rapport à 2015 (-8%). Ces chiffres ont néanmoins évolué parallèlement au nombre de cas de légionellose notifiés en 2016 par rapport à l'année précédente.



**Figure 5.** Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012 – 2016.

**En 2016**, 362 prélèvements pulmonaires (patients avec Ag urinaire positif ou PCR positive) ont été mis en culture sur milieux gélosés selon la technique conventionnelle. La culture s'est révélée positive pour 134 prélèvements, soit 37% des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*) mise en œuvre sur les prélèvements présentant une culture négative, a permis d'isoler **11 souches additionnelles**. Au total, des légionelles ont été isolées pour 145 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, soit **40% des prélèvements**. Ce taux est faible mais il peut s'agir de prélèvements pour lesquels la culture a déjà été tentée par les laboratoires expéditeurs. Enfin, ces données montrent que **le CNR isole près de la moitié des souches disponibles au niveau national**.

### **2.2.5 Confirmation de résultats d'antigénurie positive**

En 2016, 55 urines (provenant de 26 patients) testées avec différents kits mis sur le marché ont été analysées pour confirmation de résultats, dans différents contextes :

- le résultat observé dans le laboratoire expéditeur était faiblement positif ;
- le laboratoire expéditeur observait une discordance entre deux résultats (entre deux antigénuries successives ou entre une antigénurie et une PCR sur prélèvement respiratoire) ;
- le laboratoire expéditeur utilisait depuis peu un nouveau test pour effectuer la recherche d'antigènes urinaires *Legionella* et souhaitait confirmer ses premiers résultats.

**Fait marquant en 2016** : onze urines nous ont été adressées pour confirmation de résultats face à une **discordance entre le test BinaxNOW® (Alere) lu à l'œil et le résultat rendu par le lecteur**. Début 2017, 7 autres prélèvements de ce type ont été reçus montant le nombre total à 18 urines pour 16 patients. Des tests complémentaires par technique EIA (Alere) ou Sofia FIA (Ingen) ont été réalisés sur ces urines, ainsi que, lorsque cela était possible, des PCR sur prélèvements respiratoires. Une positivité a été confirmée pour 3 cas par au moins une autre technique. Pour les 13 autres patients, aucune autre méthode n'a prouvé la véracité de cette positivité observée uniquement par le lecteur. Par ailleurs, pour 5 urines, le chauffage de l'échantillon a pu être réalisé (soit par le laboratoire expéditeur, soit par le CNR) et a entraîné une négativation de l'analyse. L'ensemble de ces résultats nous

orienté vers un **défaut de spécificité parallèle à une augmentation de sensibilité liée au lecteur**. Cette hypothèse est en cours d'analyse au CNR grâce à la seconde partie de l'étude EURIALE (2.1.2.3).

### **2.2.6 PCR sur prélèvements pulmonaires**

Parmi les 291 PCR *Legionella* réalisées (kit commercial), 37 ont été positives permettant de poser le diagnostic de 23 légionelloses à *L. pneumophila* et 15 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 10 des 23 cas avec PCR positive à *Legionella pneumophila* : 7 étaient positives, dont 4 confirmées par Nested-SBT. Parmi ces PCR, 2 n'ont pas pu être confirmées par culture ou Nested-SBT, seul l'extrait d'ADN ayant été reçu. Parmi les 3 PCR *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 négatives, aucun cas n'a pu être confirmé en culture (2 prélèvements négatifs en culture et coculture amibienne) et un pour lequel seul l'extrait d'ADN était disponible.

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 *Legionella spp* et/ou *L. pneumophila* est (sont) négative(s) en raison d'une meilleure sensibilité. En 2016, la PCR Lp1 a été réalisée sur 4 prélèvements positifs en *Legionella spp* uniquement et sur 8 prélèvements négatifs en *Legionella spp* et *L. pneumophila*. Elle s'est néanmoins révélée négative pour tous ces cas.

Enfin, une PCR ciblant l'espace intergénique 23S – 5S et permettant un diagnostic d'espèce a été réalisée sur 4 des 15 cas pour lesquels seule la PCR *Legionella 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 réalisée sur les autres prélèvements, du fait d'un faible signal en PCR *Legionella spp*. et d'une faible sensibilité connue de la PCR 23S-5S. Parmi ces 15 cas, un cas a également pu être confirmé par une culture positive à *Legionella bozemanii*.

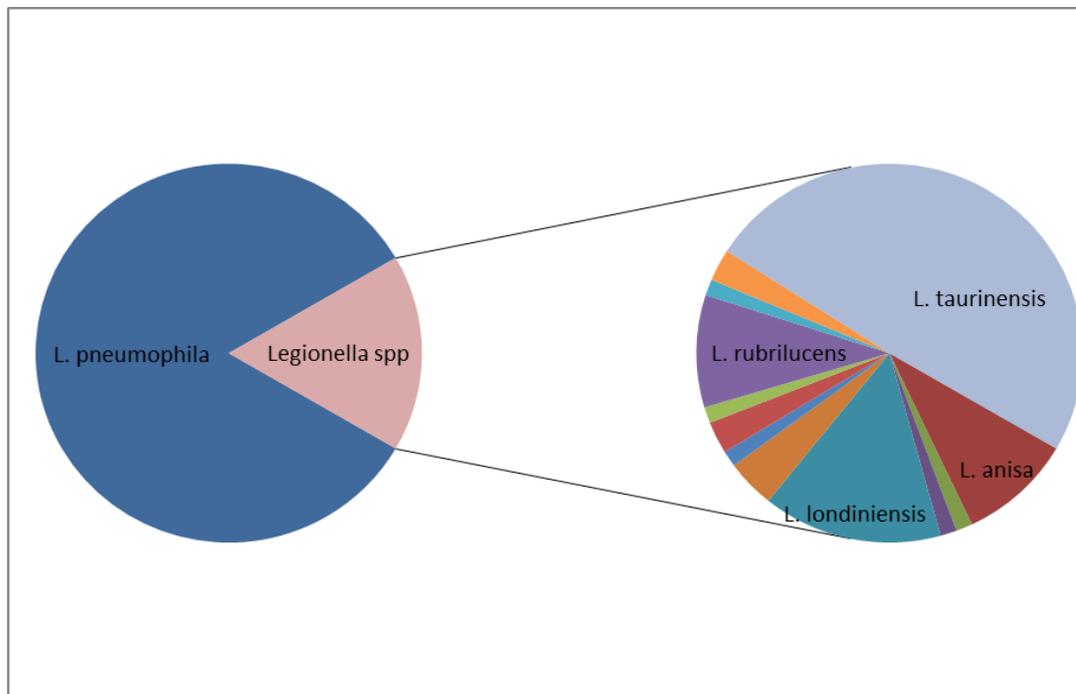
Le CNR a également été sollicité pour contrôle de plusieurs PCR positives par la technique Fast Track Diagnostic, kit permettant la recherche de *Legionella pneumophila* et de *Legionella longbeachae*. Cinq prélèvements nous ont été envoyés. Pour 3 d'entre eux, aucune des techniques réalisées, à savoir biologie moléculaire, culture conventionnelle et co-culture amibienne, n'a permis de confirmer la présence de légionelles. Les 2 autres cas ont été confirmés positifs au CNR, l'un par PCR *L. pneumophila* séro-groupe 1 (technique maison) et l'autre par PCR Diagenode recherchant *Legionella spp* et *L. pneumophila*. Pour ce dernier cas, la PCR *L. pneumophila* séro-groupe 1 était négative, nous orientant vers une légionellose à *L. pneumophila* séro-groupe non-1.

### **2.2.7 Souches d'origine environnementale**

En 2016, 435 souches environnementales ont été envoyées par des laboratoires extérieurs. Les souches environnementales sont adressées au CNR pour identification précise (séro-groupe ou espèce) ou typage lors de l'investigation de cas. Le CNR est notamment sollicité en cas de défaut des réactifs d'agglutination ne permettant pas aux laboratoires environnementaux de conclure sur l'espèce de la souche de *Legionella*.

La distribution des *Legionella* non *pneumophila* et des différents sérogroupes de *L. pneumophila* des souches environnementales adressées au CNR est représentée en Figures 6 et 7.

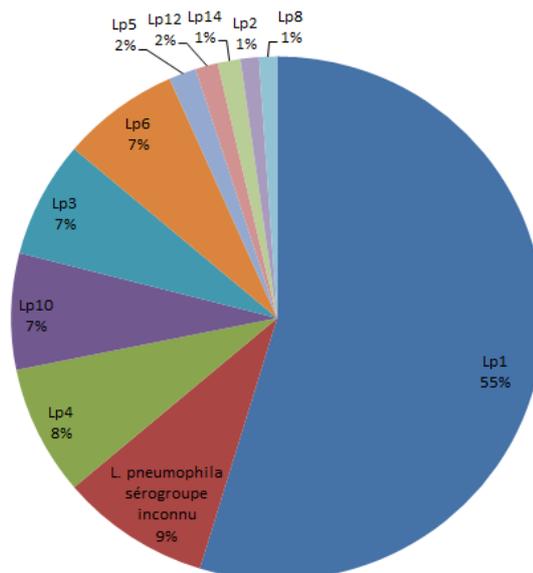
Parmi les 435 souches de *Legionella*, 73 (17%) étaient des *Legionella* non *pneumophila* avec 12 espèces différentes. L'identification de ces souches a été réalisée soit par technique de MALDI-TOF, soit par séquençage du gène *mip* (technique de référence).



<b><i>Legionella</i> non <i>pneumophila</i></b>	<b>Nombre de souches</b>
<i>L. taurinensis</i>	36
<i>L. londiniensis</i>	11
<i>L. anisa</i>	7
<i>L. rubrilucens</i>	7
<i>L. maceachernii</i>	3
<i>L. nautarum</i>	2
<i>Legionella</i> spp (espèce non décrite)	2
<i>L. erythra</i>	1
<i>L. feelei</i>	1
<i>L. micdadei</i>	1
<i>L. quinlivanii</i>	1
<i>L. sainthelensis</i>	1
<b>Total</b>	<b>73</b>

**Figure 6.** Distribution en termes d'espèces des souches de *Legionella* spp d'origine environnementale adressées au CNR en 2016.

Sérogroupe <i>Legionella pneumophila</i>	Nombre de souches
Lp1	198
Lp sérogroupe inconnu*	33
Lp4	29
Lp10	26
Lp3	26
Lp6	26
Lp5	6
Lp12	5
Lp14	5
Lp2	4
Lp8	4
<b>Total</b>	<b>362</b>



\* Réaction croisée entre plusieurs sérogroupe.

**Figure 7.** Distribution en termes de sérogroupe des *L. pneumophila* adressées au CNR en 2016.

En 2016, le CNR a reçu des souches issues de deux environnements pour lesquelles une absence d'agglutination avec les réactifs Oxoid a été observée. Les analyses complémentaires du CNR ont permis d'identifier ces souches comme étant des *Legionella pneumophila* sérogroupe 4 pour les deux environnements et des Lp14 pour l'un d'eux. Nous avons également reçu une série de 11 souches auto-agglutinables qui se sont avérées être des *Legionella pneumophila* sérogroupe 1.

Enfin, en dehors des missions du CNR, 581 souches ont été isolées de prélèvements d'eau des Hospices Civils de Lyon (Tableau 5). Ces souches ont été transmises au CNR pour implémentation de la collection du CNR de souches environnementales bien caractérisées.

**Tableau 5.** Distribution en termes d'espèces et de sérogroupe des *Legionella* isolées de prélèvements d'eau des Hospices Civils de Lyon en 2016.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre de souches
<i>L. anisa</i>	177
<i>L. taurinensis</i>	37
<i>L. jordanis</i>	5
<i>L. bozemanii</i>	5
<i>Legionella</i> spp	3
<i>L. pneumophila</i>	394
<b>Total</b>	<b>581</b>

## **2.2.8 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats**

En 2016, le CNR a répondu à 7 demandes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour des souches cliniques isolées chez cinq patients ayant évolué défavorablement sous antibiothérapie :

- pour 2 patients immunodéprimés, une souche isolée au moment du diagnostic puis une seconde souche isolée après une / trois semaine(s) d'antibiothérapie ;
- pour 2 autres patients, une souche isolée plusieurs semaines après le début du traitement (3<sup>ème</sup> récurrence pour l'un de ces patients) ;
- pour le dernier patient, une souche isolée au moment du diagnostic.

La sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques a été évaluée par réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide. Aucune résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones, à la rifampicine ou aux tétracyclines n'a été détectée phénotypiquement.

