

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2013

**Centre National de
Référence
des légionelles**

**Année d'exercice
2012**

Résumé analytique

Enjeux de santé publique

Un total de 1298 cas de légionellose a été diagnostiqué et notifié en 2012 ce qui correspond à une augmentation de 10 % par rapport à 2011. Cette augmentation du nombre de cas n'est probablement pas liée uniquement à une amélioration du diagnostic des cas de légionelloses. Les efforts concentrés initialement sur les Tars pour rechercher et quantifier les légionelles dans les prélèvements environnementaux ont été déployés sur les réseaux d'eau chaude sanitaire depuis 2010. L'amélioration de la surveillance et de la prévention environnementale reste une priorité. Les objectifs sont de maîtriser les sources de contamination potentielles et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'alors.

La légionellose reste une infection sévère. En France, 98% des cas confirmés de légionellose sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en réanimation. La létalité est estimée à 11% mais peu atteindre plus de 30% chez les patients hospitalisés en réanimation. L'amélioration du diagnostic des cas de légionellose reste toujours d'actualité notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires. Un accent particulier est donné sur la veille de la sensibilité des légionelles aux antibiotiques. La survenue de la maladie est multifactorielle, combinant des facteurs environnementaux, des facteurs liés à l'hôte et des facteurs liés à la bactérie *Legionella*. L'un des objectifs majeur reste l'identification de facteurs et/ou de marqueurs associés à la sévérité des légionelloses.

Faits marquants en 2012

- **Une culture** de prélèvements pulmonaires a été positive pour **22,5% des cas** diagnostiqués. Ce pourcentage qui reste insuffisant est en augmentation régulière. Cette amélioration est une priorité pour le CNR, car elle favorisera la réalisation des investigations épidémiologiques, permettra une meilleure connaissance des clones majoritaires responsables d'infection chez l'homme, permettra une meilleure compréhension de la maladie.
- Alors que plus de 1400 Sequence Type (ST) sont répertoriés dans la base de données européenne, 50% des souches responsables d'infection humaine en France appartiennent à 8 ST. Parmi ceux-ci, 3 ST sont prédominants (ST23, ST1 et ST47). L'analyse de souches appartenant à ces 3 ST est en cours par séquençage à haut débit (réalisé par l'IP Pasteur, Carmen Buchrieser).
- En 2012 et comme les deux années précédentes, **aucune épidémie (10 cas et plus)** suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée.
- Au total, **68% des domiciles investigués** semblent être à l'origine de la contamination de cas isolés.
- De façon exceptionnelle ces dernières années, **une Tar industrielle** apparaît être à l'origine de 3 cas groupés de légionellose.

- Réactualisation du guide d'investigation des cas de légionelloses (ancienne version de 2005) dans le cadre d'un Groupe de Travail coordonné par le Haut Conseil de Santé Public (délivrable fin 2013).
- Accréditation du CNR depuis le 1^{er} juillet 2012 pour la réalisation des analyses environnementales des légionelles (par culture et par PCR) selon la norme NF EN ISO 17025.

Points clés

- Le CNR réceptionne un nombre croissant de prélèvements pulmonaires pour des cas confirmés de légionellose. **Nous souhaitons vivement un envoi plus systématique :**
 - En cas de culture positive : le CNR souhaiterait réceptionner les prélèvements pulmonaires associés à la souche lors de l'envoi de celle-ci
 - En cas de culture négative ou non faite : l'envoi systématique permettrait la mise en culture d'un nombre important et diverse de milieu, l'utilisation de la co-culture ambiante et de la méthode de séquençage directement adaptée aux prélèvements broncho-pulmonaires (Nested-SBT).
- Un nombre croissant de test de détection des antigènes urinaires apparaît sur le marché. En présence de difficultés d'interprétations, les urines peuvent être adressées au CNR.

Avant propos

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

1 Mission & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

Cf. annexe 1

1.2 Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :

- Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés
- Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur
- Organigramme

Cf. annexe 2

1.3 Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés) en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements.

Cf. annexe 3

1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,...

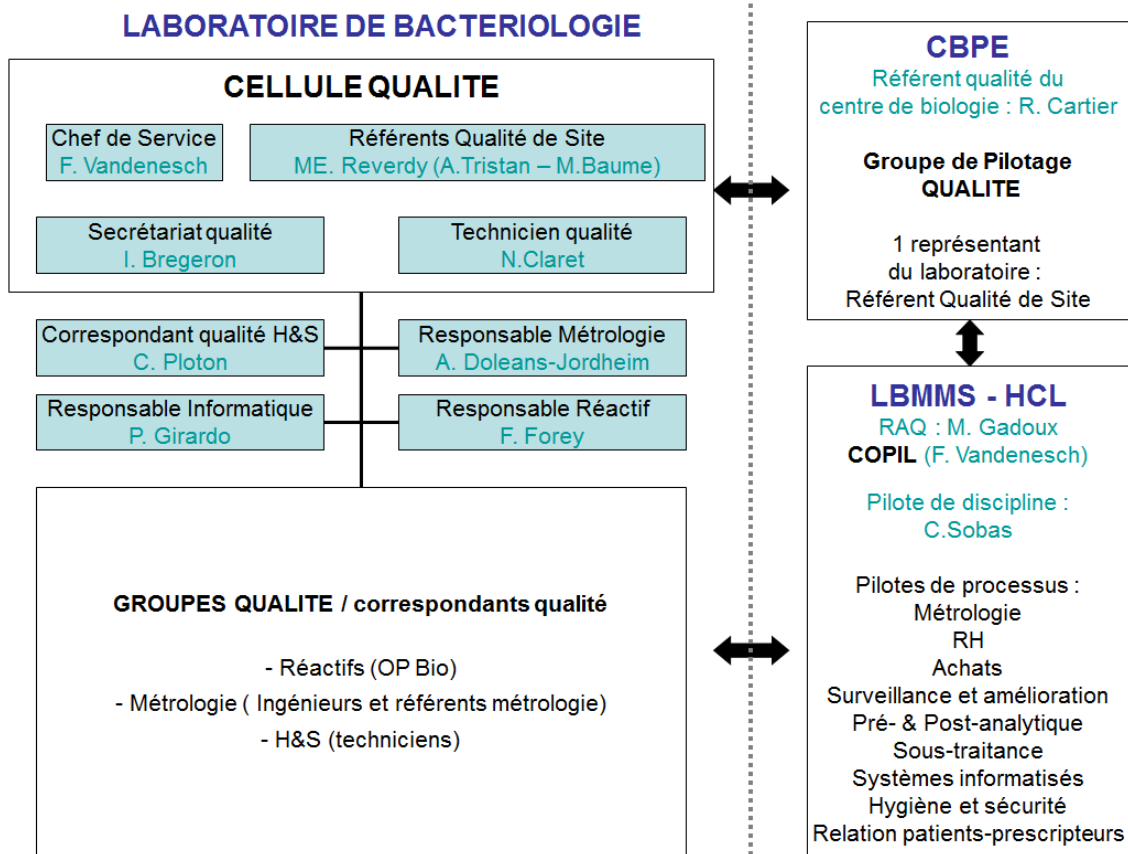
Le CNR des légionelles a mis en place depuis 2009 et maintient un Système de Management de la Qualité adapté à ses activités qui sont d'une part des analyses de biologie médicale (régies par la norme NF EN ISO 15189) et d'autre part des analyses environnementales de qualité de l'eau (régies par la norme NF EN ISO 17025).

En 2011-2012, le Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Sites (LBMMS) des Hospices Civils de Lyon s'est engagé dans une démarche qualité pour répondre à la norme NF EN ISO 15189, ce qui a impliqué une harmonisation du système de management de la qualité afin de mettre en commun des moyens et gérer les processus supports tels que la métrologie ou les achats.

Le CNR des Légionelles est également accrédité depuis le 1^{er} juillet 2012 pour la réalisation des analyses environnementales des Légionelles (par culture et par PCR) selon la norme NF EN ISO 17025 (Accréditation n°1-2324. Portée d'accréditation disponible sur www.cofrac.fr)

1.4.1 Structure qualité du laboratoire

L'ensemble du système qualité est géré grâce au logiciel Kalilab de Netika qui permet la gestion des équipements (fiches de vie, maintenances, métrologie), des documents (internes : procédures, modes opératoires, enregistrements et externes : réglementaires, notices fournisseurs) et des compétences (formations, habilitations du personnel).



1.4.2 Contrôles de Qualité Externes (CQE)

Le CNR participe annuellement à 6 programmes de CQE différents concernant les analyses de détection des antigènes urinaires (contrôle européen organisé par HPA, 10 échantillons 4 fois par an), de PCR *Legionella* dans les prélèvements cliniques (contrôle européen organisé par HPA, 10 échantillons 2 fois par an), de Sequence Base Typing sur les souches de *Legionella* (contrôle européen organisé par HPA, 5 échantillons par an), de mise en culture et dénombrement des *Legionella* dans les eaux (contrôle européen organisé par HPA, 2 échantillons 6 fois par an) et de PCR *Legionella* dans les eaux (contrôle national organisé par AGLAE, 3 échantillons 2 fois par an et contrôle européen organisé par IELAB, 3 échantillons 3 fois par an).

Les résultats de 2012 comparés aux années précédentes sont présentés dans le tableau ci-dessous. Tous ces résultats sont analysés et revus en réunion régulièrement.

Analyse	Ag Urinaires									SBT				Eaux par culture									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2009	2010	2011	2012	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
Objectif en %							100	100	100		100	100	100								100	100	100
Situation en %	96,67	100	97,5	100	97,5	100	97,5	100	95	100	80	80	100	48,2	32,4	69,4	98,6	89,6	98,6	97,2	100	97,22	
Tendance	➔									➔				➔									

Analyse	Eaux PCR AGLAE				Eaux PCR IELAB			PCR Clinique		
	2009	2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012
Objectif en %		85	80	90		80	80		80	100
Situation en %	77	100	90	100	65	71,7	77,8	60	90	100
Tendance	➔				➔			➔		

2 Activités d'expertise

2.1 Décrire les capacités techniques du CNR en fournissant les informations suivantes :

2.1.1 Liste des techniques de référence : diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

- Techniques disponibles : Cf. annexe 4
- Techniques développées l'année 2012 : brève description (principes, validation)
- Techniques en développement : principes et état d'avancement

1. Evolution/optimisation de la technique de sous typage des Lp1 ST1/Paris par spoligotypage par transfert de la révélation en reverse dot blot (Ginevra et al. JCM 2012) à une révélation par la technique luminex. Un premier lot de 56 souches a été testé, les résultats sont concluants. Un second lot de 290 souches est en cours d'évaluation. Ce projet se fait en collaboration avec le Pr. Christophe SOLA, Institut de Génétique et Microbiologie UMR8621, équipe IGEPE, Orsay.
2. Evaluation du polymorphisme du gène *lci* comme marqueur de sous typage de clones. Le nombre croissant de souches endémiques (présentant les mêmes profils PFGE - ST et le même sous-groupe) rend difficile l'interprétation des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination. L'objectif est d'identifier des marqueurs pouvant sous-typier des souches dont les profils sont identiques avec ces marqueurs. Le gène *lci* comprend un VNTR dans sa région codante, qui présente un polymorphisme du nombre de répétitions d'un isolat à un autre. La taille de la région répétée a été déterminée pour 280 isolats, l'analyse du polymorphisme de ce gène au sein de souches d'un même génotype est en cours.
3. Typage des *Legionella pneumophila* par MALDITOF-MS. L'objectif est d'étudier les performances de la MALDITOF-MS pour le typage des *L. pneumophila* sg1. Une collection de 125 souches bien caractérisées (profil PFGE – SBT) a été analysée. Une bonne corrélation entre résultats de ST et profils MALDITOF-MS au sein d'une même expérience a été observée, mais une trop faible reproductibilité inter-expérimentation de la technique MALDITOF-MS a été observée. Une optimisation de l'analyse mathématique pour l'interprétation des profils MALDITOF est en cours pour augmenter la reproductibilité inter expérimentation (standardisation interne).
4. Développement d'une PCR spécifique de la souche Lorraine dans le but d'identifier un ou plusieurs réservoirs environnementaux inconnus et de confirmer la prévalence clinique dans les échantillons pulmonaires positifs en PCR *Legionella* mais négatifs en culture et par Nested-SBT. La spécificité d'amplification de plusieurs couples d'amorces est en cours d'évaluation sur un panel de 380 bactéries (*Legionella pneumophila* et non *pneumophila* et d'autres bactéries susceptibles d'être présentes dans les échantillons ciblés).

5. Evaluation de l'intérêt de réaliser des PCR et/ou nested SBT sur les puits de co-culture amibienne pour améliorer le diagnostic et les études épidémiologiques. Depuis 2008, la co-culture amibienne de prélèvements pulmonaires est réalisée au CNR de façon routinière pour améliorer l'isolement de souches de légionelles. Le bilan réalisé sur la période 2008-2010 a montré que l'association des techniques de culture et co-culture amibienne permet d'obtenir un gain de sensibilité de 5% par rapport à la culture utilisée seule (Descours G et al. J Clin Microbiol. 2012). Nous avons évalué l'intérêt de réaliser des techniques de biologie moléculaire (PCR *Legionella* et Nested-SBT) directement sur les puits de co-culture de prélèvements pulmonaires de patients antigènes urinaires positifs (culture et co-culture négatives). Les premiers résultats préliminaires ne montrent pas d'apport de cette approche pour le diagnostic et l'investigation épidémiologique des cas de légionellose. Cette étude se poursuit.
6. Mise en place d'un test APT (*Amoebal Plate Test*) pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques. Il s'agit d'une évolution/optimisation de la méthode de co-culture amibes/légionelles par le transfert de la co-culture d'un milieu liquide à un milieu gélosé. Les essais préliminaires sur souches et sur prélèvements cliniques artificiellement contaminés par de la légionelle donnent de très bons résultats, l'évaluation sur des prélèvements cliniques positifs pour *Legionella* est en cours.
7. Evaluation de la sensibilité aux macrolides par méthode moléculaire. Notre objectif est de développer une technique permettant la détection de mutations liées à la résistance aux macrolides à partir de souches et de prélèvements cliniques. Les mutations liées à la résistance ont été identifiées, le dessin des amorces et sondes est réalisé, la spécificité des amorces est en cours d'évaluation (voir paragraphe 3.2.2 et 6.1).

2.1.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles :

Cf. annexe 4

2.1.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

Cf. annexe 5

- Description : nombre de souches, caractérisation
- Conditions de stockage
- Conditions de mise à disposition de ces collections

2.1.4 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR :

- Listes existantes :

Diagnostic :

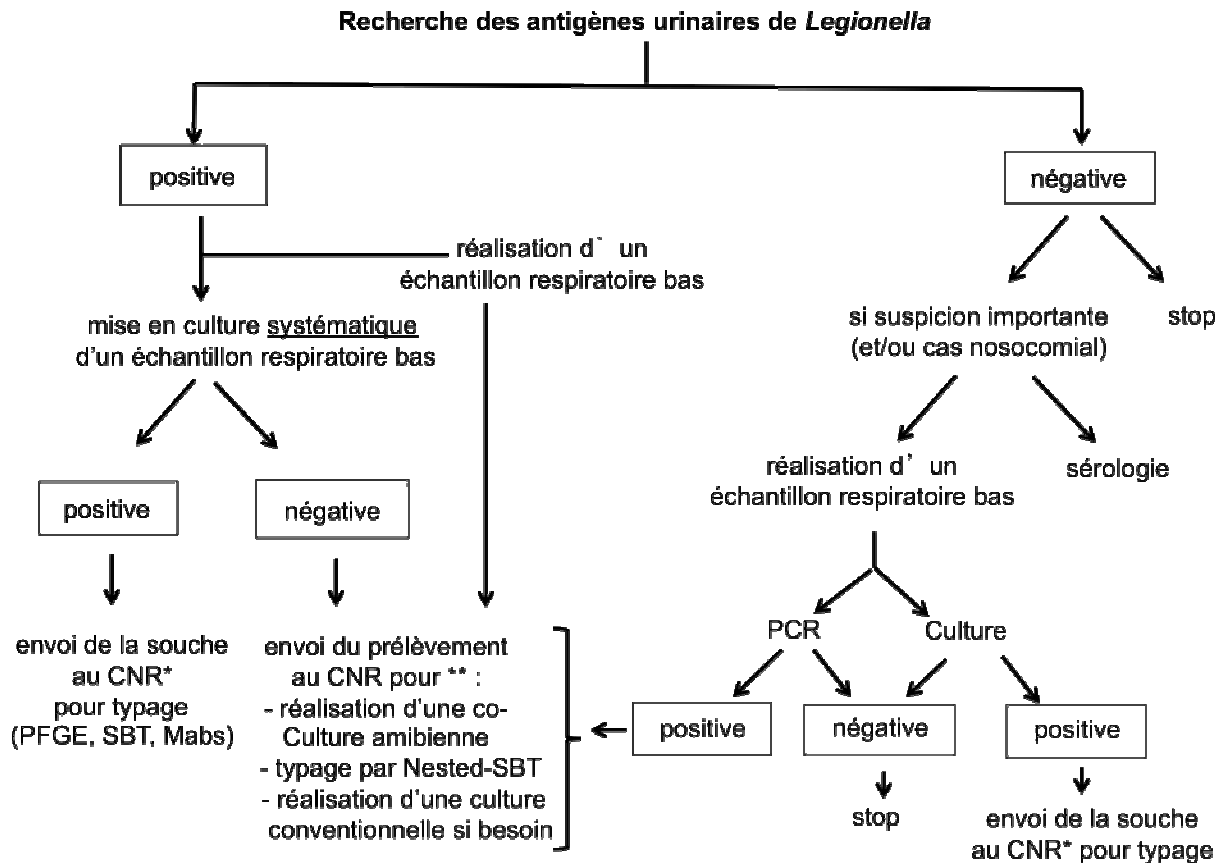
Une proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose est présentée Figure 1.

Détection des antigènes urinaires

- Il est recommandé de **concentrer les urines** avant l'analyse ce qui augmente d'environ 10% le taux de positivité. Cette concentration des urines est réalisée par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore®) (voir technique sur le site du CNR).

- Il est recommandé de **chauffer les urines** à 100°C pendant 5 min suivi d'une centrifugation à 1000 rpm pendant 15 min avant analyse pour éliminer des faux positifs (dénaturation protéique) quelque soit le test utilisé. Toutes les urines analysées positives devront subir ce traitement.

Figure 1. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose



* toutes les souches de légionelles d'origine clinique doivent être envoyées au CNR

** les prélèvements respiratoires bas peuvent être adressés au CNR pour culture, co-culture amibienne et typage par SBT directement sur prélèvement en cas de recherche d'antigène urinaire positif ou en cas de forte suspicion de légionellose. Cet envoi pourra être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique.

Culture de prélèvements pulmonaires :

- Il est recommandé d'utiliser au moins 2 milieux : 1 BCYE (sans antibiotique) + 1 milieu BMPA (ou MWY)
- Le milieu GVPC n'est pas recommandé car de moins bonne sensibilité
- Le CNR souhaite **recevoir les prélèvements pulmonaires** en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR)
 - si la culture est positive (envoi avec la souche)
 - si le laboratoire ne réalise pas la culture ou si celle ci est négative
 - les analyses réalisées par le CNR (voir figure 1) dans un but épidémiologique ne seront pas facturées.

Co-culture de prélèvements pulmonaires sur tapis ambien : c'est une méthode qui permet d'isoler des souches alors que le prélèvement est fortement « contaminé » par une flore microbienne importante (voir chapitre suivant). Cette méthodologie nécessite une pièce de culture cellulaire et est très consommatrice de temps. Elle ne peut pas être utilisée en routine par tout laboratoire de bactériologie. Nous recommandons de nous envoyer les prélèvements pulmonaires pour la réalisation de cette méthode.

PCR : elle fait partie des critères de définition d'un cas de légionellose. Cette méthode sera employée en cas d'antigénurie négative et de suspicion de légionellose.

Sérologie : elle présente un intérêt limité depuis l'apparition des tests urinaires et de la PCR sur prélèvement pulmonaire.

Identification :

- par MALDI TOF-MS : *L. pneumophila* et *Legionella* spp.
- par amplification et séquençage du gène *mip* pour les *Legionella non pneumophila*
- par agglutination de particules de latex pour *L. pneumophila* et les différents sérogroupes notamment le sg1.
- par immunofluorescence.

Typage :

- méthodes standardisées au niveau européen : le SBT et le sous groupage par anticorps monoclonaux. La méthode SBT est décrite sur le lien www.ewgli.com et peut être utilisée par tout laboratoire.
- le PFGE est encore utilisé par plusieurs pays européens et par la France car c'est la méthode qui présente le meilleur pouvoir discriminant.

Afin de détecter les cas groupés et d'identifier les sources de contamination, il est préférable que ces analyses soient centralisées au CNR.

Sensibilité aux antibiotiques :

- Les méthodes : CMI en milieu liquide BYE ou CMIE (concentration extracellulaire minimale inhibant complètement la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila*) réalisée à l'aide de macrophages.
- Cette recherche doit être préconisée en cas d'échecs thérapeutiques, définis par une absence d'amélioration clinique associée ou non à la persistance de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires (par culture ou PCR) malgré une antibiothérapie bien conduite.

Cette recherche étant très rare pour un laboratoire, il est préférable qu'elle soit réalisée par le CNR.