Bien que les phénomènes de résistance soient exceptionnels, le CNR communique actuellement sur la possibilité de ces résistances, le but étant d'inciter l'envoi de prélèvement en cas de suspicion. Du fait d'un faible nombre de demandes, il est préférable que l'étude de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques soit réalisée par le CNR.

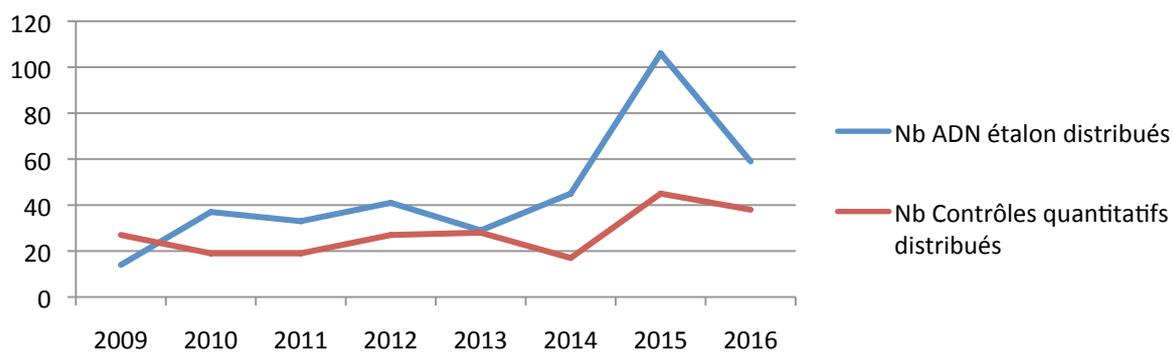
## **2.2.9 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués**

- 17 extraits d'ADN de prélèvements respiratoires, CHU de Grenoble. Ces prélèvements ont été réalisés entre 2013 et 2016 chez des patients hospitalisés en réanimation atteints de légionellose pour lesquels le diagnostic avait été posé par antigénurie ou PCR. L'objectif de ce partenariat était l'étude d'une PCR pour recherche de résistance directement sur prélèvement.
- 8 souches de *Legionella pneumophila* sérogroupes 8 à 15, Sam Dukan, Click4Tag SAS, Marseille.
- 96 souches de *Legionella pneumophila* d'origine clinique et environnementale reliée, à Lionel Guy de l'université d'Uppsala (Suède) pour analyse des polymorphismes acquis chez l'hôte humain au cours de l'infection.
- souches *Acanthamoeba castellanii*, *L. pneumophila* Paris CIP 107629 et souche *L. pneumophila* Lens  $\Delta dotA$  à Samuel Collins (PHE, Salisbury, Royaume uni) et à Massimo Mentasti (PHE, Londres, Royaume uni) dans le cadre d'une étude européenne sur l'apport de la coculture amibienne pour l'isolement des *Legionella*.
- 17 souches de référence (les 15 sérogroupes de *L. pneumophila*, 1 *L. anisa* et 1 *L. longbeachae*) à Povilas Kavaliauskas, Institute of Microbiology and Virology, Kaunas, Lituanie.
- ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR.

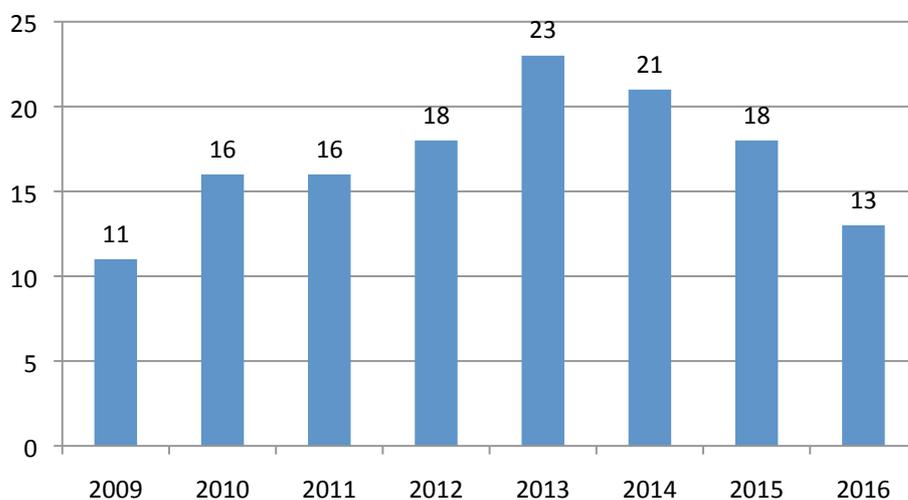
En 2016, 31 ADN étalon et 23 contrôles quantitatifs (raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement à 13 laboratoires environnementaux dont 4 laboratoires à l'étranger (Pays-Bas, Irlande, Canada).

De plus, 28 ADN étalon et 15 contrôles quantitatifs ont été distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, uniquement dans des laboratoires à l'étranger.

### Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif 2009-2016



### Evolution du nombre de laboratoires destinataires\*



\* Ces données ne tiennent pas compte des envois effectués par notre distributeur LGC Standard.

**Figure 8.** 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 Santé Publique France, 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.

Le réseau couvre l'ensemble du territoire Français. Nous avons été en contact lors d'investigations de cas avec 12 ARS.

#### 3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées et méthodologies utilisées

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.

Nous avons remplacé en 2016 la méthode de spoligotypage qui permet de sous-typé les souches *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1 / pulsotype Paris par le séquençage de génome complet suivi d'une analyse de SNP sur le « core genome » et de présence/absence de gène sur l'« accessory genome ».

**En 2016**, 510 souches (327 souches humaines et 183 souches environnementales) ont été analysées par PFGE, 352 par SBT et 448 par anticorps monoclonaux.

Un total de 228 souches a été analysé par NGS en 2016.

#### **\* Place de la Nested-SBT**

En cas de culture et co-culture négatives, la Nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. **En 2016**, 166 prélèvements ont été analysés par cette technique. Ces prélèvements provenaient pour la plupart de patients pour lesquels le diagnostic de légionellose avait été posé par une antigénurie positive, et plus rarement par une PCR positive pour *L. pneumophila*.

Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 10 prélèvements. Pour 58 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié (Tableau 6). Une absence d'amplification a été observée pour 65% des prélèvements analysés.

Cette technique est utilisée actuellement au CNR sur tous les prélèvements de légionellose confirmé reçus au CNR pour lesquels la culture est négative. Cette technique qui présente de faible performance reste utile pour les investigations notamment pour distinguer deux isolats. Cette méthodologie doit être limitée aux cas pour lesquels l'identification de la source de contamination est importante. Nous prévoyons de diminuer la réalisation des Nested-SBT à ces seuls cas en 2017.

**Tableau 6.** Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.

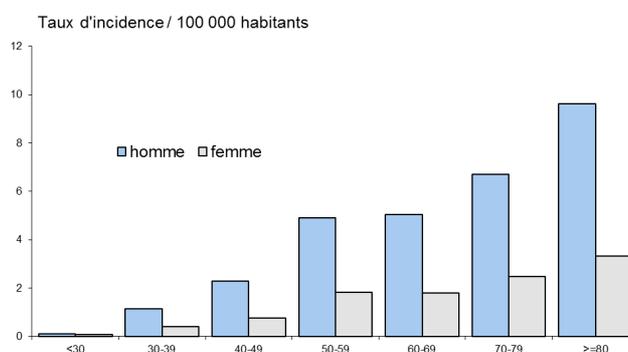
Année	Nombres de gènes pour lesquels un résultat est disponible								Nombre total de prélèvements
	7 (%)	6	5	4	3	2	1	0 (%)	
2012	16 (14,3)	6	6	2	8	4	20	50 (44,6)	112
2013	16 (11,4)	6	4	5	7	11	11	80 (57,1)	140
2014	15 (10,5)	5	5	6	4	6	18	84 (58,7)	143
2015	11 (4,9)	13	13	11	10	19	36	110 (49,3)	223
2016	10 (6,0)	6	4	8	7	10	13	108 (65,1)	166

### 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

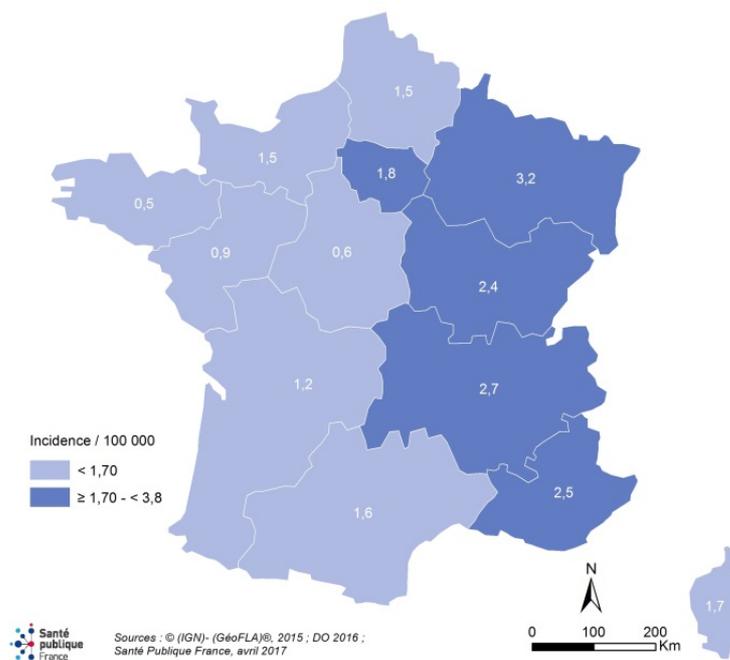
#### 3.1.3.1 Représentativité des cas de légionellose pour lesquels une souche est disponible

**Le bilan de 2016 réalisé par Santé Publique France** montre une stabilité de l'ensemble des caractéristiques des cas de légionellose que ce soit en terme d'âge, de sexe, de saisonnalité ou du gradient géographique «Ouest-Est» (Figures 9 et 10).

En 2016, l'âge médian des cas était de 63 ans [Min-Max : 17-106 ans] et le sexe ratio homme/femme était de 2,3 (846 hommes et 372 femmes). L'incidence augmentait avec l'âge et les taux d'incidence les plus élevés s'observaient chez les personnes de plus de 80 ans (5,5 / 100 000).



**Figure 9.** Taux d'incidence par classe d'âge et par sexe des cas de légionellose notifiés en France en 2016.



\*standardisé sur le sexe et l'âge

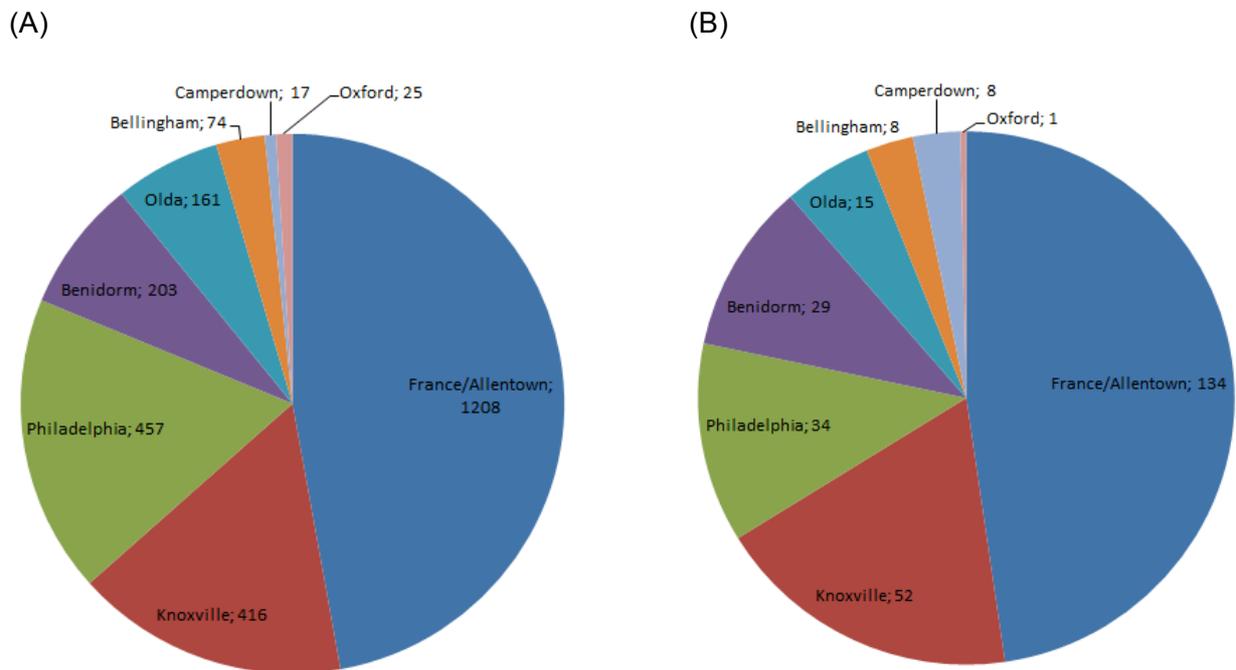
**Figure 10.** Distribution du taux d'incidence standardisé\* de la légionellose selon la région (nouvelle) de domicile en France métropolitaine, 2016.

**En 2016**, la mortalité globale pour l'ensemble des cas de 2016 était de 11,9%. Les légionelloses diagnostiquées chez les patients pour lesquels une souche est isolée sont plus sévères avec un décès observé dans **16,9%** des cas versus **10,1%** pour les cas sans souche disponible.

### 3.1.3.2 Caractérisation des souches et description des ST responsables de la majorité des cas de légionellose en France

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

La répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* séro groupe 1 d'origine clinique montre une proportion importante des sous-groupes réagissant avec l'Ac mAb3/1 : France/Allentown (47,7%), Knoxville (18,5%) et Philadelphia (12,1%). Elle est relativement constante d'une année à l'autre (Figure 11).



**Figure 11.** Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 (A) parmi les 2561 souches d'origine clinique isolées entre 2008 et 2016 et (B) parmi les 281 souches d'origine clinique isolées en 2016.

- **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 (profil PFGE non connu dans notre base de données) par rapport à l'ensemble des souches analysées (<20%). 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.

Le séquençage de génome entier est en développement pour remplacer à terme ces 2 méthodes.

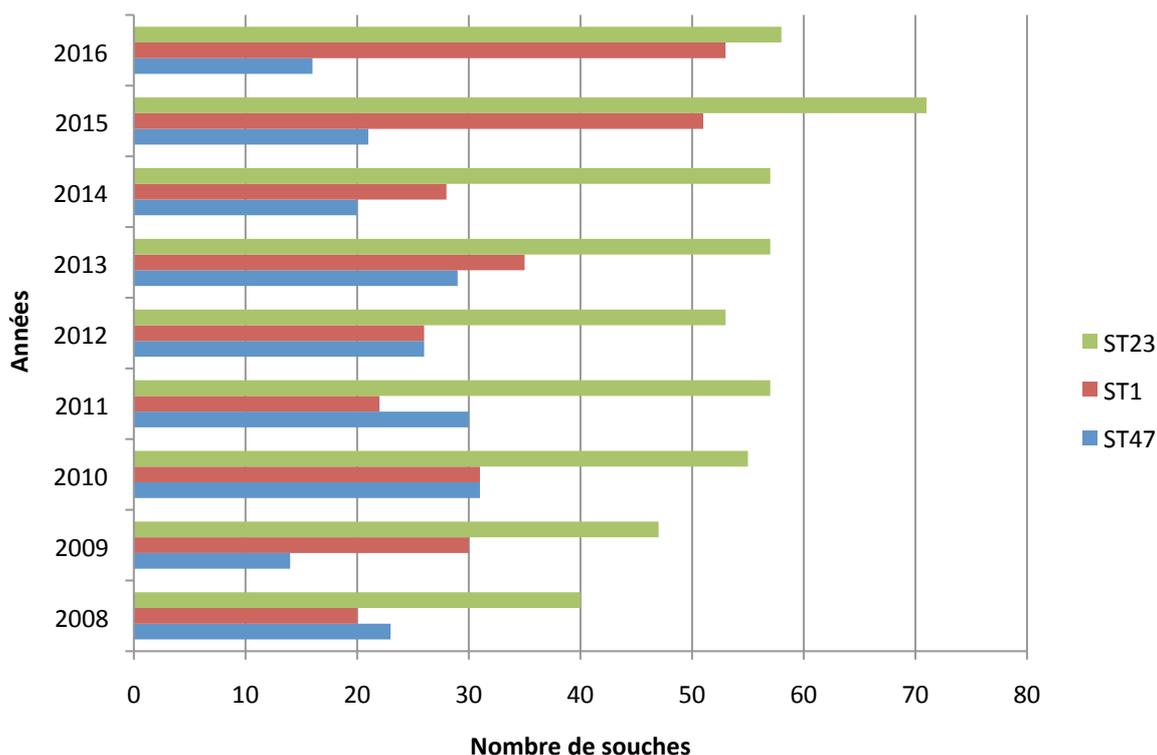
- **Sequence Based Typing (SBT)**

En 2016, l'ensemble des Lp1 étudiées appartenait à 88 *Sequence Type* (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans le tableau 7. **Plus de 53% des souches appartiennent à 8 ST, les ST23, ST1, ST47, ST62, ST259, ST146, ST40 et ST20.**

L'analyse de la distribution des différents STs a été réalisée sur une période de 9 ans de 2008 à 2016 (Tableau 7, Figure 12).

**Tableau 7.** Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2016.

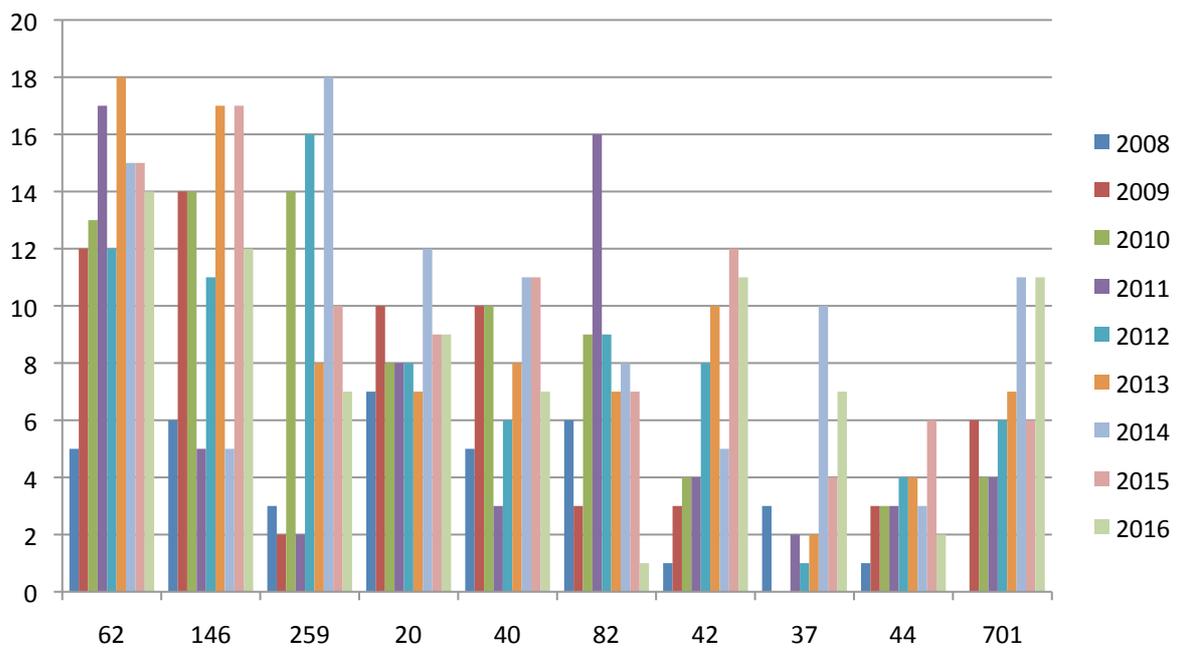
ST	Années									TOTAL	%
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016		
23	39	39	53	55	50	55	55	68	41	455	18%
1	19	24	24	17	25	29	27	41	23	229	9%
47	23	15	31	29	27	26	17	20	15	203	8%
62	5	12	13	17	12	18	15	15	14	121	5%
146	6	14	14	5	11	17	5	17	12	101	4%
259	3	2	14	2	16	8	18	10	7	80	3%
20	7	10	8	8	8	7	12	9	9	78	3%
40	5	10	10	3	6	8	11	11	7	71	3%
82	6	3	9	16	9	7	8	7	1	66	3%
42	1	3	4	4	8	10	5	12	11	58	2%
701	0	6	4	4	6	7	11	6	11	55	2%
9	5	1	4	3	11	3	5	7	8	47	2%
444	4	2	3	5	6	4	12	3	5	44	2%
94	3	3	7	0	7	9	8	2	2	41	2%
48	2	5	2	8	3	3	5	7	5	40	2%
107	11	3	3	0	2	5	1	5	3	33	1%
96	2	3	5	4	5	4	0	4	4	31	1%
224	2	1	4	2	3	3	3	4	8	30	1%
37	3	0	0	2	1	2	10	4	7	29	1%
44	1	3	3	3	4	4	3	6	2	29	1%
75	4	2	0	4	4	3	5	5	1	28	1%
65	4	0	2	2	3	3	6	5	2	27	1%
435	4	1	5	2	2	4	4	1	3	26	1%
Autre	47	46	53	56	71	73	70	84	98	598	24%
<b>TOTAL</b>	<b>206</b>	<b>208</b>	<b>275</b>	<b>251</b>	<b>300</b>	<b>312</b>	<b>316</b>	<b>353</b>	<b>299</b>	<b>2520</b>	<b>100%</b>



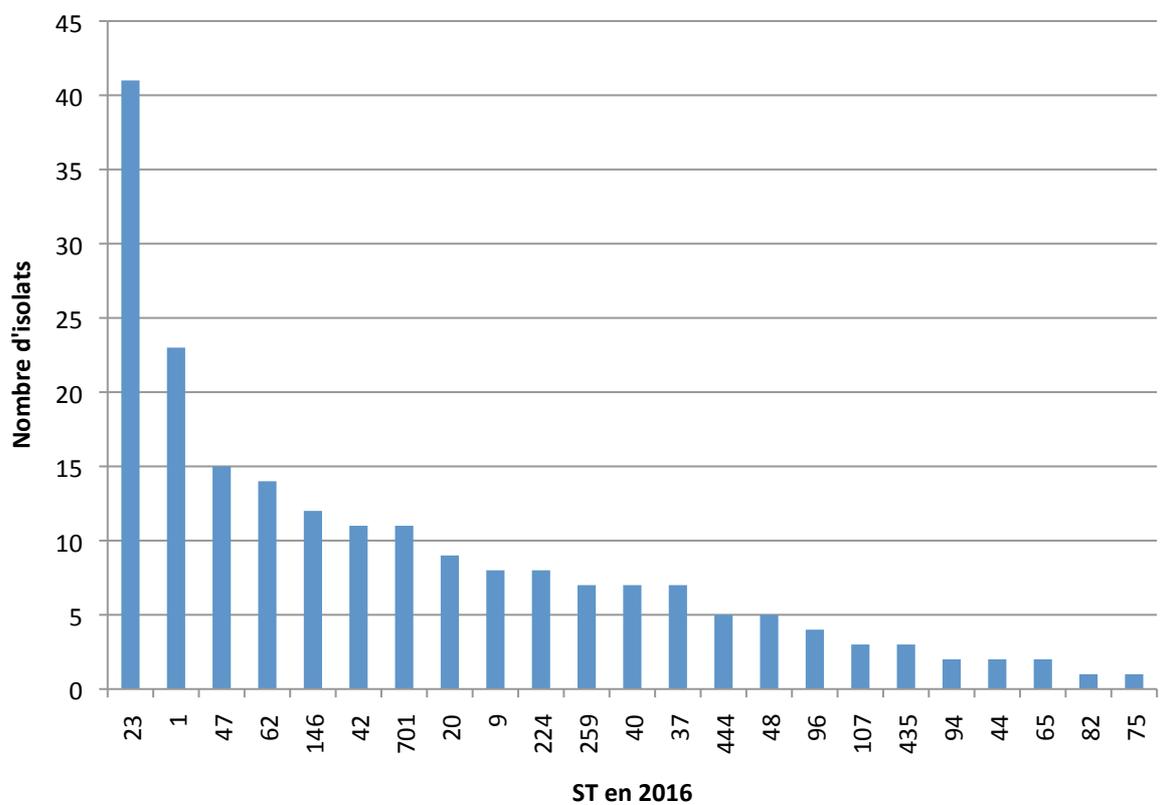
**Figure 12.** Evolution de la distribution des 3 principaux ST associés à l'infection en France de 2008 à 2016.

#### - Emergence de différents ST

Différents ST identifiés de façon plus ou moins régulière dans le passé semblent émerger ces dernières années. Il s'agit des ST20, 37, 40, 42, 44, 62, 82, 146, 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 européennes EWGLI, les ST 20, 40, 44 et 701 sont principalement isolés en France. Les ST 37, 82, 146 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. Le ST82, principalement isolé dans des pays d'Europe, a été identifié aux Etats Unis, en Europe, en Russie et au Japon.