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

Evaluation du kit Lucesco® Pneumonia Legionella Screen, Miacom Diagnostics

L'objectif du kit Lucesco® Pneumonia *Legionella* Screen est de mettre en évidence *Legionella* directement à partir de prélèvements respiratoires. Ce kit utilise la technique FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) couplée à l'utilisation de sondes appelées *molecular beacons*. Lorsque les sondes marquées par une molécule fluorescente s'hybrident à l'ARN

ribosomal bactérien de *Legionella* présent dans le prélèvement respiratoire, une fluorescence est émise. L'utilisation de différentes sondes permet l'identification de *Legionella spp*, *Legionella pneumophila* et *Legionella longbeachae*. Le délai nécessaire à l'obtention d'un résultat est de 30 minutes.

Dans un premier temps, nous avons évalué ce kit sous les deux versions proposées par le fabricant sur 50 souches de *Legionella pneumophila* et *L. non pneumophila* de référence ou non, appartenant à la collection du CNR. Sur ces souches, le kit a montré une spécificité de 99%, avec une bonne distinction entre *Legionella pneumophila*, *L. non pneumophila* et *L. longbeachae*.

Dans un deuxième temps, notre objectif était d'évaluer ce kit sur 150 prélèvements respiratoires (crachats, aspirations bronchiques, LBA) de patients atteints et non atteints de légionellose. Pour l'instant, 19 prélèvements respiratoires positifs en culture pour *Legionella* ont été testés. Les premiers résultats indiquent une sensibilité insuffisante à partir des prélèvements respiratoires. Ce test est en cours de développement.

Evaluation du test TRU *Legionella* de la société MERIDIAN pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* en comparaison avec le test NOW *Legionella* (Alere).
(Evaluation présentée au congrès de la RICAI 2012 sous forme d'un poster.)

Résumé des résultats de TRU *Legionella* par rapport au test NOW *Legionella* sur un total de 221 urines concentrées (évaluation prospective sur 183 urines « tout venant » et rétrospective sur 38 urines positives fraîches ou congelées.

		TRU <i>Legionella</i> (MERIDIAN)		
		Urines-concentrées		Total
		+	-	
Binax NOW Urines concentrées	+	36	2 ^b	38
	-	2 ^a	181	183
Total		38	185	221

^a le nombre de faux positifs est de 2 avant chauffage et de 0 après chauffage. Spécificité de 181/183 = 98,9% sans chauffage et de 183/183 = 100% après chauffage.

^b Sensibilité de 36/38 = 94,7% avec urines concentrées et de 33/38 = 86,8 % avec urines non concentrées.

Par rapport à la méthode du CNR qui utilise des urines concentrées, le test TRU *Legionella* de MERIDIAN présente une sensibilité de 94,7 % avec les urines concentrées et de 86,8 % avec les urines non-concentrées. La spécificité du test TRU *Legionella* est de 98,9% et monte à 100 % si le chauffage de l'urine est effectué. Il apparaît indispensable de confirmer tout test positif par chauffage des urines. Cette étape devrait apparaître comme une recommandation européenne prochainement.

Evaluation du réactif immunochromatographique V-TesT *Legionella* (CORIS) pour la détection de l'antigène *Legionella pneumophila* séro groupe 1 dans l'urine en comparaison avec le test NOW *Legionella* (Alere).

Résumé des résultats de l'évaluation sur un total de 248 urines (évaluation prospective sur 208 urines et rétrospective sur 40 urines positives conservées congelées, pendant 2 ans maximum).

		V-Test <i>Legionella</i> (CORIS)				Total
		Urines-concentrées Lecture à 15 min		Urines non-concentrées Lecture à 15 min		
Binax NOW Urines concentrées		+	-	+	-	
	+	42	0	40	2	42
	-	4 ^a	202	4 ^a	202	206
Total		46	202	44	204	248

^a le nombre de faux positifs est de 4 à condition d'effectuer le chauffage de l'urine. Ce nombre était de 6 avant chauffage.

Le V-test CORIS *Legionella* montre en comparaison avec le test Now *Legionella*, une sensibilité de 95,2 % avec les urines non concentrées et de 100 % avec les urines concentrées et une spécificité de 98 % lorsque le chauffage est effectué. Cette évaluation montre encore l'intérêt du chauffage pour éliminer certains faux positifs. Néanmoins, il apparaît que cette étape ne permet pas d'éliminer tout faux positif, la nature des faux positifs pouvant être dépendant des tests utilisés.

Clinical evaluation of the performance of Bionexia *legionella*, a lateral flow test for the detection of *legionella pneumophila* serogroup 1 antigens in urine samples bioMérieux (BMX) in comparison to the results of the Binax NOW *Legionella* test (ALERE) used in the National Reference Center for *Legionella*. (En cours d'évaluation)

Evaluation de la technique MLVA pour le typage des souches de légionelles

La méthode développée par l'Institut de Génétique et Microbiologie de Paris à Orsay et le Centre Européen d'Expertise et de Recherche sur les Agents Microbiens (CEERAM) à Nantes, est actuellement basée sur le polymorphisme de longueur de 12 VNTR et utilise une PCR multiplex suivie d'une migration électrophorétique en capillaire multi-couleur. Cette méthodologie est en cours d'évaluation sur un ensemble de souches représentatives de la diversité des souches rencontrées en France, isolées de patients non reliés épidémiologiquement et souches de patients reliés épidémiologiquement. En 2012, 200 souches ont été analysées. L'interprétation des données est en cours.

Evaluation d'une puce (développée par la société Dendris) pour l'identification d'espèces de *Legionella* au sein d'un environnement hydrique.

La DendrisChip Legio utilise la technologie des puces à ADN grâce à l'utilisation d'une chimie particulière brevetée, les dendrimères. Cette puce a été développée pour détecter 21 espèces de *Legionella* pathogènes chez l'homme grâce à des sondes oligonucléotides spécifiques greffées sur une lame de verre. L'objectif est de pouvoir identifier la diversité des espèces de légionelles présente dans un échantillon.

La spécificité de cette puce a été testée sur des souches ATCC. L'objectif du CNR est l'évaluation de cette puce sur 200 souches environnementales appartenant ou non à ces espèces cibles. Cette évaluation est en cours. L'étape suivante sera d'évaluer cette puce sur des échantillons d'eau.

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- Institut Pasteur d'Alger (Amina Benabbou) : identification des souches de légionelles et analyse PFGE.

- Conseil régulier par contact téléphonique, messagerie électronique pour la réalisation de la concentration des urines et pour le chauffage des urines pour éliminer les réactions faussement positives.

2.2. Activités d'expertise de l'année 2012

2.2.1 Nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...) ;

Le tableau 1 résume en chiffre l'activité du CNR pour l'année 2012 et l'évolution de cette activité depuis 2007.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR depuis 2007

Analyses réalisées	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Sérologie	4609	3741	3271	3187	3100	2535
Culture de prélèvements cliniques	181	209	197	220	275	343
PCR sur prélèvements cliniques	192	193	110	134	128	104****
Co-culture de prélèvements pulmonaires			170	213	205	340
Recherche d'antigènes urinaires	1615	1835	1977	1733	1913	1858
Identification de souches cliniques	233*	213*	224*	283*	263*	307*
Identification de souches environnementales (études incluses)	1268	1144	611	1428	1140	893
Prélèvements d'eau pour culture	543	640	614	383	512	479
Prélèvements d'eau pour PCR	67	150	240	53	228	257
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	55	50	49	44	45	62
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	490	423	416	711	916	835**
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested SBT)			38	93	102	112***
Isolats <i>Legionella</i> analysés en SBT	98	232	602	437	415	409
Isolats <i>Legionella</i> analysés à l'aide de Mabs				669	717	532

* Pour des raisons de cohérence avec les données de l'InVS, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2012 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2012. Un total de 339 souches d'origine clinique ont été analysées en 2012.

** 245 isolats ont été analysés dans le cadre d'investigations épidémiologiques en 2012

*** 62 prélèvements étaient positifs pour au moins 1 gène

**** 104 PCR *L. pneumophila* et 104 PCR *L. non pneumophila*

- Souches d'origine clinique

Parmi les 1298 cas déclarés en 2012, une souche a été isolée pour 307 cas soit 23,7 %, et analysée par le CNR. La majorité (304/307) des souches était des *L. pneumophila* dont 294 (95,7%) des *L. pneumophila* séro groupe 1. 10 souches étaient des *L. pneumophila* non sg1 et 3 des *L. non pneumophila* (tableau 2). Ces chiffres correspondent à la répartition des souches retrouvées chaque année depuis plusieurs années.

Parmi les Lp1, 79 (25,7%) étaient des souches endémiques avec 29 souches Louisa, 23 souches Lorraine et 21 souches Paris (voir paragraphe 3.1.3).

En 2012, l'ensemble des Lp1 étudiées appartenait à 72 Sequence Type (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans la figure 2. **Plus de 50% des souches appartiennent à 8 ST.**

Fait marquant depuis quelques années : prédominance des souches ST23

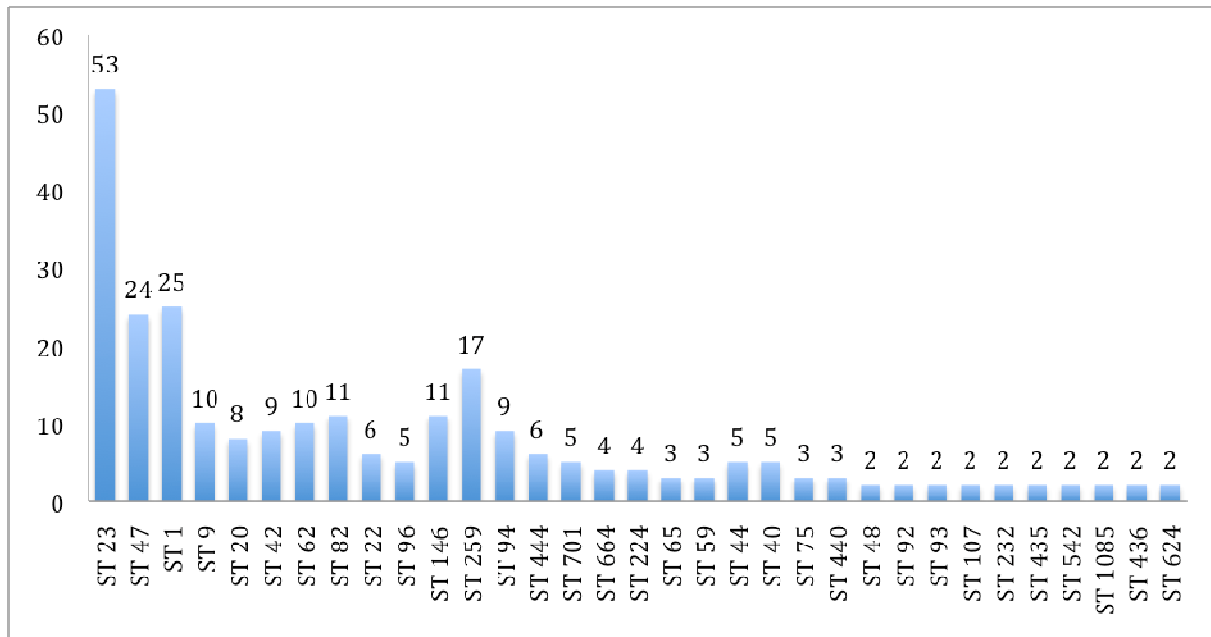
Le fait le plus marquant et qui persiste depuis plusieurs années est la fréquence importante des souches appartenant au ST23 en France (près de 20% de l'ensemble des souches). Les souches ST23 regroupent la souche endémique Louisa présentant un profil PFGE particulier (appelé Louisa) et un ensemble de souches dont les profils PFGE sont différents les uns des autres. Ces souches ST23 sont isolées de cas diagnostiqués sur l'ensemble du territoire Français.