**Figure 13.** Evolution de la distribution des souches des ST émergents en France de 2008 à 2016.



**Figure 14.** Evolution de la distribution des souches des ST en France en 2016.

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

### 3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées

*Legionella* est caractérisée par une grande sensibilité aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des légionelloses. Jusqu'en 2014, aucune souche clinique ou environnementale résistante aux antibiotiques n'avait été détectée. L'isolement d'une souche clinique résistante aux fluoroquinolones (Bruin *et al.*, JAC, 2014) puis la description d'une acquisition d'une résistance *in vivo* sous antibiothérapie par NGS (Shadoud *et al.*, EBioMedicine, 2015) chez deux patients traités par fluoroquinolones nous incitent à maintenir une surveillance de la résistance aux antibiotiques chez *Legionella*.

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

### 3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

#### - Techniques phénotypiques

En l'absence de méthode de référence définie par le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ou l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) pour la réalisation d'un antibiogramme chez *Legionella*, le CNR a développé et utilise une technique de **microdilution**.

Des travaux réalisés sur 109 souches cliniques de la collection du CNR caractérisées sur la base de données cliniques et génomiques (WGS) et sur des souches résistantes aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine sélectionnées *in vitro* ont permis de définir la distribution des CMI d'une population sauvage ainsi que les valeurs seuils au-delà desquelles une résistance doit être suspectée (Vandewalle *et al.*, Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, soumis à IJAA) (cf paragraphe 6.1.1)

Le CNR dispose également d'une technique **intracellulaire** sur lignée monocyttaire permettant de déterminer les concentrations extracellulaires inhibant la croissance intracellulaire de *Legionella*.

#### - Techniques moléculaires

Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche, le CNR dispose de **PCR ciblées** pour détecter une résistance aux antibiotiques indiqués dans l'antibiothérapie des légionelloses :

- mutations ribosomiques associées à une résistance aux macrolides (d'après des travaux du CNR, Descours *et al.*, *Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in Legionella pneumophila*, AAC en 2017);
- mutations sur l'ADN gyrase associées à la résistance aux fluoroquinolones (d'après la collaboration avec le laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes à Grenoble (CNRS UMR5163, Institut Jean Rouget, M. Maurin et D. Schneider) (travaux menés en 2012);
- mutations dans le gène de la sous-unité de l'ARN polymérase N (*rpoB*) (cluster I) associées à la résistance à la rifampicine (d'après les travaux du CNR, 2015).

Suite à ces travaux, le CNR a développé un outil **NGS** présentant une meilleure sensibilité que les outils précédents. Après réalisation d'une PCR en temps réel ciblée sur les gènes

mutés en cas de résistance aux trois familles thérapeutiques (*rplD*, *rplV*, *rrl*, *gyrA* et *rpoB*), un séquençage NGS est réalisé sur les produits de PCR. Il présente l'avantage de pouvoir détecter des sous-populations résistantes présentes dans une proportion de 0,5% au sein de la population totale.

### **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 Santé Publique France**

#### **3.3.1.1 Périodicité**

Les échanges avec Santé Publique France 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 adéquates à réaliser, etc) ;
- d'élaborer de nouvelles études ou analyses communes.

#### **3.3.1.2 Echanges de données**

- Notification hebdomadaire du CNR à Santé Publique France des diagnostics par culture (par email et télécopie). Santé Publique France 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 2016, toutes les souches signalées sur la DO ont été transmises au CNR.
- Santé Publique France 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 Santé Publique France. Chaque fin d'année, les données de ce fichier sont validées par Santé Publique France (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 2016, dans le cadre du diagnostic des cas de légionellose et des investigations de cas, **493 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à Santé Publique France. Ce chiffre est relativement stable par rapport aux années précédentes et en adéquation avec le nombre de cas diagnostiqué (496 courriers en 2014, 682 courriers en 2015).

Par ailleurs de nombreux contacts avec les ARS sont réalisés par messagerie électronique (envoi des demandes de comparaison, demande d'information, demande de résultats...). En moyenne, de 1 à 5 contacts quotidiens sont réalisés par ce moyen.

### 3.3.1.3 Analyses communes

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

Parmi les 1218 cas de légionellose diagnostiqués en 2016 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2016), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **37 cas sporadiques**, soit 3,0 % de l'ensemble des cas (Tableau 9). Un isolement de *Legionella* par culture a été obtenu dans 24,6 % des cas. Une investigation entre souche environnementale et souche clinique a ainsi été réalisée pour **12,3 %** des cas de légionellose avec souche. Pour 3 cas, la souche clinique a été comparée aux souches environnementales isolées d'un ou plusieurs lieu(x) fréquenté(s) par le malade ce qui augmente le nombre total de comparaisons à 40.

Pour les 37 cas investigués, les profils génomiques des souches cliniques et environnementale(s) se sont révélés identiques pour **21 cas (57%)**. Au final, l'année 2016 montre un nombre total d'investigations plus faible que les années précédentes, notamment bien plus faible que celui de 2015 où 66 cas avaient été investigués. En 2016, contrairement à l'année 2014 où le nombre d'investigations avait diminué (46 cas) au profit d'un gain d'efficacité avec 67% d'enquêtes positives, le pourcentage d'enquêtes positives reste stable (Tableau 8).

**Tableau 8.** Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000.

Année	Total des investigations N	Investigations positives	
		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
2015	66	38	58
<b>2016</b>	<b>37</b>	<b>21</b>	<b>57</b>
Total	777	433	56

Les souches environnementales comparées ont été isolées de réseaux d'eaux sanitaires appartenant à 18 hôpitaux, 5 EHPAD, 9 domiciles, 1 établissement de tourisme, 1 TAR et 6 autres établissements (Tableau 9). Parmi les 6 autres établissements, nous retrouvons une maison d'arrêt, deux piscines, un lieu de travail, un couvent et un centre de formation.

Le nombre de TAR investigués est très faible (1 cas en 2016) et diminue constamment ces dernières années ce qui est en accord avec les recommandations du guide de la Haute Autorité de Santé publique qui préconise de n'investiguer les TARs que dans un contexte de cas groupés. Le nombre d'investigations est plus faible en 2016 en comparaison à 2015 du fait d'un nombre global plus faible de cas notifié et de la quasi-absence d'investigations liées à des établissements de tourisme (seulement 1 cas).

Pour les 37 cas de 2016, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination dans 8 établissements de santé, 4 maisons de retraite, 6 domiciles et 3 autres établissements publics (Tableau 11).

L'année 2016 se distingue également par un pourcentage paradoxalement faible d'investigations positives dans les hôpitaux (44% contre 73% les années précédentes). Les investigations dans les Ehpad restent très souvent positives et le domicile investigué uniquement en cas de forte suspicion se montre également très concluant. Ces conclusions nous confortent dans l'idée de rechercher de nouvelles sources de contamination.

Parmi les investigations positives, 5 concernaient des souches Paris et 2 des souches Louisa (Tableau 11). Ces profils dits endémiques ne permettent pas de conclure formellement au sujet de la source de contamination.

**Tableau 9.** Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2016.

	Investigations positives		Investigations négatives N	Total des investigations	
	N	%		N	%
Hôpitaux	8	44	10	18	46
Ehpad	4	80	1	5	12
Domicile	6	67	3	9	22
Tourisme	0	0	1	1	2,5
Autre	3	50	3	6	15
TAR	0	0	1	1	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>53</b>	<b>19</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

**Tableau 10.** Investigations épidémiologiques réalisées entre 2008 et 2015.

	Investigations positives		Total des investigations	
	N	%	N	%
Hôpitaux	69	73	95	22
Domicile	64	63	102	24
Tourisme	42	68	62	15
Autre (dont Ehpad)	51	65	79	18
TAR	7	8	88	21
<b>TOTAL</b>	<b>233</b>	<b>55</b>	<b>426</b>	<b>100</b>

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

	Profil souches cliniques / environnementales					
	Total	identique				différent
		Paris	Louisa	Biarritz	Autres	
Domicile	9	3	0	0	3	3
Tourisme	1	0	0	0	0	1
Hôpitaux	18	1	0	0	7	10
Ehpad	5	1	0	0	3	1
Autre	6	0	2	1	0	3
TAR	1	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>13</b>	<b>19</b>

### 3.3.1.4 Etudes collaboratives

- **Publications / Communications communes en 2016**

- A.G. Ranc, H. Hanneltel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Contribution of the Amoebae Plate Test (APT) to the isolation of *Legionella* spp. from clinical samples: prospective analysis over a period of 9 months, Oral presentation, 4th ESGLI Conference, Amsterdam, 22-23 september 2016.
- S. Jarraud, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, M. Mentasti, J. Sweetman, R. Tewole, C. Campese, A. Underwood, N. Fry, V. Chalker, T.G. Harrison. Whole Genome Sequencing supports the role of waste-basin aeration as a direct source of disease transmission during Lens Outbreak. Oral presentation, 4th ESGLI Conference, Amsterdam 22- 23 september 2016.
- H. Hanneltel, J-V. Reynaud, C. Kolenda, A-G. Ranc, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Apport de l'*Amoebae Plate Test* dans l'isolement de souches cliniques de *Legionella*. Communication affichée, RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
- S. Jarraud, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, J. Sweetman, M. Mentasti, R. Towolde, C. Campese, J. Etienne, A. Underwood, N. Fry, T. G. Harrison, V.Chalker. Investigation de l'épidémie de légionellose de Lens : apport du WGS. Communication orale, RICAI 2016, 13 Décembre 2016

- **Etudes programmées pour 2017**

- **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 programmée en 2017.

- **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. Cette étude a débuté en 2015. Seule une souche de légionelles a été isolée de ces appareils en 2016 grâce à l'utilisation de la méthode *APT*. Actuellement aucune investigation n'a permis de comparer la souche du patient et la souche isolée de ces appareils (l'une ou l'autre étant indisponible). 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 Santé Publique France, les ARS et le CNR.

### **3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens**

#### **Expertise**

- 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.
- Participation au groupe de travail international ESGLI pour le développement du « Whole genome sequencing » comme outil de typage des souches.

#### **Collaborations**

- Participation au groupe de travail ESGLI pour le développement d'une PCR spécifique des *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1 applicable directement sur prélèvements (cliniques et environnementaux).
- Participation au groupe de travail ESGLI pour le développement d'un nouvel outil de typage directement à partir de prélèvements cliniques par nested-SBT.
- Coordination avec Valeria Gaia (Suisse) et Soren Uldum (Danemark) d'une étude européenne sur l'évaluation des kits pour la détection des antigènes urinaires. Cette étude sera menée en 2017.
- Coordination d'une étude européenne sur l'utilisation de la co-culture amibienne pour l'isolement de souches environnementales.
- Participation à une étude européenne pour l'identification de ou des sources environnementale(s) de *L. pneumophila* séro groupe 1 ST47.

#### **Envoi de données, de souches**

- 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](http://www.ewgli.org)). Au total, les données de 3285 souches françaises ont été renseignées sur le site sur un total de 11578 souches.

### **3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

#### **3.4.1 Détection rapide par PCR spécifiques des clones majoritaires**

##### **3.4.1.1 Amélioration de la prévention par détection rapide du clone ST1 par PCR spécifique**

Certains clones, notamment le ST1 sont responsables de près de 10% des cas de légionellose avec une souche isolée. Ce ST est particulièrement impliqué dans les cas nosocomiaux. La mise au point d'une PCR spécifique de ce clone ST1 permettrait d'identifier rapidement une source de contamination possible en s'affranchissant de la culture.

Le développement de la PCR sur souche, en cours, se fait en collaboration avec Jacob Moran - Gilad (Israël) et Massimo Mentasti (UK). Une fois celle-ci mise au point par notre laboratoire, une étude collaborative européenne sera étendue à d'autres pays pour évaluer ses performances sur des échantillons environnementaux et des prélèvements pulmonaires.

#### 3.4.1.2 Développement d'une PCR spécifique du clone ST47

Notre objectif est d'identifier de nouveaux réservoirs de légionelles par **détection rapide du clone *L. pneumophila* ST47 par PCR spécifique**. Les souches ST47 sont responsables de 7% (en France) à 40% (en Hollande) des cas de légionellose en Europe du Nord avec une souche isolée alors que leur réservoir n'a pas été identifié. En effet, ces souches ST47 sont exceptionnellement isolées dans l'environnement. Une analyse de génomique comparative a été appliquée pour développer un test PCR et mieux comprendre l'évolution de cette souche.

**Méthodes.** L'analyse comparative de 36 génomes représentatifs de l'espèce *L. pneumophila* a été utilisée pour identifier des cibles de PCR spécifiques qui ont ensuite été évalués *in silico* sur 545 génomes séquencés, et *in vitro* sur 436 souches de *Legionella*, 106 échantillons respiratoires et trois échantillons d'eau provenant de sources de ST47 prouvées. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées pour comprendre l'évolution des souches ST47.

**Résultats.** Le gène LPO\_1073 a été caractérisé comme étant 100% conservé dans les 129 génomes ST47 analysés. Une PCR en temps réel conçue pour détecter LPO\_1073 a été positive pour les 110 souches testées ST47 et conformément aux résultats de culture et de typage précédemment obtenus pour les 106 échantillons respiratoires. Les trois échantillons de l'environnement ont également été positifs. De façon étonnante, 26 des 44 souches ST109 testées parmi les 342 souches non-ST47 étaient positives avec la PCR ST47. L'analyse phylogénétique basée sur les SNPs a été entreprise pour comprendre ce résultat : les génomes des ST109 PCR-positives étaient presque identiques aux génomes des ST47, à l'exception d'une région recombinée probablement acquise par les ST47 d'une souche ST62 (ou ST62-like). Ces souches ST109, à la différence des souches ST47, sont rarement impliquées dans les cas de légionelloses.

**Conclusion.** L'analyse génomique a permis la conception d'un test de PCR hautement spécifique pour la détection rapide des souches ST47. En outre, cette analyse a permis de décrire l'évolution des souches ST47 à partir des souches ST109 par recombinaison homologue avec ST62. Nous émettons l'hypothèse que cette recombinaison a généré une propension accrue pour induire la maladie.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le PHE de Londres (Tim Harrison / Massimo Mentasti), Sanger Institute et l'Institut Pasteur de Paris et ont été publiés en 2016 :

M. Mentasti, P. Cassier, S. David, C. Ginevra, L. Gomez-Valero, A. Underwood, B. Afshar, J. Etienne, J. Parkhill, V. Chalker, C. Buchrieser, T. G. Harrison and S. Jarraud; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47. **Clin Microbiol Infect.** 2016 Nov. 30

Une nouvelle collaboration Européenne est en cours (Hollande, Angleterre, France, Belgique) sur une large campagne d'investigation de réservoirs non habituellement investigués par PCR spécifique.

## 4 Alerte

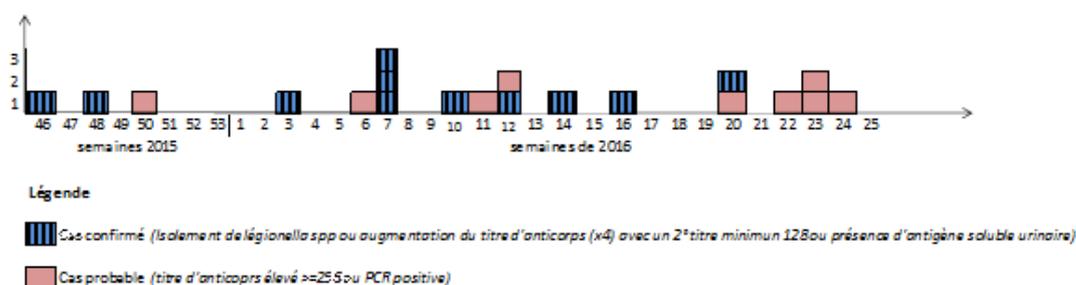
### 4.1 Procédure d'alerte de Santé Publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal et événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte en 2016

L'alerte de Santé Publique France est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Jean-Paul Guthmann et Christine Campese. La DGS est alertée par courrier électronique à DGS-alerte ([alerte@sante.gouv.fr](mailto:alerte@sante.gouv.fr)).

### 4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

#### 4.2.1 Cas groupés de légionellose à La Réunion

En mars 2016, une alerte a été lancée par la Cire Océan Indien (OI), portant sur une sur-incidence de cas de légionellose. Cette alerte faisait suite à un nombre de cas inhabituellement élevé (une quinzaine) dont trois cas de légionellose confirmés sur la région de Saint-Pierre entre novembre 2015 et mars 2016, alors que le nombre de cas annuels sur l'île de La Réunion variait, entre 2002 et 2015, entre 2 et 8 cas (moyenne de 3,5 cas par an, soit 0,47 cas / 100 000 habitants) (Figure 13).



**Figure 15.** Distribution des cas de légionellose selon la date de début des signes, île de La Réunion, novembre 2015 – juin 2016.

Au final, un total de 20 cas, dont 2 touristes, a été diagnostiqué :

- 11 cas confirmés (10 avec Ag urinaire positif dont un avec une souche de Lp1 isolée, 1 PCR positive avec isolement de Lp13) ;
- 9 cas probables (8 PCR positives, 1 sérologie positive pour Lp2) ;

Les caractéristiques des patients étaient les suivantes :

- 7 femmes et 13 hommes (sex-ratio H/F=1,8)
- âge médian : 56,5 ans
- 18 cas avec au moins un facteur de risque de légionellose
- cas répartis sur toute l'île et résidant sur 13 communes
- tous hospitalisés, dont 12 en réanimation et 1 en soins continus
- 12 au CHU sud, 5 au CHU nord, 1 au GHER, 1 au CHGM, 1 au CH de Dax
- deux patients sont décédés : un homme de 91 ans et une femme 75 ans, co-infectée par la grippe A (H1N1).

Des investigations ont été menées auprès des professionnels de Santé, biologistes et cliniciens réanimateurs et urgentistes des 4 hôpitaux de l'île, afin de déterminer s'ils avaient procédé à des changements de pratiques professionnelles. Les habitudes de prescription

des tests et les méthodes diagnostiques biologiques n'ont pas été modifiées entre 2015 et 2016, ce qui ne permet pas d'expliquer cette sur-incidence de cas.

Une exposition à une ou plusieurs sources communes et persistantes a été suspectée. Différentes sources potentielles (TARs, fontaines décoratives, centres commerciaux, brumisateurs, douches aéroport) dans les zones de fréquentation / résidence communes des patients ont été investiguées. Après analyse de la courbe épidémique, la seule hypothèse retenue est la possibilité de survenue de cas en lien avec des TARs dans la zone Sud de l'île, sans que l'origine de contamination n'ait été identifiée.

En l'absence de souches cliniques isolées pour la quasi-totalité des cas, le CNR n'a pu confirmer le lien épidémiologique entre les patients. Par ailleurs, aucune souche environnementale n'a été adressée au CNR afin d'investiguer une potentielle source commune de contamination.

Différentes mesures ont été mises en place localement afin de mieux diagnostiquer les cas et détecter les sources éventuelles de contamination. Les cliniciens ont été sensibilisés à la réalisation de prélèvements respiratoires bas et envoi au CNR pour isolement de souche.

#### **4.2.2 Cas groupés et phénomènes de sur-incidence**

L'ARS a déclaré une sur-incidence aux alentours de Belley (01300), avec 7 cas diagnostiqués par antigènes urinaires entre juillet 2015 et septembre 2016. Une souche clinique a pu être isolée pour seulement 2 cas et le typage épidémiologique de ces souches a révélé des profils différents. Dans le cadre de cette investigation, le CNR a reçu des souches *Lp1* isolées de douche d'une piscine de copropriété et des *Lp1* isolées de l'eau chaude sanitaire d'un EHPAD. Le typage épidémiologique a montré que ces souches présentaient des caractéristiques différentes des souches cliniques. Une TAR située dans la région de Belley a été confrontée à plusieurs analyses non concluantes car contaminées par de la flore interférente. L'ARS a sollicité le CNR pour la réalisation d'analyses complémentaires sur ces eaux mais face à une PCR négative, ces analyses n'ont pas été réalisées. L'origine de cette sur-incidence n'est actuellement pas expliquée.

En août 2016, le CNR a signalé une souche de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 associée au CH de Créteil (94000). Cette souche présente un profil PFGE spécifique, ST 1102, sous-groupe France/Allentown et n'a été retrouvée que 8 fois par le CNR, 2 fois dans des prélèvements cliniques de patients hospitalisés dans cet établissement en 2015 et 2016 et 6 fois dans des prélèvements d'eau de cet hôpital.

Au début de l'année 2016, nous avons investigué une série de 5 cas de légionellose diagnostiqués au cours du mois de décembre 2015 au CH de Strasbourg. Nous avons comparé 2 souches isolées de prélèvements respiratoires de 2 des patients, ainsi que des allèles obtenus pour 2 autres patients par la technique de séquençage directement sur prélèvement (Nested Sequence Based Typing). Ces résultats nous ont permis de conclure que toutes les souches étaient différentes.

Suite à une déclaration de suspicion de cas groupés concernant 6 patients à Chambéry, nous avons analysé 2 souches cliniques qui se sont avérées différentes, un sérum qui était positif mais ne permettait pas de comparaison et un extrait d'ADN également positif à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 mais n'offrant pas la possibilité de pousser l'investigation. Pour les 2 autres patients, le CNR n'a reçu aucun prélèvement. Au vu des résultats microbiologiques, aucun lien n'a pu être établi entre les patients.

### 4.2.3 Infections extra-pulmonaires

En 2016, le CNR a diagnostiqué 2 cas d'infections extra-pulmonaires à *Legionella* : une arthrite à *Legionella bozemanii* et une possible endocardite à *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

L'infection articulaire de poignet gauche à *Legionella bozemanii* a été diagnostiquée en février 2016 chez une patiente de 56 ans atteinte d'un syndrome des anti-synthétases (maladie inflammatoire auto-immune). Le diagnostic a été obtenu par PCR universelle (16S) sur plusieurs prélèvements puis confirmé par PCR - séquençage de l'espace intergénique 23S-5S. Pour l'un des prélèvements, nous avons obtenu également une culture positive à *Legionella bozemanii*. Deux sérums réalisés avant puis à distance de l'infection montrent une séroconversion avec des titres d'anticorps anti-*L. bozemanii* passant d'un titre <16 à 256. L'investigation de ce cas a retrouvé la notion d'une chute avec blessure sur un sol extérieur humide trois jours avant une injection de corticostéroïdes dans ce même poignet. Les radiographies pulmonaires réalisées avant et après l'infection ne montrant pas de modifications, l'hypothèse d'une inoculation directe suite à la chute, favorisée par l'injection de corticoïdes est celle retenue.

Ce cas clinique, ainsi qu'une revue de la littérature, a été présenté au *ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI) Congress* qui a eu lieu en septembre 2016 à Amsterdam.

La PCR universelle 16S est également la technique qui a permis le diagnostic du second cas. Elle s'est avérée positive à *Legionella pneumophila* sur un prélèvement de valve mitrale, identification confirmée par la PCR spécifique *L. pneumophila* séro groupe 1. Cependant, ni la mise en culture des prélèvements, ni la technique d'immunofluorescence directe sur valve ne se sont révélés positives. L'antigène urinaire au moment de la chirurgie valvulaire était positif (détection réalisée à postériori) et les sérologies montrent une séroconversion. Seuls les résultats d'anatomo-pathologie n'étaient pas en faveur du diagnostic d'endocardite infectieuse. Le patient n'a pas présenté de pneumonie, excepté cinq mois précédant sa chirurgie cardiaque.

### 4.2.4 Infection persistante

Comme déjà décrit par notre laboratoire en 2013 (Descours *et al.* Case Report. Legionellosis and Lung abscesses: Contribution of *Legionella* Quantitative Real-Time PCR to an Adapted Follow-up), cette année, au CHU de Lyon, nous avons observé une persistance d'infection pulmonaire chez un patient de 35 ans, traité par anti-TNF pour une maladie de Crohn. Le premier diagnostic a été posé le 1<sup>er</sup> juillet 2016 par un antigène urinaire positif. Les prélèvements d'expectorations ont permis d'isoler la souche responsable de l'infection : *L. pneumophila* séro groupe 1, profil sporadique, ST62, sous-groupe Knoxville. Vingt jours plus tard, face à l'absence d'amélioration clinique et la découverte d'une excavation au niveau du lobe droit, de nouveaux prélèvements respiratoires ont été effectués et se sont avérés être toujours positifs par PCR à *Legionella pneumophila* séro groupe 1, ST62. La culture était par contre négative. Le traitement initial par ofloxacine - spiramycine a dû être interrompu face à l'apparition d'une insuffisance rénale aigue vraisemblablement immuno-allergique et a été remplacé par rifampicine - spiramycine pour une durée de 3 mois. Fin août 2016, le patient alors suivi en consultation, présentait toujours des PCR fortement positives dans ces prélèvements respiratoires et une faible amélioration clinique. Fin novembre 2016, trois semaines après l'arrêt des antibiotiques, le patient ne présentait enfin plus de toux, plus de dyspnée et plus de fièvre.