Un total de 486 souches ST23 a été déposé sur le site de typage européen par 19 pays européens et 3 pays non européens (USA, Japon et Israël) ; **plus de 70% des souches ST23** soit 344 souches déposées **sont des souches Françaises.**

Le dépôt des souches n'est pas obligatoire et ne reflète donc pas de façon exhaustive l'ensemble des souches mais (i) les pays participant au groupe EWGLI dépose de façon régulièrement leurs souches d'origine clinique et (ii) ce chiffre de 70% apparaît important.

Le séquençage d'une trentaine de souches ST23 et de souches de complexes clonaux proches est en cours en collaboration avec l'Institut Pasteur (Carmen Buchrieser). Une étude spécifique sur ces souches ST 23 est en cours avec l'InVS (voir paragraphe 3.1.4.3.2).

Figure 2. Figure représentant la distribution des différents ST de *L. pneumophila* sg1 issus des 307 souches d'origine clinique analysées au CNR en 2012 (ST regroupant plus de 2 souches).



Les souches d'origine clinique nous parviennent d'une centaine de villes en France. Ces données sont stables depuis 2007 (tableau 3 et 4). En 2012, l'isolement de souches d'origine clinique a concerné 72 départements.

Les souches d'origine clinique provenaient pour la grande majorité de laboratoires de Centre Hospitalier. Une seule souche nous a été envoyée d'un grand LABM (Biomnis). Les souches sont issues de 114 villes, 1 souche nous a été adressée du laboratoire du CHU de Point à Pitre (tableau 3 et 4).

Tableau 2. Evolution du nombre de souches d'origine cliniques isolées en France depuis 2003 et répartition des isolements de légionelles par espèces et par sérogroupe

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	
<i>Legionella pneumophila</i>	227	272	220	224	210	222	280	259	304	
sérogroupe 1	222	263	188	218	203	211	270	248	294	
sérogroupe 2		1		1		2	2		2	
sérogroupe 3		1	4		1	3	1	2	6	
sérogroupe 4					1	1		4		
sérogroupe 5	2	1	1	1	2		1	2		
sérogroupe 6	3	2	2		1	2	2		1	
sérogroupe 7			1	2		1		2		
sérogroupe 8		2	1	1	1	2	4	1	1	
sérogroupe 10			1							
sérogroupe 14					1					
sérogroupe indéterminé*		2	2	1						
<i>Legionella non pneumophila</i>		4	2	3	3	2	3	4	3	
<i>Legionella dumoffii</i>							1		1	
<i>Legionella micdadei</i>			1				1	1		
<i>Legionella longbeachae</i>	2	1	1	1	2		1	1	1	
<i>Legionella anisa</i>				1		1				
<i>Legionella tucsonensis</i>										
<i>Legionella gormanii</i>					1					
<i>Legionella bozemanii</i>		1						2	1	
<i>Legionella feelei</i>		1								
<i>Legionella cininatiensis</i>		1								
<i>Legionella wadsworthii</i>				1						
<i>Legionella sainthelensis</i>						1				
Total	229	276	222	233	213	224	283	263	307	

* réactions croisées en immunofluorescence directe.

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

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

Tableau 4. Origine des laboratoires dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2012.

villes	nb souches	villes	nb souches
Amiens	1	Lille	4
Angers	9	Limoges	1
Angoulême	1	Lyon	30
Annecy	9	Mantes la Jolie	1
Arles	1	Marmande	1
Arras	1	Marseille	5
Aubenas	1	Martigues	2
Aubervilliers	2	Maxeville	1
Aurillac	3	Montargis	1
Avignon	1	Montbéliard	7
Bayonne	2	Montceau les Mines	2
Beauvais	3	Montpellier	3
Belfort	6	Nancy	4
Besançon	6	Nantes	3
Béziers	1	Nice	7
Blois	1	Nîmes	1
Bordeaux	1	Niort	1
Boulogne/Mer	1	Orléans	1
Bourg en Bresse	1	Paris	19
Bourgoin Jallieu	2	Périgueux	1
Brives	1	Pointe à Pitre	1
Caen	1	Poitiers	1
Cannes	1	Pontarlier	1
Cergy Pontoise	2	Pontoise	1
Chalon / Saône	3	Provins	1
Chambéry	3	Reims	3
Charleville	2	Remiremont	1
Chartres	2	Rennes	1
Clamart	3	Roanne	2
Clermont Ferrand	3	Roubaix	2
Clichy	1	Rouen	3
Colmar	8	Royan	1
Colombes	2	Saint Briec	1
Creil	1	Saint Ouen l'Aumône	2
Créteil	3	Saintes	2
Dieppe	1	Sallanches	1
Dijon	5	Sarlat	1
Dunkerque	3	Saverne	3
Eaubonne	1	St Denis	1
Épinal	1	St Dizier	1
Fontainebleau	1	St Etienne	5
Fréjus	8	Strasbourg	6
Gap	1	Suresnes	2
Garches	2	Thionville/Metz	3
Gonesse	1	Toulouse	1
Grasse	1	Tourcoing	3
Grenoble	3	Tours	4
Haguenu	3	Troyes	1

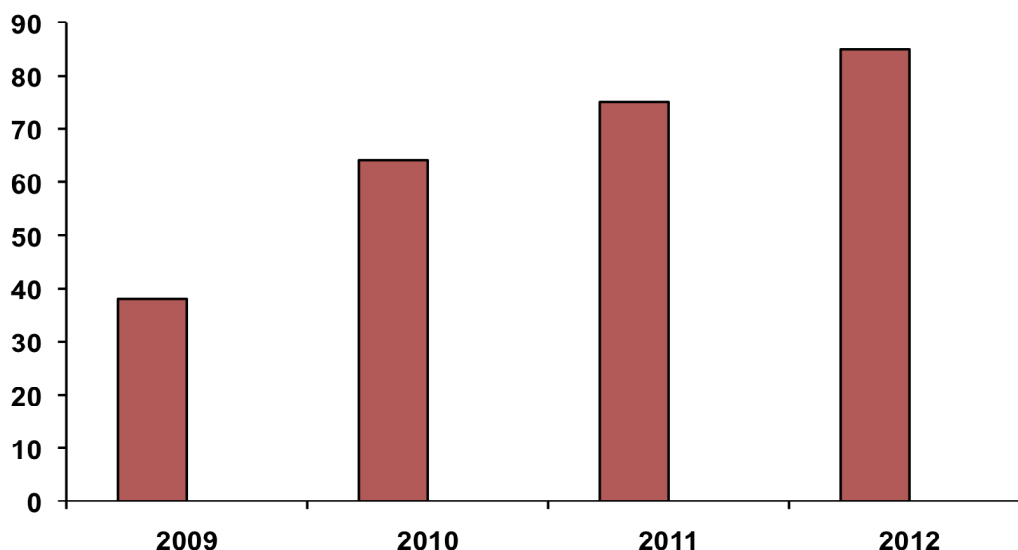
Hyères	2	Valenciennes	1
Kremlin	2	Vannes	2
La Roche/Yon	3	Verdun	1
La Seyne/Mer	1	Versailles	2
La Test de Buch	1	Vesoul	9
Laon	1	Vienne	1
Le Mans	3	Villefranche/Saône	3
Le Puy en Velay	2	Villeneuve/Lot	1
Lens	1	Yerre	1

- Prélèvements pulmonaires

Nous avons, conjointement avec l'InVS et les ARS, encouragé les laboratoires à envoyer les prélèvements pulmonaires au CNR lorsque la culture est négative ou lorsque la culture n'est pas réalisée dans le laboratoire.

L'évolution de ces envois est représentée Figure 3 : depuis 2009 le nombre de laboratoires différents nous envoyant des prélèvements a plus que doublé (38 laboratoires hospitaliers différents en 2009 contre 85 en 2012).

Figure 3. Evolution du nombre de laboratoires nous envoyant des prélèvements pulmonaires pour investigation épidémiologique alors que la culture de *Legionella* est négative ou non réalisée.



Lorsque la culture ou la co-culture sont négatives, la Nested-SBT est réalisée directement sur le prélèvement.

En 2012, 112 prélèvements ont été analysés par Nested SBT. Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 16 prélèvements. Pour 46 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a pu être amplifié.

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus pour la technique de Nested-SBT sur prélèvement pulmonaire

année	Nombres de gènes pour lesquels un résultat est disponible								nombre total de prélèvements
	7	6	5	4	3	2	1	0	
2009	16	5	2	4	2	2	4	2	37
2010	26	11	12	5	6	5	7	5	77
2011	14	10	7	6	3	8	12	3	63
2012	16	6	6	2	8	4	20	50	112

Le fait marquant de 2012 est l'absence d'amplification pour 45% des prélèvements analysés correspondant pour la plupart à des prélèvements de patients pour lesquels le diagnostic de légionellose a été posé par la détection d'antigènes urinaires. L'analyse des raisons de ces résultats est en cours.

- Confirmation de tests urinaires

20 urines testées avec différents kits mis sur le marché ont été reçues pour confirmation de positivité. Pour 4 urines, un résultat faussement positif a été mis en évidence.

- Souches d'origine environnementale

Les souches environnementales sont adressées au CNR :

- pour identification précise,
- pour typage lors de l'investigation de cas.

Parmi les 893 souches d'origine environnementale reçues au CNR en 2012, la distribution des *L. non pneumophila* et des différents sérogroupes de *L. pneumophila* est représentée Figures 3 et 4.