#### **4.2.5 Analyses environnementales particulières (humidificateur, spa, WC, ...)**

Dans le cadre de sa mission d'aide aux investigations, le CNR participe à l'analyse d'eaux complexes afin de rechercher la présence de *Legionella* dans des environnements autres que les eaux chaudes sanitaires. En cas de souches isolées dans ces environnements, le CNR réalise si possible la comparaison avec la souche clinique isolée dans le prélèvement respiratoire du patient.

En 2016, le CNR a analysé 6 prélèvements sur des appareils d'oxygénothérapie pouvant être de l'eau résiduelle, de l'eau de rinçage, voir occasionnellement des écouvillons de tubulure, 1 prélèvement dans une baignoire de balnéothérapie et 7 prélèvements d'eau froide de cuvettes de toilettes. Ces analyses ont été réalisées par culture conventionnelle (4 cas) et/ou co-culture amibienne (10 cas) et/ou PCR (3 cas).

Ceci a permis d'isoler des souches de *Legionella* pour un cas et une comparaison entre une souche clinique et une souche environnementale issue d'un prélèvement autre que « eau chaude sanitaire » a pu être réalisée trois fois (souches environnementales isolées au CNR ou dans un laboratoire extérieur).

Parmi ces cas, nous retenons :

- la découverte de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 dans un spa d'un cabinet de kinésithérapie avec une souche identique à celle isolée dans le prélèvement respiratoire d'un des 2 patients infectés. Pour le second patient, aucune souche n'a pu être isolée ;
- l'investigation menée pour rechercher la source de contamination de 2 cas survenus dans un service d'onco-hématologie où douches et robinets sont équipés de filtres. L'analyse de prélèvements d'eau froide de cuvettes de toilettes a permis d'isoler des *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Les 9 souches isolées présentaient des caractéristiques identiques aux 2 souches des patients, à savoir un profil Paris, ST1, Philadelphia. En raison du caractère endémique de ce profil de souche, ce résultat ne permet pas à lui seul de conclure quant à l'origine de la contamination. Afin d'affiner cette comparaison, une technique de séquençage de génome complet a été réalisée sur ces 11 souches. Les premières analyses phylogénétiques des SNP du « core genome » permettent de grouper toutes les souches ensemble, ce qui traduit une proximité génétique des deux isolats cliniques et des isolats environnementaux. La souche d'un des deux patients est particulièrement proche des souches isolées de sa chambre (17-18 SNP). Des analyses plus poussées sur le « core » et l'« accessory genome » ainsi que sur la présence d'éléments mobiles sont en cours afin de mieux caractériser ces isolats. En plus de ces souches isolées par le laboratoire du CH concernés, des analyses complémentaires par technique de co-culture amibienne (APT) ont été menées sur ces eaux mais n'ont pas permis d'isoler de nouvelles souches. Si cette source de contamination est confirmée par le NGS, il s'agira de la première description de cette source de contamination pour une légionellose ;
- l'isolement de souche de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 grâce à la technique d'APT dans un prélèvement d'eau d'humidificateur. Sur ce même prélèvement, les PCR *Legionella* spp, *Legionella pneumophila* et *L. pneumophila* séro groupe 1 s'étaient révélées fortement positives alors que la culture conventionnelle s'était révélée négative à cause d'une contamination massive par *Pseudomonas aeruginosa*. Sur le prélèvement respiratoire du patient concerné, aucune souche n'avait pu être isolée mais le typage directement sur prélèvement par technique de Nested Sequence-Based-Typing avait permis d'identifier 6 gènes sur 7 et de conclure que les souches avaient des caractéristiques communes.

## 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

- Sylvie Davidian, hygiéniste au CH de Chalon-Sur-Saône (71100). Rencontre d'½ journée intitulée « interview d'expert » dans le cadre d'un DU. 26 mars 2016.
- Myriam Roura, technicienne de laboratoire au service d'hygiène du CH de Montpellier, formation théorique et pratique de 2 jours sur la légionellose, la recherche de *Legionella* dans les prélèvements cliniques et l'accréditation de la recherche de *Legionella* dans les prélèvements d'eau. 24 et 25 avril 2016.
- Julien Ladet, IUT Génie Biologique option A.B.B. (Analyses biologiques et biochimiques), 2<sup>ème</sup> année, stage de fin d'études à temps plein : APT (*Amoebae Plate Test*) pour la détection de légionelles dans les environnements complexes. 4 avril – 10 juin 2016.
- Pauline Jouve, École Nationale Supérieure de Technologie des Biomolécules de Bordeaux (ENSTBB), 2ème année. Travaux de Recherche sur les protéines Lpp2879-Lpp2880 de *L. pneumophila*. 1er juin – 2 août 2016.

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

Thèses d'Université, Université Claude Bernard Lyon 1 :

- Marine Vandewalle : Caractérisation de l'effet de peptides antimicrobiens humains sur l'infection par *Legionella pneumophila* (novembre 2013 – décembre 2016) (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

- Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) (1h), Rennes.
- *Legionella*, Master 2 Recherche Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie (3h), Faculté de médecine de Tours, Septembre 2016.
- *Legionella*, cours Master 1 IPROB (4h), Faculté Catholique de Lyon, 8 avril 2016.

### 5.2 Guides élaborés

**Membre du groupe de travail du Haut Conseil de la Santé Publique** – Avis sur projet de décret relatif à la prévention des risques sanitaires liés aux systèmes collectifs de brumisation d'eau, et l'arrêté qui en découle.

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

#### 5.3.1 Rétro-information aux partenaires

- Rétro-information aux ARS – laboratoires – cliniciens : courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation.
- 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).
- Sur le site web EWGLI : mise en ligne de nos données de SBT dans la base de données européennes de SBT.

#### 5.3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, site internet

- **Site internet** : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>) qui présente notamment les activités du CNR, le mode de fonctionnement, les modalités d'envois, les fiches à télécharger, et les personnes à contacter. Des fiches de renseignement par exemple sur le typage des souches de légionelles à la recherche de la source de contamination sont renseignées. Des fiches de demande d'analyses dédiées aux laboratoires ou aux ARS peuvent être renseignées directement sur le site et envoyées par messagerie électronique.  
Un site spécifique dédié à l'étalon ADN a été réalisé en Français et en Anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon. Ce site est accessible par la page d'accueil du site web du CNR.

#### 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 de 1 à 10 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes et cliniciens (conseil diagnostique, thérapeutique, typage), ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage, conseil), médecins du travail sur les informations à donner aux personnels en cas de légionellose ou de dépassement de seuils environnementaux, et EHOP sur les méthodes de décontamination des sites. Des avis réguliers sont donnés sur les tests évalués par le CNR (kits urinaires, sérologie ou PCR) ainsi que des conseils techniques (méthodologie, choix milieux de culture, concentration des urines, sensibilité aux antibiotiques ...). Les appels téléphoniques sont redistribués en fonction des demandes par les secrétaires. Les spécificités des correspondants (aspect diagnostic clinique, lien de clonalité, environnement...) et leurs coordonnées sont indiquées sur les lettres de rendu de résultat ou au niveau du site internet.
- Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation. Près de 500 courriers postaux ont été envoyés en 2016. 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...)**

- **ECDC** – Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010).
- **HCSP** – Membre du groupe de travail sur un projet de décret et un projet d'arrêté relatifs à l'encadrement de l'utilisation des systèmes collectifs de brumisation d'eau (saisine des deux commissions CSMT et CSRE) (2016) (S. Jarraud).
- **ANSES** – groupe de travail « q-PCR légionelles » dont l'objectif est l'analyse d'un rapport mandaté par le ministère de l'écologie relatif à la pertinence des méthodes analytiques par culture et par q-PCR pour le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes (4 réunions à l'ANSES en 2016, Maud Baume).
- 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).

## **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**

Des travaux poursuivis depuis 2012 à partir de mutants résistants sélectionnés *in vitro* puis séquencés ont permis :

- de caractériser les mutations ribosomiques associées à la résistance aux macrolides chez *Legionella pneumophila* ;
- de caractériser le rôle des protéines Lpp2879 / Lpp2880 (LpeAB) dans l'efflux des macrolides chez *L. pneumophila* souche Paris et l'impact de mutations observées en amont de l'opéron sur l'expression de cette pompe à efflux putative ;
- de décrire la distribution de ces protéines d'efflux parmi les différents *Sequence Type* de *L. pneumophila* ;
- de définir la distribution des CMI et les ECOFF (*epidemiological cut-off values*) d'une population de *L. pneumophila* sauvage sensible aux macrolides.

Trois articles (dont 2 acceptés en 2017) résumant ces travaux ont été soumis en 2016. Les résumés de ces articles sont les suivants :

- **Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila***

G. Descours, C. Ginevra, N. Jacotin, F. Forey, J. Chastang, E. Kay, J. Etienne, G. Lina, P. Doublet, S. Jarraud.  
Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb 23;61(3).

**Objectives.** Monitoring the emergence of antibiotic resistance is a recent issue in the treatment of Legionnaires' disease. Macrolides are recommended as first-line therapy, but resistance mechanisms have not been studied in *Legionella* species. Our aim was to determine the molecular basis of macrolide resistance in *L. pneumophila*.

**Methods.** Twelve independent lineages from a common susceptible *L. pneumophila* ancestral strain were propagated under conditions of erythromycin or azithromycin pressure to produce high-level macrolide resistance. Whole-genome sequencing was performed on 12 selected clones, and we investigated mutations common to all lineages. We reconstructed the dynamics of mutation for each lineage and demonstrated their involvement in decreased susceptibility to macrolides.

**Results.** The resistant mutants were produced in a limited number of passages to obtain a 4,096-fold increase in erythromycin MICs. Mutations affected highly conserved 5-amino-acid regions of L4 and L22 ribosomal proteins and of domain V of 23S rRNA (G2057, A2058, A2059, and C2611 nucleotides). The early mechanisms mainly affected L4 and L22 proteins and induced a 32-fold increase in the MICs of the selector drug. Additional mutations related to 23S rRNA mostly occurred later and were responsible for a major increase of macrolide MICs, depending on the mutated nucleotide, the substitution, and the number of mutated genes among the three *rri* copies.

**Conclusion.** The major mechanisms of the decreased susceptibility to macrolides in *L. pneumophila* and their dynamics were determined. The results showed that macrolide resistance could be easily selected in *L. pneumophila* and warrant further investigations in both clinical and environmental settings.

- **Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump**

C. Massip, G. Descours, C. Ginevra, P. Doublet, S. Jarraud, C. Gilbert.  
J Antimicrob Chemother. 2017 Jan 30.

**OBJECTIVES:** A previous study on 12 *in vitro*-selected azithromycin-resistant *Legionella pneumophila* lineages showed that ribosomal mutations were major macrolide resistance determinants. In addition to these mechanisms that have been well described in many species, mutations upstream of *lpeAB* operon, homologous to *acrAB* in *Escherichia coli*, were identified in two lineages. In this study, we investigated the role of LpeAB and of these mutations in macrolide resistance of *L. pneumophila*

**METHODS:** The role of LpeAB was studied by testing the antibiotic susceptibility of WT, deleted and complemented *L. pneumophila* Paris strains. Translational fusion experiments using GFP as a reporter were conducted to investigate the consequences of the mutations observed in the upstream sequence of *lpeAB* operon.

**RESULTS:** We demonstrated the involvement of LpeAB in an efflux pump responsible for a macrolide-specific reduced susceptibility of *L. pneumophila* Paris strain. Mutations in the upstream sequence of *lpeAB* operon were associated with an increased protein expression. Increased expression was also observed under sub-inhibitory macrolide concentrations in strains with both mutated and WT promoting regions.

**CONCLUSIONS:** LpeAB are components of an efflux pump, which is a macrolide resistance determinant in *L. pneumophila* Paris strain. Mutations observed in the upstream sequence of *lpeAB* operon in resistant lineages led to an overexpression of this efflux pump. Sub-inhibitory concentrations of macrolides themselves participated in upregulating this efflux and could constitute a first step in the acquisition of a high macrolide resistance level.

- **MIC distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identify a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to genes coding for an efflux pump**

M. Vandewalle-Capo, C. Massip, G. Descours, J. Charavit, J. Chastang, P.A. Billy, S. Boisset, G. Lina, C. Gilbert, M. Maurin, S. Jarraud, C. Ginevra.  
En révision dans International Journal of Antimicrobial Agents (IJAA).

Legionnaires' disease is a severe pneumonia mainly caused by *Legionella pneumophila*. Its treatment requires the use of antibiotics. The purpose of this study was to describe the susceptibility of clinical strains of *Legionella pneumophila* to seven antibiotics used for legionellosis treatment. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of 109 well-characterized clinical strains of *L. pneumophila* serogroup 1 were determined using a broth microdilution method without charcoal and compared to antibiotic-resistant strains selected *in vitro*. All strains were inhibited by low concentrations of fluoroquinolones, macrolides, and rifampicin. The epidemiological cut-off values (ECOFFs) were 0.064 mg/L for ciprofloxacin, 0.064 mg/L for moxifloxacin, 0.032 mg/L for levofloxacin, 1 mg/L for erythromycin, 2 mg/L for azithromycin, 0.064 mg/L for clarithromycin, 2 mg/L for doxycycline, and 0.001 mg/L for rifampicin. However, MIC distributions revealed a subpopulation of strains displaying a reduced susceptibility to some macrolides (especially to azithromycin) which correlated with the presence of the *lpeAB* genes encoding a macrolide efflux pump found specifically in the sequence types (ST) ST1, ST701, and closely related STs. Thus all isolates could be considered susceptible to the tested antibiotics, although the macrolides were less active against some strains harbouring a specific efflux system.

Les travaux sur la pompe LpeAB ont été poursuivis en 2016 (stage de P. Jouve) et seront poursuivis afin de :

- confirmer la nature de la pompe impliquant LpeAB (expérimentations d'inhibition) ;
- caractériser les mécanismes de surexpression de LpeAB en lien avec les mutations observées en amont de l'opéron ;
- caractériser le rôle de cette pompe à efflux dans l'acquisition de mécanismes de résistance ribosomiques ;
- identifier d'autres composés potentiellement efflués, en particulier les biocides.

### **6.1.2 *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 :**

L'ensemble des tests réalisés montre que LL-37 et HBD-3 induisent une perte de cultivabilité des légionelles avec une efficacité variable selon l'état physiologique des bactéries. Les résultats suggèrent que LL-37 et HBD-3 agissent par perméabilisation des membranes de *L. pneumophila* par des modes d'action différents. Nos résultats ont également montré que les deux peptides exercent une activité inhibitrice sur la réplication intracellulaire des légionelles, au moins en partie grâce à une collaboration avec la cellule hôte. Au cours de notre étude, nous avons également montré que l'association de LL-37 et HBD-3 a un effet antagoniste sur la cultivabilité de *L. pneumophila* dans nos conditions expérimentales.

Une partie de cette étude a été consacrée à l'étude de la résistance aux PAMs humains de *L. pneumophila*. Les résultats ont montré que le gène *rcp* est impliqué dans la résistance à LL-37 de certaines souches.

### **6.1.3 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.  
Genome Res. 2016 Nov;26(11):1555-1564.

**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.

### **6.1.4 Seeding and Establishment of *Legionella pneumophila* in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease**

S. David, B. Afshar, M. Mentasti, C. Ginevra, I. Podglajen, S.R. Harris, V.J. Chalker, S. Jarraud, T.G. Harrison, and J. Parkhill

Clin Infect Dis. 2017 Feb 17

**Background.** Legionnaires' disease is an important cause of hospital-acquired pneumonia and is caused by infection with the bacterium *Legionella*. Because current typing methods often fail to resolve the infection source in possible nosocomial cases, we aimed to determine whether whole-genome sequencing (WGS) could be used to support or refute suspected links between cases and hospitals. We focused on cases involving a major nosocomial-associated strain, *L. pneumophila* sequence type (ST) 1.

**Methods.** WGS data from 229 *L. pneumophila* ST1 isolates were analyzed, including 99 isolates from the water systems of 17 hospitals and 42 clinical isolates from patients with confirmed or suspected hospital-acquired infections, as well as isolates obtained from or associated with community-acquired sources of Legionnaires' disease.

**Results.** Phylogenetic analysis demonstrated that all hospitals from which multiple isolates were obtained have been colonized by 1 or more distinct ST1 populations. However, deep sampling of 1 hospital also revealed the existence of substantial diversity and ward-specific microevolution within the population. Across all hospitals, suspected links with cases were

supported with WGS, although the degree of support was dependent on the depth of environmental sampling and available contextual information. Finally, phylogeographic analysis revealed that hospitals have been seeded with *L. pneumophila* via both local and international spread of ST1.

**Conclusions.** WGS can be used to support or refute suspected links between hospitals and Legionnaires' disease cases. However, deep hospital sampling is frequently required due to the potential coexistence of multiple populations, existence of substantial diversity, and similarity of hospital isolates to local populations.

#### **6.1.5 First survey and identification of *Legionella pneumophila* in tropical countries: environmental isolates from Cameroon, Cambodia and Senegal**

C. Ginevra, B. Garin, A.E. Perez Cobas, D. Dervins-Ravault, M. Wouafo, K.S. Lay, S. Jarraud, C. Buchrieser

**Objectives.** From May 2009 to June 2010, 635 water samples (Hot Water System and Cooling Tower) from hotels and hospitals in Cameroon (212), Cambodia (216) and Senegal (207) were taken in the framework of a multicentre project to gain knowledge on the presence, distribution and molecular characteristics of *Legionella* strains in tropical areas. Among these, 43% of the samples from hotels and 23% from hospitals were positive for *Legionella* by culture. In total 234 strains were isolated. Here we describe the molecular characteristics of these environmental *L. pneumophila* strains from tropical countries that are developing their LD surveillance network.

**Methods.** Among the 234 *Legionella* strains isolated, 173 were *L. pneumophila* (Senegal, n=17, Cameroon; n=49 and Cambodia, n=107). Their genomes were sequenced by the Nextera XT Paired-end 150bp read length technology, using a NextSeq 500 sequencer (Illumina®). Sequences were assembled using the SPAdes assembler and then the sequences of the 7 genes used to define the sequence type (ST) were extracted from the assemblies excepted for *mompS* as different copies may exist. Thus the *mompS* genes were PCR amplified and re-sequenced using the Sanger technology. To analyse phylogenetic relationships the whole genome assemblies were compared using the parsnp software.

**Results.** The 173 strains (88 serogroup (sg) 1 and 85 sg2-14) belonged to 33 different STs including 20 STs newly described in this study. ST1 and closely related STs isolated represent between 38 and 59% of all tested *L. pneumophila* strains. ST1 was the only ST identified in all 3 countries. ST1 related STs belonged to *L. pneumophila* sg1, sg4 and sg7 and those isolated from hospital water networks accounted for 11, 33 and 52% in Cambodia, Senegal and Cameroon, respectively. Furthermore, ST59 strains were isolated in Cambodia, ST68 and ST80 in Cameroon. The ST1 and related isolates from the three countries differed from the Paris reference genome by 21 to 8098 SNPs. The less divergent strains were those isolated in Cameroon, the more divergent ones in Cambodia. Whole genome analyses identified 6 subgroups within ST1, almost all geographically linked to their country.

**Conclusion.** *L. pneumophila* is present in hospital and hotel water systems in tropical countries, although it was thought that this bacterium is mainly present in moderate climates. Similar to the Northern hemisphere an important proportion of *L. pneumophila* in tropical countries belongs to ST1 and related STs.

### **6.1.6 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. Les génomes obtenus ont été analysés à 2 niveaux : les SNP du « core genome » et la présence/absence de gènes de l'« accessory genome ». Plusieurs méthodes d'analyses ont été utilisées pour comparer les données obtenues en fonction du groupe de sévérité telle que la DAPC (differential analysis of principal components) par exemple. Pour l'instant, un gène candidat a été sélectionné pour validation. Les analyses transcriptomiques sont en cours de réalisation.

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

### **6.2.1 Publications nationales**

1. Leruste A, Rambaud J, Picard C, Jarraud S, Ferroni A, Lawrence C, Renolleau S. Successful pediatric ECMO in a rare case of septic shock due to a community-acquired *Legionella* infection. **Med Mal Infect.** 2016 Oct 31.

### **6.2.2 Publications internationales**

1. David S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR, Lechat P, Lees J, Ginevra C, Glaser P, Ma L, Bouchier C, Underwood A, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J and Buchrieser C. Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. **Genome Research**, 2016, Nov;26(11):1555-1564.

2. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A, Allegra S, Jarraud S, Verhoeven P, Marcuccilli A, Lucht F, Pozzetto B, Berthelot P. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. *Journal of Infection* 2016 Aug;73(2):123-8
3. Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S. ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI). Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Nov. 30
4. Compain F, Rossi B, Richaud C, Guerot E, Rostane H, Jarraud S, Podglajen I. Photo Quiz: A 44-year-old kidney transplant patient with pneumonia" *J Clin Microbiol.* 2016 Dec 28 :55(1) :1-2.
5. Answer to January 2017 Photo Quiz : Compain F, Rossi B, Richaud C, Guerot E, Rostane H, Jarraud S, Podglajen I. *J Clin Microbiol.* 2016 Dec 28;55(1):349-350.
6. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, Jarraud S. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution.* 2016 Sep;43:108-22.

### **Travaux soumis en 2016 et acceptés en 2017**

7. Descours G, Ginevra C, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017 Feb 23;61(3).
8. David S, Afshar B, Mentasti M, Ginevra C, Podglajen I, Harris SR, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J. Genomic diversity and evolution of *Legionella pneumophila* "ST1" within hospitals and implications for future nosocomial investigations. **Clinical Infectious Disease.** 2017.
9. Massip M, Descours G, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Gilbert C. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. **J Antimicrob Chemother.** 2017 Jan 30.

### **6.2.3 Communications nationales**

#### **Communications nationales orales**

1. S. Jarraud, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, J. Sweetman, M. Mentasti, R. Towolde, C. Campese, J. Etienne, A. Underwood, N. Fry, T. G. Harrison, V.Chalker. Investigation de l'épidémie de légionellose de Lens : apport du WGS. RICAI 2016, 13 Décembre 2016.

#### **Communications nationales affichées**

1. A. Campan-Fournier, C. Ginevra, C. Oger, F. Jauffrit, A.G. Ranc, G. Perriere et S. Jarraud. Emergence d'un clone de *Legionella pneumophila* subsp. non-*pneumophila* ST701 . Journées Ouvertes en Biologie, Informatique et Mathématiques (JOBIM), Lyon, 28-30 juin 2016.
2. A. Souche, A-G. Ranc, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud, L. Beraud. Evaluation de *Legionella* K-set®, test immunochromatographique pour le diagnostic de légionellose par détection d'antigénurie. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.

3. L. Beraud, A.G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, B. Podac, N. Aissa, E. Twizeyimana, I. Verdier, I. Vray, D. Fournier, C. Verdet, P. Lanotte, F. Mermet-Jeanvoine, P. Guiet, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours\*, S. Jarraud. Impact de la concentration des urines sur les performances du test BinaxNOW® Legionella. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
4. M. Mentasti, P. Cassier, S. David, C. Ginevra, L. Gomez-Valero, A. Underwood, B. Afshar, J. Etienne, J. Parkhill, V. Chalker, C. Buchrieser, T. Harrison, S. Jarraud. Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* ST47. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
5. H. Hanneltel, J-V. Reynaud, C. Kolenda, A-G. Ranc, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Apport de l'*Amoebae Plate Test* dans l'isolement de souches cliniques de *Legionella*. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
6. A-G. Ranc, S. Bidah, P. Courault, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud, O. Dauwalder. Typage des *Legionella pneumophila* séro groupe 1 par spectrométrie de masse. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.
7. Impact de la concentration des urines sur les performances du test BinaxNow® *Legionella*. L. Beraud, A-G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, B. Podac, N. Aissa, E. Twizeyimana, I. Verdier, I. Vray, D. Fournier, C. Verdet, P. Lanotte, F. Mermet-Jeanvoine, P. Guiet, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours, S. Jarraud. RICAI 2016, 12 et 13 Décembre 2016, Paris.