Figure 3. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des souches de *L. pneumophila* et non *pneumophila* d'origine environnementale identifiées au CNR en 2012

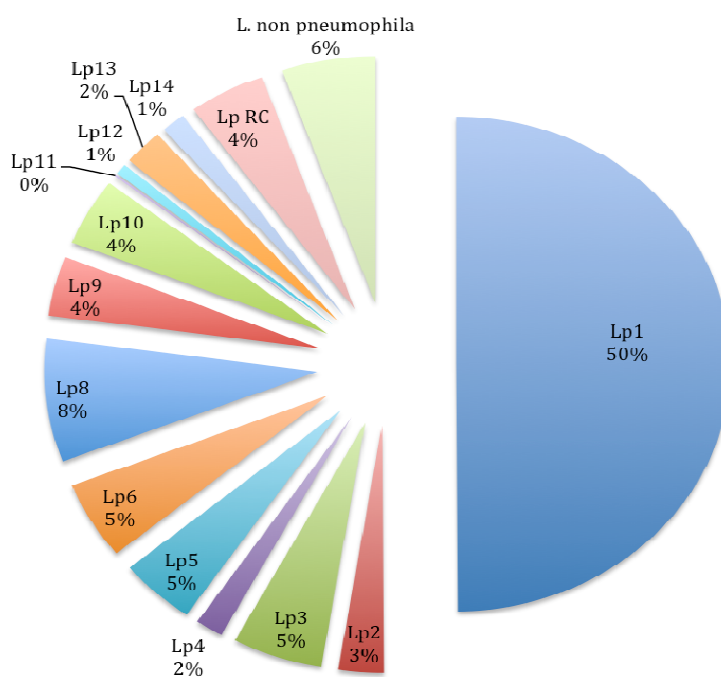
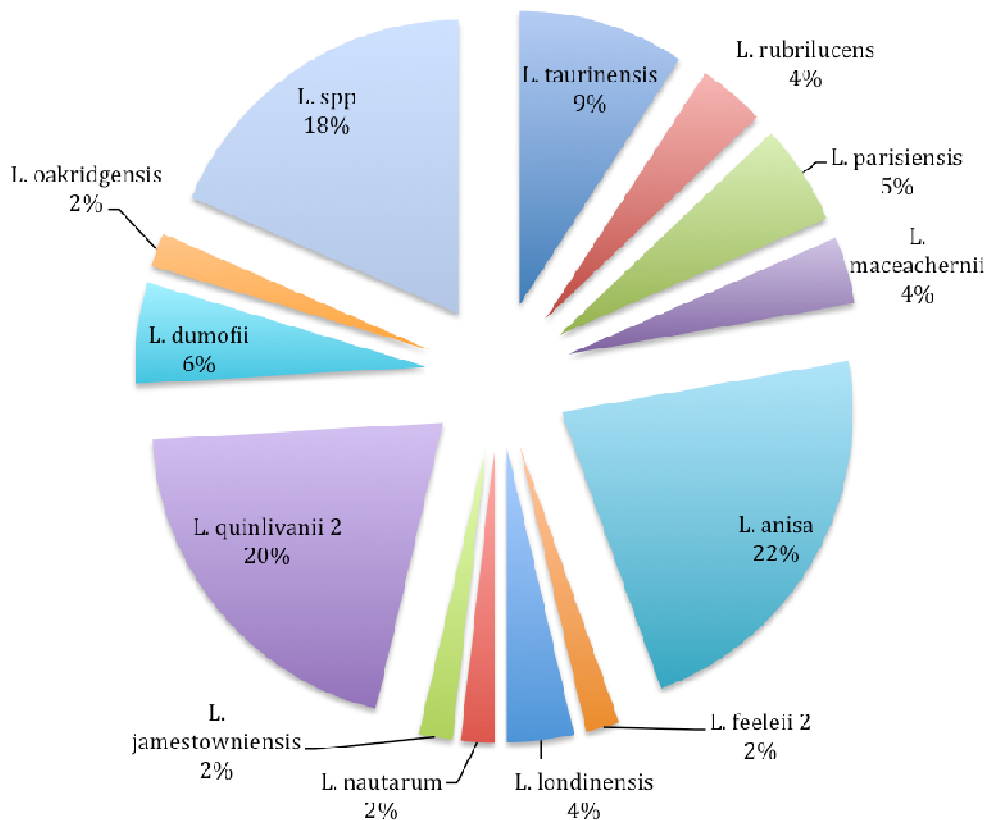


Figure 4. Distribution en terme d'espèces des souches de *L. non pneumophila* d'origine environnementale identifiées au CNR en 2012



2.2.2 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats. En 2012, le CNR n'a répondu à aucune demande d'étude de sensibilité aux antibiotiques pour des souches cliniques ou environnementales.

- **2.2.3** Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.

78 souches issues de la souchothèque CNR ont été distribuées :

- Société BioMérieux : 25 souches *L. pneumophila* et 6 souches *L. non pneumophila*
- Laboratoire Hygiène de la Ville de Paris (LHVP) et Groupe de Travail Afnor : 1 souche Lp5 et *L. anisa*
- 47 *Legionella pneumophila* et non *pneumophila* pour séquençage (Institut Pasteur de Paris, Carmen Buchrieser)
- Dominique Schneider : 1 souche Lp1 Paris
- HPA Londres : 3 Lp1 (ayant un allèle *mip* particulier : *mip* 11, *mip* 39 et *mip* 55)

ADN

- 10 ADN *Legionella non pneumophila* au laboratoire LERES, Nîmes
- 13 ADN à la Société DENDRIS

3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.1.1 Réseau de partenaires en précisant notamment les notions suivantes : (i) description des partenaires, (ii) répartition par type d'activités, (iii) répartition géographique, (iv) estimation de la couverture du réseau ou représentativité, (v) évolution du réseau

Nos partenaires sont l'InVS, les Agences Régionales de Santé (ARS), la Direction Générale de la Santé (DGS), Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, les Cellules Inter-Régionales d'épidémiologie (CIREs), les DREAL (directions régionales de l'environnement, de l'aménagement et du logement), les laboratoires de microbiologie de CHG et des CHU, les laboratoires d'analyses environnementales et les cliniciens. Nous avons près de 300 correspondants hospitaliers et près de 100 correspondants environnementaux. Le réseau couvre l'ensemble du territoire Français. **En 2012**, nous avons été en contact lors d'investigation de cas avec 17 ARS et 32 Délégations Territoriales.

Tableau 6. ARS et DT avec lesquelles nous avons été en contact lors d'investigation de cas en 2012.

<p>ARS Ile de France</p> <p>DT Essonne 91 DT Paris 75 DT Val d'Oise 95 DT Haut de Seine 92 DT Seine St Denis 93</p> <p>ARS Franche Comté</p> <p>DT Haute Saône 70 DT Doubs 25</p> <p>ARS PACA</p> <p>DT Bouches du Rhône 13 DT Alpes Maritimes 06 DT Var 83</p> <p>ARS Alsace</p> <p>DT Haut Rhin 68 DT Bas Rhin 67</p> <p>ARS Rhône Alpes</p> <p>DT Rhône 69 DT Haute Savoie 74 DT Ardèche 07 DT Isère 38</p> <p>ARS Aquitaine</p> <p>DT Gironde 33</p> <p>ARS Guadeloupe</p> <p>DT Antilles Guyane</p> <p>ARS Bretagne</p> <p>DT Côtes d'Armor 22</p>	<p>ARS Champagne Ardennes</p> <p>DT Ardennes 08 DT Haute Marne 52 DT Marne 51</p> <p>ARS Centre</p> <p>DT Loiret 45</p> <p>ARS Pays de Loire</p> <p>DT Loire Atlantique 44 DT Maine et Loire 49</p> <p>ARS Auvergne</p> <p>DT Auvergne 63 DT Allier 03</p> <p>ARS Languedoc Roussillon</p> <p>DT Hérault 34</p> <p>ARS Lorraine</p> <p>DT Meurthe et Moselle 54</p> <p>ARS Nord Pas de Calais</p> <p>DT Métropole et Flandre Intérieure 59</p> <p>ARS Limousin</p> <p>DT Haute Vienne 87</p> <p>ARS Charente Poitou</p> <p>DT Charentes Maritimes 17</p>
---	---

3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

Depuis 2008, toutes les souches d'origine clinique reçues au CNR des légionelles et les souches d'origine environnementale lorsqu'une source environnementale est fortement suspectée sont systématiquement typées par 3 méthodes :

- par utilisation d'anticorps monoclonaux (Mabs) ;
- par analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (pulsed-field gel electrophoresis ou PFGE) ;
- par 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 identifié pour ces espèces.

En 2012, 835 souches (307 souches humaines et 528 souches environnementales) ont été analysées par PFGE dont 387 dans le cadre d'investigations épidémiologiques, 409 par SBT, 532 par anticorps monoclonaux.

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

Caractérisation des souches et description des clones majoritaires en France

Ces trois méthodes permettent de réaliser le suivi dans l'espace et le temps des souches responsables des cas de légionellose.

Les cas de légionellose peuvent être associés à **quatre populations de souches** :

- les souches sporadiques possédant un profil (pulsotype - ST - sous-groupe) unique et spécifique, jamais identifié auparavant (**~35,5 %** des souches d'origine clinique isolées en France) ; **ce pourcentage est en baisse chaque année**,
- les souches épidémiques ayant un profil spécifique à une épidémie et responsable de cas de légionellose regroupés dans le temps et l'espace,
- les souches endémiques qui regroupent des isolats ayant des génotypes identiques (pulsotype – ST) responsables de cas sans lien spatio-temporel entre eux. Une souche est considérée comme endémique lorsque son génotype a été responsable (arbitrairement) de plus de 30 cas de légionellose (**~33,6 %** des souches cliniques) (Tableau 7). **Ce pourcentage est en hausse par rapport à 2011 du fait de l'émergence de 2 nouvelles souches endémiques**,
- les souches présentant un génotype déjà répertorié dans la base de données du CNR-L mais responsables de moins de 30 cas de légionellose identifiés par culture, sans lien spatio-temporel entre eux, sont désignées « souche profil connu ». Les souches "profils connus" les plus fréquentes sont représentées dans le Tableau 8.

Trois souches endémiques prédominent en France :

- la souche Paris (PFGE Paris, ST1) initialement décrite à Paris, présente une distribution mondiale (Cazalet et al. Genome Res. 2008 Mar;18(3):431-41, Cazalet et al. Nat Genet. 2004 Nov; 36(11):1165-73, Ginevra et al. Clin Infect Dis. 2009 Jul 15;49(2):192-4). Cette souche est responsable en 2012 en France d'environ **6,8 %** des cas de légionellose pour lesquels une souche a été isolée.
- la souche Lorraine (PFGE Lorraine, ST47) initialement isolée dans l'Est de la France est émergente depuis 2001. Elle est responsable en 2012 d'environ **7,5 %** des cas de légionellose diagnostiqués par culture. De façon surprenante, cette souche est exceptionnellement isolée de l'environnement.
- la souche Louisa (PFGE Louisa, ST23) nouvelle souche émergente en France, est responsable d'environ **9,5 %** des cas pour lesquels une souche a été isolée.

Tableau 7 – Caractéristiques en terme de profil PFGE, ST et sous groupe Mabs des 7 souches endémiques françaises majeures en 2012

Souches endémiques	PFGE	STs	Sous groupage Mabs	Nombre d'isolats cliniques dans notre base de données*
Paris	Paris	1	Philadelphia France / Allentown, Oida	237
Lorraine	Lorraine	47	France / Allentown	233
Louisa	Louisa	23	France / Allentown Knoxville, Philadelphia	194
Mondial	Mondial	107	Philadelphia, Benidorm	50
Biarritz	Biarritz	40	France / Allentown	79
Pulsotype G	Pulsotype G	20	Knoxville	44
Pulsotype F	Pulsotype F	259	Philadelphia	37

Tableau 8 – Caractéristiques en terme de profil PFGE, ST et sous groupe Mabs des souches « profils connus » les plus représentées en France en 2012.