#### 6.2.4 Communications internationales

##### Communications internationales orales

1. C. Pourcel\*, G. Vergnaud, S. Jarraud, JF. Guegan, G. Robaldo, P. Le Cann. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in drinking water networks. International Symposium on *Legionella*. Ecology, Virulence and Risk assessment, Braunschweig, Germany, 6-7 September 2016.
2. S. Jarraud\*, G. Kapatai, S. David, C. Ginevra, M. Mentasti, J. Sweetman, R. Tewole, C. Campese, A. Underwood, N. Fry, V. Chalker, T.G. Harrison. Whole Genome Sequencing supports the role of waste-basin aeration as a direct source of Legionnaires' disease transmission during Lens outbreak. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
3. M. Mentasti, P. Cassier, S. David, C. Ginevra, L. Gomez-Valero, A. Underwood, B. Afshar, C. Buchrieser, J. Etienne, V. Chalker, T.G. Harrison, S. Jarraud. Molecular detection of a clinically important clone of *Legionella pneumophila* serogroup 1 – the "ST47 clone". ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
4. L. Beraud\*, A.G. Ranc, H. Lemaire, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, L. Barets, S. Jarraud. Case report: *Legionella bozemanii* arthritis caused by wound contamination. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
5. A.G. Ranc\*, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arzac, C. Vidal, P. Courault, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, O. Dauwalder, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
6. S. David\*, B. Afshar, M. Mentasti, C. Ginevra, I. Podglajen, S.R. Harris, S. Jarraud, T.G. Harrison, J. Parkhill. Genomic diversity and evolution of *Legionella pneumophila* "ST1" within hospitals and implications for future nosocomial investigations. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.

7. H. Hannetel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc\*, L. Beraud, C. Campese, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Contribution of the Amoebae Plate Test (APT) to the isolation of *Legionella* spp. from clinical samples: prospective analysis over a period of 9 months. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.

### **Communications internationales affichées**

1. O. Dauwalder\*, A.G Ranc, P. Courault, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arzac, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. ECCMID, Amsterdam, Hollande, 9-12 April 2016.
2. A. Campan-Fournier, C. Ginevra, C. Oger, F. Jauffrit, V. Navratil, A.G. Ranc, G. Perriere, S. Jarraud. Emergence of a *Legionella pneumophila* subsp. *non-pneumophila* ST701 clone. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
3. C. Ginevra, B. Garin, A.E. Perez Cobas, D. Dervins-Ravault, M. Wouafo, K.S. Lay, S. Jarraud, C. Buchrieser. First survey and identification of *Legionella pneumophila* in tropical countries: environmental isolates from Cameroon, Cambodia and Senegal. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
4. L. Beraud\*, A.G. Ranc, R. Ruimy, C. Segonds, C. Ginevra, G. Lina, G. Descours, S. Jarraud. Impact of urine samples concentration on Legionnaires' disease diagnosis with BinaxNOW® *Legionella* urinary test: a prospective study. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
5. A. Souche, A.G. Ranc, G. Descours, C. Ginevra, G. Lina, S. Jarraud, L. Beraud\*. Evaluation of legionella K-set®, a lateral flow test for the detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigens in urine samples. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
6. C. Ginevra\*, J. Chastang, C. Massip, G. Descours, C. Gilbert, S. Jarraud. Clonal distribution of *Legionella pneumophila* macrolides specific efflux pump. ESGLI congress, Amsterdam, Hollande, 22-23 September 2016.
7. M. Petzold, S. Jarraud, R. Ehricht, N. Jacotin, T. Meyer, P. Slickers, A. Ziegler, S. Monecke, C. Lück. LegioType AS-1: Rapid microarray-based genotyping of *Legionella pneumophila* Sg1 isolates, 4<sup>th</sup> ESGLI Conference, Amsterdam 22-23 September 2016.

### **6.2.5 Conférences sur invitation**

#### **Internationales**

1. Jarraud S\*, State of the art regarding Whole Genome Sequencing (WGS) 7th meeting of the European Legionnaires' disease surveillance network (ELDSNet), 20-21 september **2016**, Amsterdam, The Netherlands (45 min).
2. Jarraud S\*, Investigations of a large *Legionella* outbreak in Lens, France, by Whole Genome Sequencing. *Legionella* symposium : *Legionella* (1976 to 2016) – from whole guinea pigs to whole genome sequencing, 31 mars **2016**, Public Health England, London, England (30 min).
3. Jarraud S\*, Investigations of a large *Legionella* outbreak in Lens, France, by Whole Genome Sequencing. 7 April **2016**, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, England (30 min).

## 6.2.6 Chapitre d'ouvrage en français

1. G Descours, AG Ranc, L Beraud, G Lina, S Jarraud. Chapitre 89, *Legionella* et légionellose. 3<sup>ème</sup> édition Précis de bactériologie clinique, Editions ESKA, 2016.
2. AG Ranc, L Beraud, G Descours, G Lina, S Jarraud. Chapitre *Legionella*, 3<sup>ème</sup> édition Bactériologie médicale : techniques usuelles, Editions Masson Elsevier, 2016.

## 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.

\* Les collaborations dans le domaine de l'environnement se font dans le cadre de l'envoi de souches environnementales pour aide à l'identification précise ou dans le cadre de l'investigation de cas. Ces échanges sont réguliers par téléphone ou messagerie électronique.

\* Le CNR est accrédité pour la détection des légionelles dans l'eau. Des échanges sur ce point sont également réguliers.

\* Le CNR a une expertise dans la détection de légionelles dans des environnements non soumis à l'accréditation, en particulier dans les environnements complexes. Nous pouvons avoir des échanges avec les laboratoires environnementaux sur les techniques employées.

\* Interface avec les instances sanitaires :

Comme indiqué précédemment, le CNR est régulièrement impliqué dans des groupes de travail :

- **ANSES** – groupe de travail un groupe de travail « q-PCR légionelles ».mission principale de ce groupe de travail sera l'analyse d'un rapport mandaté par le ministère de l'écologie relatif à la pertinence des méthodes analytiques par culture et par q-PCR pour le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes
- **AFNOR** - Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471
- **AFNOR** - 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

\* Distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à de nombreux laboratoires environnementaux français et étrangers ; 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

## 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 :

- **Utilisation du NGS dans un objectif d'investigation des cas de légionellose et d'épidémiologie globale**

**En 2016**, nous avons mis l'accent sur le développement des analyses de séquences dans le cadre de l'épidémiologie locale (investigation des cas de légionellose).

**En 2017**, nous poursuivons ces développements pour une **utilisation en routine** à la place du PFGE et du SBT **dans les deux prochaines années**. Nous mettrons de plus l'accent sur le développement des analyses de séquences dans un objectif d'épidémiologie globale. Nous nous intéresserons également aux technologies de séquençage de 3<sup>ème</sup> génération (Oxford Nanopore) dans le contexte de l'analyse du microbiote et plus généralement dans la caractérisation de sous-populations :

1. Etude de l'évolution génétique de *Legionella* et évolution du microbiote au cours des récurrences de légionellose ou d'échecs thérapeutiques

Nous avons comme objectif de mieux caractériser les facteurs susceptibles d'être responsables des récurrences et/ou échecs thérapeutiques de certains cas de légionellose. Nous avons commencé par séquencer le génome d'isolats cliniques issus de ce type de patients. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (C. Buchrieser, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris), nous avons entrepris une étude pilote dans le but d'analyser la variation du microbiote pulmonaire au cours de l'infection chez ces patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques. Le microbiote respiratoire est en cours de caractérisation pour 29 prélèvements issus de 5 de ces patients.

2. Etude de la diversité génétique de *Legionella* chez un même patient

L'accroissement du pouvoir discriminant des méthodes de typage par NGS pose la question du seuil permettant de différencier deux isolats. Par exemple, à partir de combien de SNPs considère-t-on que deux isolats sont différents ? Ceci nous conduit indirectement à la question de la représentativité d'un seul isolat par rapport à la diversité génétique de la population bactérienne globale dans un échantillon respiratoire et donc chez le patient. Pour répondre à cette question, nous avons également comme projet collaboratif avec l'équipe Bactéries Intracellulaires (CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris) de caractériser la diversité génétique de *L. pneumophila* au sein d'un même prélèvement respiratoire en séquençant le génome de plusieurs souches isolées du même prélèvement clinique. Dans ce but, le CNR a collecté depuis 2011, 5 à 10 colonies par prélèvement positif, ce qui constitue aujourd'hui une collection de plus de 2200 souches isolées de plus de 235 patients que nous continuons d'incrémenter. Cette étude permettra entre autres de déterminer le nombre d'isolats à analyser par patient au cours des enquêtes épidémiologiques pour être certain de couvrir la diversité génétique bactérienne intra-patient.

- **Une des grandes implications du CNR sera l'étude des facteurs pouvant être impliqués dans la sévérité des légionelloses.**

Un projet coordonné par le CNR dans le cadre du Programme de Recherche Translationnelle en Santé est actuellement co-financé par l'ANR et la DGOS : « Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères ».

La pathogénèse associée à la gravité de la maladie reste mal comprise. Alors que leur implication n'a pas été formellement démontrée, certaines études suggèrent le rôle de certains facteurs comme (i) une charge bactérienne infectieuse élevée, (ii) une sélection *in vivo* de mutants résistants aux antibiotiques, (iii) une plus grande virulence de certaines souches de *Legionella*, (iv) une réponse de l'hôte insuffisante ou inadaptée, (v) une susceptibilité génétique de l'hôte, (vi) des co-infections ou (vii) un microbiote pulmonaire particulier, dans la sévérité de la maladie.

Il n'existe pas de critères objectifs pour prédire le pronostic de l'infection et potentiellement réduire le taux de mortalité.

Dans une étude interventionnelle prospective, sur une cohorte nationale de 300 patients, nos objectifs sont d'identifier des biomarqueurs d'hôte et bactériens associés à l'évolution péjorative de la légionellose. La sévérité initiale de la légionellose sera évaluée à l'admission et l'évolution péjorative de la légionellose à différents temps par des critères composites (score SOFA, passage en réanimation, décès à J28).

Parmi ces marqueurs de sévérité, nous étudierons :

- (1) si l'évolution de la charge pulmonaire en *L. pneumophila* par PCR est associée à l'évolution clinique de l'infection ;
- (2) l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante aux antibiotiques, population notamment détectable par séquençage à haut débit ;
- (3) si un profil cytokinique spécifique au niveau local (pulmonaire) ou au niveau systémique (sérum) est associé à la sévérité ;
- (4) si des gènes bactériens ou des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) sont associés à la sévérité, identifiés par des analyses génomiques comparatives ;
- (5) la diversité du microbiote pulmonaire en utilisant des approches de métagénomique et de NGS afin d'associer un microbiote spécifique ou son évolution à la sévérité de l'infection ;
- (6) les facteurs génétiques humains qui prédisposent à des infections sévères à Lp1 à l'aide d'une approche de séquençage global de l'exome.

Le CNR sera impliqué en première ligne notamment pour favoriser l'inclusion des patients et pour les points 1 à 4. Ce projet est financé par la DGOS pour la partie en lien direct avec le CNR et l'ANR pour les questions plus fondamentales.

Ce projet est une collaboration entre :

- les médecins de près de 20 centres ;
- L'équipe *Legionella* pathogenesis, CIRI, Lyon ;
- Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases (HGID) (Paris Descartes University /INSERM UMR 1163, IMAGINE Institute, Necker Medical School, Paris) (Capucine PICARD) ;
- Unit Biology of Intracellular Bacteria, Institut Pasteur Paris (Carmen BUCHRIESER) ;
- Epidemiology and Infection Control Unit, Hospices Civils de Lyon (Philippe VANHEMS) ;
- Biotechnology Center of Hospices Civils de Lyon (Laurent SCHAEFFER).

- **Etude de l'impact de l'utilisation des biocides sur le risque « légionellose »**

Une des questions qui nous apparaît primordiale actuellement est de savoir si l'utilisation de biocides pourrait avoir un impact sur l'émergence de clones associés à l'infection humaine et/ou à une résistance accrue aux antibiotiques.

Nous savons que seuls cinq clones de Lp1 (ST1, ST23, ST37, ST47, ST62) sont responsables de 40% des cas en Europe. Leur émergence récente et indépendante au niveau international semble indiquer que l'Homme pourrait avoir lui même « créer » les niches environnementales ayant permis ou facilité cette émergence, en particulier le clone appelé ST1 qui est particulièrement associé aux cas nosocomiaux de légionellose.

Aucune donnée n'est disponible sur l'impact des biocides (composés chlorés, métaux lourds, détergents, antiseptiques) sur la diversité des espèces et souches de *Legionella* dans les réseaux d'eaux traités, et plus particulièrement sur la persistance de certains clones associés à l'infection. Un projet sur cette thématique a été déposé à l'ANSES en 2017.

- **Etude du rôle de la pompe LpeAB dans la résistance aux macrolides et/ou à des composés de l'environnement hydrique**

Nos travaux auront comme objectif une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des protéines d'efflux LpeAB, à la fois chez les souches sauvages de *L. pneumophila* et chez les souches résistantes aux macrolides. Ils devraient nous permettre de caractériser de nouveaux substrats impliqués dans d'autres fonctions que la résistance aux macrolides et cibles potentielles dans la lutte contre *Legionella*.