Profils PFGE	ST	Sous groupe Mabs
Pulsotype A	9	Knoxville
Pulsotype B	62	France/Allentown
Pulsotype C	96	France/Allentown
Pulsotype D	94	Knoxville
Pulsotype E	82	France/Allentown
Pulsotype H	62	Knoxville
Pulsotype K	146	Knoxville
Souche Belfort	82	France/Allentown

3.1.4. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

3.1.4.1. Périodicité

Les échanges avec l'InVS sont pratiquement quotidiens (téléphoniques, courriers électroniques, fax, courriers postaux).

Ces échanges 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

3.1.4.2. Echanges de données

- Notification du CNR à l'InVS des diagnostics par culture (par télécopie). L'InVS recoupe les informations avec les DO reçues. Cette notification systématique a pour objectif d'identifier les cas n'ayant pas fait l'objet d'une notification à l'ARS. En 2012, toutes les souches signalées sur la DO ont été transmises au CNR.
- L'InVS fournit toutes les informations utiles au CNR lors des investigations épidémiologiques. En échange, le CNR fournit par courrier les résultats de typage épidémiologique de la ou les souches cliniques isolées et de la ou les souches environnementales. Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.
- Un fichier excell commun a été mis en place permettant d'associer des données du CNR et de l'InVS. Chaque fin d'année, les données de ce fichier concernant les cas de légionellose validés par l'InVS et le CNR sont finalisés par l'InVS (Christine Campese) et le fichier est renvoyé au CNR. Le bilan d'activité du CNR concernant la surveillance des cas de légionellose s'appuie sur ces données.

En 2012, dans le cadre de l'investigation de cas, plus de 452 courriers personnalisés ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à l'InVS.

3.1.4.3. Analyses communes

3.1.4.3.1. Contribution à l'investigation des sources de contamination pour les cas sporadiques

En 2012, des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **64 cas** sporadiques. Parmi les 1197 cas de légionellose diagnostiqué en 2012 (patient ayant eu le début de leur signes cliniques en 2012), **25,6 %** ont été diagnostiqué par une **culture positive**. La comparaison entre souches environnementales et souches cliniques a été réalisée dans **4,9%** de l'ensemble des cas et **20,8 %** des cas de légionellose avec souche.

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

Années	Total des investigations		Investigations positives	
	N		N	(%)
2000	25		13	52
2001	27		20	74
2002	25		15	60
2003	25		17	68
2004	39		22	56
2005	59		26	44
2006	49		26	53
2007	61		31	51
2008	50		26	53
2009	49		34	69
2010	48		29	61
2011	50		25	50
2012	66		29	44
Total	570		313	

Pour **29 cas (44% des investigations)**, les profils génomiques se sont révélés **identiques**. Pour ces cas, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que les réseaux d'eau sanitaires étaient la source la plus probable de contamination pour 7 hôpitaux, 11 domiciles, 5 établissements de tourisme et 3 autres établissements. Pour 3 investigations de circuits de refroidissement de tours aéroréfrigérantes (Tar) les souches cliniques et environnementales ont montré une identité de profils génomique. Pour 7 investigations (10,9 %), la souche impliquée était une souche endémique (Tableaux 10 et 11).

Au total, 68% des domiciles investigués semblent être à l'origine de la contamination.

Tableau 10. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2012

	Investigations positives		Investigations négatives		Total des investigations*	
	N	%	N	%	N	%
Domicile	11	68	5	33	16	23
Tourisme	5	63	3	38	8	12
Hôpitaux	7	54	6	46	13	20
Autre	3	30	7	70	10	15
Tar	3	16	16	84	19	29
TOTAL	29	44	37	57	66	0

* Pour 1 cas, deux investigations ont été faites (Tar et Domicile)

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

	Profil souches cliniques / environnementales						
	total	identique					différent
		Autres	Paris	Louisa	Lorraine	Biarritz	
Domicile	16	8	2	1	0	0	5
Tourisme	8	4	0	1	0	0	3
Hôpitaux	13	4	2	0	0	1	6
Autre	10	2	0	1	0	0	7
Tar	19	3	0	0	0	0	16
TOTAL	66	21	4	3	0	1	37

3.1.4.3.2. Etudes collaboratives

- Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours de centres nucléaires de production électrique d'EDF sur la survenue des cas de légionelloses :

Cette étude est réalisée en partenariat avec l'InVS, l'ANSES et la DGS. L'objectif est de déterminer la probabilité d'un lien entre la survenue de cas de légionellose et l'exposition des individus aux retombées des panaches émis par les 28 grandes TAR des 11 CNPE d'EDF. Cette étude a débuté en 2010 et s'est terminée fin décembre 2012. L'analyse des données est en cours. Un rapport réalisé en collaboration entre l'InVS, l'ANSES et le CNRL sera diffusé fin 2013.

- Analyse des facteurs de risque (facteurs d'hôte, exposition) associés aux trois génotypes principaux (ST23, ST1, ST47). Etude sur un total de plus de 1200 *L. pneumophila* sg 1 isolées entre 2008 et 2012. Les données sont en cours d'interprétation.

3.1.4.3.3. Publications

Publications communes en 2012 :

- Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1725-6.
- Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campèse C, Bissery A, Weinbreck P, Brun-Buisson C, Sollet JP, Ecochard R, Desenclos JC, Etienne J, Vanhems P; French Legionnaires' Disease Study Group. Eur Respir J. 2012 Apr;39(4):963-70.

3.1.5 Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement.

Collaborations dans le domaine de l'environnement :

- Participation active au groupe de travail de la révision de la norme AFNOR NFT90-431 (Monique Reyrolle et Maud Baume),
- Distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à 29 laboratoires environnementaux Français,

- 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>.
- Etude avec le Laboratoire National de Métrologie et d'Essais, Paris : « Method development for genomic Legionella pneumophila DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry ». Etude publiée dans Analytical Biochemistry,
- Participation au Comité de pilotage (COFIL) « Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéro-réfrigérantes des centres nucléaires de production d'électricité d'EDF sur la survenue de cas de légionellose » (ANSES, InVS, CNRL).

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 sensibilité constante *in vitro* aux antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des légionelloses : macrolides, fluoroquinolones et rifampicine. Aucune souche résistante aux antibiotiques n'a encore été isolée de produits pathologiques ou de l'environnement. Cependant, des échecs thérapeutiques chez des patients correctement traités peuvent motiver une demande de détermination de la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques. Ces demandes restent exceptionnelles et s'appliquent essentiellement aux souches isolées chez des patients en échec thérapeutique. Elles peuvent également s'appliquer aux souches environnementales puisque certains environnements aqueux sont connus pour être riches en antibiotiques ou pour contenir des bactéries résistantes comme les eaux d'effluents.

Une veille constante sur l'apparition de légionelles de sensibilité diminuée aux antibiotiques apparaît donc nécessaire. Le CNR doit donc disposer de techniques permettant la surveillance de l'apparition de résistance.

3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a pour projet de définir les techniques et les concentrations seuils d'antibiotiques permettant de définir la résistance, puisqu'il n'existe à ce jour aucune méthode de référence pour réaliser les antibiogrammes de *Legionella*.

Le CNR dispose actuellement de deux techniques « maison » :

- méthode extracellulaire par microdilution en plaques multi puits, permettant de déterminer les CMI ;
- méthode intracellulaire sur lignée monocyttaire U937 permettant de déterminer les CMIE.

Une résistance est définie par une augmentation significative des CMI ou CMIE des antibiotiques de la souche testée par rapport aux CMI ou CMIE définies pour les souches de référence testées (Paris, Lens, Lorraine).

Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche de légionelles, des méthodes moléculaires de détection de résistance ont été et sont développées :

- les travaux de Almahmoud *et al.* (2009) auxquels nous avons collaboré avec le laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes à Grenoble (CNRS UMR 5163, institut Jean Rouget) (M. Maurin, E. Kay et D. Schneider) ont permis la mise au point d'une technique moléculaire de détection de la résistance aux fluoroquinolones, la PCR *gyrA*, directement applicable aux produits pathologiques. Une résistance est

définie par la présence d'une mutation sur l'ADN amplifié ;

- nos travaux de recherche réalisés au CNR en 2012 montrent également un fort potentiel d'acquisition de résistance aux macrolides (jusqu'à 4000 fois la CMI d'une souche sensible). Ces travaux ont permis d'identifier les mutations impliquées dans la résistance de bas et de haut niveau aux macrolides. La mise au point de techniques de détection de ces mutations directement applicables aux souches et aux prélèvements pathologiques est en cours.

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

En 2012 et comme les deux années précédentes, **aucune épidémie (10 cas et plus)** suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée.

Neuf investigations en lien avec la suspicion de cas groupés (moins de 10 cas) ont été réalisées par les ARS en collaboration avec les CIREs. Ces investigations ont permis d'identifier **une source commune de contamination pour 1 des épisodes investigués.**

- Investigation de 2 cas de légionellose en relation avec les cas groupés de l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne.

Deux cas de légionellose (chez un couple) ayant séjourné à l'Hôtel Diamante Beach à Calpe en Espagne nous ont été signalés par le CH de Salon de Provence où ils étaient hospitalisés avec envoi d'expectorations pour recherche de légionelles. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis amibien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été analysés par Nested SBT. L'amplification n'a pas été possible pour aucun des gènes pour l'un des patients. Pour le deuxième patient, nous avons obtenu un ST 23 identique au ST des souches isolées des patients Anglais et Espagnols associés à l'épisode de cas groupés.

- Suspicion de cas 4 groupés à Fréjus.

Quatre cas de légionellose (3 hommes et 1 femme âgés de 55, 58, 70 et 83 ans) nous ont été signalés par l'ARS Paca, DT du Var - 83. La comparaison des 4 souches *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 n'a pas mis en évidence de caractéristiques communes entre ces souches. Une des souches présente les caractéristiques de la souche endémique Mondial B avec un ST107 et un sous-groupe Philadelphia. Les autres souches sont des souches de profil PFGE sporadique avec des ST 702, 23 ou 954 et des sous-groupes France/Allentown et Knoxville.

Des prélèvements environnementaux réalisés au niveau des TAR hospitalière et industrielle ont permis d'obtenir des Lp1 différentes des 4 souches cliniques investigués. Cette investigation n'a pas permis de confirmer le caractère groupé des cas.

- Suspicion de 3 cas groupés sur la zone Aubervilliers – Pantin

L'ARS Ile de France, Délégation Territoriale Seine Saint Denis – 93 nous a signalé trois cas de légionellose chez des patients hospitalisés dans cette région. Deux souches Lp1 présentaient les mêmes caractéristiques que la souche endémique Paris : profil PFGE Paris, ST 1, sous groupe Philadelphia. Les caractéristiques de la souche du troisième patient étaient différentes. Du fait du caractère endémique de la souche Paris, il est difficile de conclure à une contamination commune pour ces deux cas. De plus, les souches isolées dans l'environnement au niveau de 3 TAR voisines étaient différentes des 3 souches investiguées.

- Investigation de 3 cas groupés dans la région de Meudon

Au cours du mois d'août 2012, trois cas de légionellose dans la région de Meudon nous ont été signalés par l'ARS Ile de France, Délégation Territoriale des Hauts de Seine – 92. Les 3 souches Lp1 isolées chez ces patients présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE identique, ST 440, sous-groupe Philadelphia. L'enquête environnementale a permis de suspecter fortement la source commune de contamination pour ces 3 cas. Il s'agissait d'une **Tar industrielle** ce qui n'était pas arrivé depuis plusieurs années du fait des réglementations mises en place concernant les Tars.

- Suspicion de 5 cas groupés dans la région de Dijon

Trois cas de légionellose avec un début des signes cliniques fin décembre 2012 nous ont été signalés par l'ARS Bourgogne pour recherche de clonalité. Les 3 souches analysées ne présentaient aucune caractéristique commune.

L'une des souches était une souche endémique Louisa, ST 23, sous groupe France/Allentown ; la deuxième était identique à la souche Pulsotype F (future souche endémique) ST 259, sous groupe Philadelphia et la dernière présentait un profil connu dans notre banque de données mais non endémique, ST 1 et sous groupe France/Allentown. Deux autres cas nous ont été signalés pour lesquels la culture était négative. Nous avons réalisé une Nested-SBT du prélèvement pulmonaire dans le cadre de cette suspicion de cas groupés ; aucun des gènes analysés n'a pu être amplifié.

- Suspicion de 3 cas groupés dans la région d'Aurillac (voir chapitre 4)

- Investigation de 2 cas de contamination suspectée dans une industrie

Il s'agit de deux salariés d'une entreprise signalés par l'ARS de Franche Comté, Délégation Territoriale du Doubs – 25. Les souches isolées chez ces deux patients sont différentes. L'une est profil PFGE sporadique - ST 40 – sous-groupe France/Allentown et l'autre profil PFGE sporadique - ST 232 – sous-groupe Olda. La souche isolée de prélèvement environnemental réalisé dans l'entreprise est différente des 2 souches cliniques.

- Suspicion de 2 cas groupés dans la région de Clermont Ferrand

Deux cas de légionellose fin septembre 2012 ont été signalés par l'ARS Auvergne CIRE Auvergne. Les caractéristiques des souches isolées sont différentes : l'une est profil Pulsotype E - ST 82 – sous-groupe France/Allentown et l'autre souche profil Pulsotype F - ST 259 – sous-groupe Philadelphia. Aucune source de contamination potentielle n'a été investiguée.

- Investigation de 2 cas de légionellose diagnostiqués par antigénurie positive

Le CH de Beaune nous a demandé de comparer 2 prélèvements de crachats réalisés en octobre 2012 pour déterminer leur possible clonalité. La culture conventionnelle et la co-culture sur tapis amibien n'ont pas permis d'isoler de souches. Les 2 prélèvements pulmonaires ont été étudiés par « Nested SBT ». Pour l'un des patients, 4 gènes sur 7 ont été amplifiés mais pour le deuxième patient aucune amplification n'a été obtenue. Nous n'avons donc pas pu réaliser la comparaison de ces 2 prélèvements.

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches...)

* 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.

* Les données de typage par SBT de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation, sont systématiquement envoyées afin de renseigner la base de données du réseau EWGLI (www.ewgli.org). En 2012, les données de **347** souches ont été renseignées, correspondant à 307 souches de patients, 40 souches environnementales. Au total, les données de **1926** souches ont été renseignées sur le site.

* Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Décrire pour chacune de ces études : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication. *Exemples: Etude de la couverture immunitaire et de son évolution, Enquêtes cas-témoins pour identifier des facteurs de risque, Etude pour mesurer des incidences ; Facteurs associés à la survenue d'un sous type particulier, d'un type de résistance*

Etude de l'hypothèse d'une association entre certains génotypes et certains facteurs de risques. Voir Chapitre précédent.

Amélioration de la prévention de la légionellose et de la caractérisation de nouveaux réservoirs par détection rapide par PCR spécifiques des clones majoritaires *Legionella pneumophila* Paris et Lorraine. Etude en cours réalisée par un étudiant en thèse d'Université (Pierre Cassier). Voir Chapitre précédent.

Intérêt de la PCR quantitative *Legionella* comme marqueur pronostic.

A ce jour, la compréhension des différences de gravité clinique et de l'évolution des cas reste très parcellaire. Quelques publications ont montré une relation entre la charge bactérienne (quantifiée par PCR *Legionella*) et la gravité initiale du cas. Nous avons en projet avec le CHU de Grenoble (Pr. Max Maurin) de démontrer l'intérêt de l'étude de la cinétique de la charge bactérienne à *Legionella* comme marqueur pronostic de cette infection (dépôt d'un projet PHRC Inter régional).

4. Alerte

- Décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année

L'alerte de l'InVS est réalisée par téléphone associé à un courrier électronique adressé à Didier Che et Christine Campese. La DGS est alertée par courrier électronique adressé à Monsieur Yannick Pavageau.

Une alerte a été réalisée par le CNR en 2012 du fait de l'isolement de 3 souches ayant les mêmes caractéristiques : profil PFGE : Pulsotype F ; Sequence Type : 259 ; sous-groupe Philadelphia dans la ville d'Aurillac. En analysant la base de données du CNR, sur les 37 souches Pulsotype F de notre banque de données nous avons 6 souches isolées à Aurillac entre 2008 et 2012. L'InVS et l'ARS concernée ont lancé une enquête épidémiologique à la recherche d'une source commune de contamination. Cette étude est en cours.

5. Activités d'information, de formation et de conseil

- Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires,

Enseignements et programmes de formation

- Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des hautes études en santé publique (EHESP), Rennes : Les méthodes de détection des légionelles (antigénurie, culture et techniques moléculaires, typage des souches, limites des techniques, 2012 (S. Jarraud)
- Master "Infectiologie Cellulaire et Moléculaire, Vaccinologie", module "Contaminations Microbiennes et Santé publique", la vie des *Legionella* de l'amibe au macrophage, de Médecine de Tours, 2012 (S. Jarraud).
- Vigilance environnementale Lyon : Actualités sur *Legionella* et surveillance des eaux (Monique Reyrolle), Avril 2012
- Arlin clin sud est Lyon : *Legionella* et surveillance des eaux par culture et PCR, (Monique Reyrolle), mai Faculté 2012
- Séminaire Biorad Paris : Utilisation de la PCR pour la prévention des cas (Monique Reyrolle), Juin 2012
- Clin HCL : Bilan HCL cas et des analyses des eaux (Monique Reyrolle), mai 2012
- Girpy Lyon : Surveillance des eaux (Monique Reyrolle), Juin 2012
- CHU Besançon : Diagnostic et prévention des cas à l'hôpital (Monique Reyrolle), Octobre 2012
- Colloque bioMérieux Paris : Actualités sur *Legionella* et légionelloses (Monique Reyrolle), Octobre 2012

Accueil de stagiaires

Le CNR accueille volontiers des étudiants en Médecine, Pharmacie, Biologie, Master ou Thèse, des stagiaires du monde académique, hospitalier ou d'entreprises privées.

- Sanaa Lemriss, laboratoire de recherche et analyses médicales de la gendarmerie royale (Maroc, Rabat) : méthodes de diagnostic clinique pour mise en place au Maroc, surveillance des cas (2 jours, février 2012)
- Amina Benabbou Institut Pasteur d'Alger, identification des souches de légionelles, PFGE (1 semaine, mai 2012)
- F.Larue et S.Chautard, laboratoire Carso Lyon : techniques d'identification et épidémiologique utilisées au CNR (1 journée (Novembre 2012)

Etudiants :

- Maeva Patry, IUT, calibration d'un inoculum Lp pour le contrôle des milieux de culture norme T90-461 (2 mois ½, mai à juillet)
- A. Bricout, IUT, Utilisation de la MALDITOF dans un but de typage (3 mois, avril à juillet)
- Angélique Dupont, Master 1ere année Biologie et Environnement, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 2012 : Étude de la multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 dans les cellules intestinales Caco-2.
- Raphaël Simon, Certificat de Maîtrise en Sciences Biologiques et Médicales, 'U.E.' Physiopathologie des maladies transmissibles : Analyse spatio-temporelle des Complexes Clonaux de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 prédominants en France entre 2008 et 2011, Juin 2012
- Auriane Suet, thèse de doctorat d'état en Pharmacie : Evaluation de l'apport de la co-culture ambiante dans le diagnostic et l'investigation des cas de légionelloses, 19 Avril 2012
- Raya Harich, thèse de doctorat d'état en Pharmacie : Production d'antigènes de *Legionella pneumophila* par co-culture avec *Acanthamoeba castellanii* et utilisation de ces antigènes pour le sérodiagnostic. Comparaison à la méthode de référence au Centre National de Référence des légionelles, Faculté de Pharmacie, UCB-Lyon I, le 26 Octobre 2012.

Formations – conseils aux personnels de santé

- Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne de 1 à 10 conseils par jour)
- Glossaires envoyés avec les courriers de résultats explicitant les méthodes de typage des souches employées et les souches endémiques décrites
- Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>)
- Site spécifique dédié à l'étalon ADN 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

- [Lister les guides élaborés \(contenu, modes de diffusion\)](#)

Participation au groupe de travail pour la révision du guide d'investigation des cas de légionelloses, conduit par le Haut Conseil de la Santé Publique (Sophie Jarraud)

- [Décrire les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR : \(i\) Rétro-information aux partenaires et / ou \(ii\) Diffusion aux professionnels : conférences, Site web](#)

- Le CNR dispose d'un site web (cnr.univ-lyon1.fr) régulièrement mis à jour comprenant les informations sur le fonctionnement et les activités du CNR (prélèvements analysés, techniques utilisées,...), les fiches téléchargeables pour l'envoi d'échantillons et les modalités d'envoi ainsi que des informations ponctuelles (enquêtes en cours ou symposium).

- Sur le site web EWGLI : mise en ligne de nos données de SBT dans la base de données européennes de SBT

- Les données de surveillance peuvent être publiées en collaboration avec d'autres institutions notamment l'InVS dans des journaux internationaux à comité de lecture

- Décrire les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)
- Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques : les appels téléphoniques sont redistribués en fonction des demandes par les secrétaires. Les demandes des interlocuteurs peuvent correspondre à la demande d'un résultat ou à des conseils particuliers sur l'interprétation d'un résultat, des informations sur une technique donnée, des avis concernant des tests commercialisés. Le CNR présente une forte activité de conseil d'ordre biologique et lors d'investigation épidémiologique. 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
- Glossaires envoyés avec les courriers de résultats explicitant les méthodes de typage des souches employées et les souches endémiques décrites
- Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>)
- Lister les 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...)
- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (depuis 2007)
- 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.
 - o Membre du groupe de travail à l'AFNOR de révision de la norme NF T90-431 (Monique Reyrolle)
 - o Participation à la révision de la norme ISO 11-731 en fonction des axes de révision de la T90-431
- Membre du Comité de pilotage (COFIL). Etude sur l'impact des retombées de panaches émis par les tours aéroréfrigérantes des centres nucléaires de production d'électricité d'EDF sur la survenue de cas de légionellose (2010 – 2013)
- Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010)
- Membre du groupe de travail « révision du guide d'aide à l'investigation des cas de légionellose), Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) (2011-2012)

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

6a : Décrire les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

Cf. Annexe 6.

6b. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

- Publications nationales

Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F. *Legionella*, légionellose. Med Sci (Paris) 2012;28:639-45.

Legionella and Pontiac fever, Orphanet encyclopedia <http://www.orpha.net>, avril 2012

- Publications internationales

Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J and Ginevra C. Evaluation of Propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods* 2012; 88(2):319-2

Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V and Jarraud S. *Legionella pneumophila* ST1/Paris-Pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3):696-701.

Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. Contribution of amoebic coculture to the recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples. Prospective analysis over a period of 32 months. *J Clin Microbiol*, 2012 May;50(5):1725-6

Mekkour M, Ben Driss E, Tai J, Squinazi F, Forey F, Jarraud S, *et al.* molecular typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from environment in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2012;58 Suppl:OL1709-14.

Atlan D, Coupat-Goutaland B, Risler A, Reyrolle M, Souchon M, Briolay J, *et al.* *Micriamoeba tesseris* nov. gen. nov. sp.: a new taxon of free-living small-sized Amoebae non-permissive to virulent Legionellae. *Protist* 2012;163:888-902.

Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campèse C, Bissery A, *et al.* Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *Eur Respir J* 2012;39:963-70.

- Chapitres d'ouvrage

Ginevra C. "Molecular typing of *Legionella*" du livre "Molecular typing of bacteria" (édition Humana press), 2012

- Communications nationales

Suivi de la cinétique des charges bactériennes par PCR en temps réel chez les patients atteints de légionellose. Shadoud L, Recule C, Pelloux I, Croizé J, Jarraud S, Timsit JF, Maurin M. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

Prévention de légionellose nosocomiale, patients « à risque » : vers le risque nul ? Reyrolle M, Gardes S, Coudrais S, Droguet J, Lina G, Girard R, Jarraud S. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

Évaluation prospective de 4 milieux gélosés commerciaux pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements respiratoires. Descours G, Cassier P, Forey F, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

Nouvelle méthode de typage haut-débit de *Legionella pneumophila* appliquée aux dernières épidémies de légionellose dans le réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes. Sobral D, Le Cann P, Gérard A, Jarraud S, Gardès J, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

Évaluation du réactif TRU *Legionella* (MERIDIAN) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Freydière AM, Descours G, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Communication affichée, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

- Communications internationales

Le Cann P, Sobral D, Gerard A, Jarraud S, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Vergnaud G, Pourcel C. Colonisation du réseau d'eau chaude sanitaire de la ville de Rennes par une souche de *Legionella pneumophila* jamais impliquée dans une épidémie. Communication orale, Congrès Gestion de la qualité de l'eau. Sousse, Tunisie mai 2012.

Chaftar N, Ghrairi T, Fayçal K, Jarraud S, Berjeaud JM, Frere J, Hani K. Caractérisation de souches de *Legionella pneumophila* isolées d'eaux thermales tunisiennes. Communication orale, Congrès Gestion de la qualité de l'eau. Sousse, Tunisie mai 2012

Descours G, Forey F, Cassier P, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Comparison of four commercially available media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. 1st ESGLI Meeting, Dresden, Allemagne, 5-7 septembre 2012.

- Conférences sur invitations

S. Jarraud. Impact de la surveillance des cas de légionellose sur la compréhension de la maladie, Colloque international organisé par l'association ECOMICTH et l'AAMHA. La gestion de la qualité de l'eau (réseaux et thermalisme). Sousse 21 au 23 mai 2012

S. Jarraud. *Legionella* sp : que faisons-nous ? Que faut-il oublier ? Le point de vue du microbiologiste. Communication orale, RICAI, 23 Novembre 2012, Paris.

7. Programme d'activité N+1 et N+2

Les principaux projets pour les années 2013 et 2014 correspondent pour la plupart à des projets déjà initiés en 2012 :

Qualité :

- Accréditation des analyses selon la norme EN ISO 15189 pour les analyses médicales en relation avec le CNR en 2014. Seront concernés dans un premier temps la recherche d'antigènes urinaires, la mise en culture de prélèvements pulmonaires pour recherche de légionelles et la PCR *Legionella* sur prélèvements pulmonaires. Les demandes pour les autres processus notamment les méthodes de typage seront faites à la suite de celles-ci. Cette démarche fait suite à l'accréditation du laboratoire pour les analyses environnementales de légionelles
- Mise en place d'une base de données Bionumerics (avec l'aide d'un étudiant en Master).

Evaluation :

- Participation à une étude d'évaluation par le groupe européen ESGLI d'une PCR quantitative triplex (*L. pneumophila*, *L. pneumophila* sg 1 et contrôle d'extraction).

Projets déjà initiés :

- En collaboration avec Grenoble, étude de la cinétique de la charge bactérienne à *Legionella* par PCR quantitative au cours d'une infection et intérêt comme marqueur pronostique d'un cas de légionellose (demande d'un financement PHRC Inter régional).
- Etudier les mécanismes moléculaires de la résistance aux macrolides et mise en place d'une méthode moléculaire de détection des mutations
- Mise au point de PCR spécifiques pour les souches prédominantes en France, la souche Loraine (ST47) et la souche Paris (ST1)

Projets débutants :

- Nous souhaitons par l'utilisation du séquençage haut débit (NGS) étudier la diversité des souches Lp1 au sein d'un prélèvement respiratoire ainsi que la diversité au cours d'une infection.
- Peu de données bibliographiques sont disponibles sur les facteurs pathogéniques impliqués dans la sévérité de la légionellose. Nous souhaitons comparer les profils transcriptomiques par RNAseq de souches d'infections sévères et non sévères de légionelloses

Annexe 1

1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

1. Apporter une expertise microbiologique :

- contribuer au développement de milieux de culture spécifiques et à leur évaluation,
- contribuer au développement et à l'évaluation des nouvelles techniques diagnostiques (moléculaires, spectrométriques),
- produire, valider et diffuser des réactifs spécifiques,
- contribuer au diagnostic des légionelloses, notamment celles dues aux *Legionella non pneumophila* ;
- réaliser le typage moléculaire de toutes les souches cliniques adressées au CNR et la comparaison de leurs profils génomiques,
- développer et maintenir une banque de données des profils génomiques (PFGE/SBT),
- réaliser le typage moléculaire des souches environnementales, lors de l'investigation des cas groupés ou pour comparaison avec les profils génomiques des souches cliniques des cas isolés ayant des expositions spécifiques,
- contribuer à l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux et aux biocides,
- contribuer à des programmes de formation continue et d'évaluation externe de la qualité afin de renforcer la capacité des laboratoires de biologie médicale dans le domaine du diagnostic et de l'identification des légionelles,
- contribuer à des études de recherche appliquée, notamment sur l'écologie, les facteurs de développement et de virulence de la bactérie,
- collaborer avec les laboratoires experts dans la surveillance de la légionellose dans l'environnement,
- participer au conseil auprès des professionnels de santé et de l'environnement.

2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de veille sanitaire :

- en contribuant à la déclaration obligatoire de la légionellose par le signalement à l'Institut de veille sanitaire des cas identifiés ou rapportés au CNR,
- en contribuant à la détection et l'investigation de cas groupés,
- en participant au système de surveillance européen (ELDSNet).

3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle de cas ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), modification des profils de résistance ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

4. Conseil :

- contribuer aux expertises nationales et européennes.

Annexe 2

1.2. Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :

Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

- Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur

Tableau 1. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles (au 1^{er} Janvier 2012)

Noms et qualifications	Coordonnées	quotité de temps consacrée à l'activité CNR
Sophie Jarraud (Directeur) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Maître de Conférences des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 65 ou 04 72 77 86 42 Courriel: sophie.jarraud [at] chu-lyon.fr	50% tps H
Gérard Lina (Directeur adjoint) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 67 ou 04 78 86 12 33 ou 04 72 77 86 57 Courriel : gérard.lina [at] chu-lyon.fr	20% tps U
Jérôme Etienne (Physiopathologie et épidémiologie) Praticien Hospitalier - Centre de Biologie Est Professeur des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 12 96 21 ou 04 72 77 86 57 Courriel : jerome.etienne [at] chu-lyon.fr	10% tps H
Florence Ader (Infectiologie) Praticien Hospitalier – Service des maladies infectieuses, Maître de Conférences des Universités - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 15 60 Courriel : florence.ader [at] univ-lyon1.fr	10% tps U
Jean Freney (Biocide) Praticien Hospitalier Centre de Biologie Est Professeur des Universités à la Faculté de Pharmacie de Lyon	Tél : 04 72 12 96 71 Courriel : jean.freney [at] chu-lyon.fr	5% tps H
Monique Reyrolle (Environnement) Ingénieur - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 95 81 Courriel : monique.reyrolle [at] chu-lyon.fr	100% tps H
Pascale Girardo (Gestion informatique) Praticien attaché - Centre de Biologie Est	Tel : 04 72 12 96 70 Courriel : pascale.girardo [at] chu-lyon.fr	5% tps H
Françoise Forey (Lien de clonalité) Praticien attaché - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 63 Courriel : francoise.forey [at] chu-lyon.fr	60% tps H

Anne Marie Freydière (Evaluation réactifs) Praticien attachée - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 59 Courriel : anne-marie.freydiere [at] chu-lyon.fr	5% tps H
Ghislaine Descours (Résistance) Assistante Hospitalo-Universitaire - Centre de Biologie Est	Tél : 04 72 12 96 66 Courriel : ghislaine.descours [at] chu-lyon.fr	10% tps H
Techniciens rattachés au Centre de Biologie Est (Hospices Civils de Lyon)		
Brigitte Bon		100% tps H
Karine Droitcourt (80 %)		80% tps H
Dominique Moret		100% tps H
Joelle Chastang		100% tps H
Marielle Siffert		100% tps H
Techniciens et Post Doctorant (crédits InVS)		
Nathalie Jacotin (technicienne) (Biologie moléculaire)		100% tps U
Christophe Ginevra (Post Doctorant) (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique)	Tel : 04 78 77 86 42	100% tps U
Op Bio		
Marie Fa / Gérard Voilin		50% tps H
Secrétariat		
Isabelle Brégeron		30% tps H

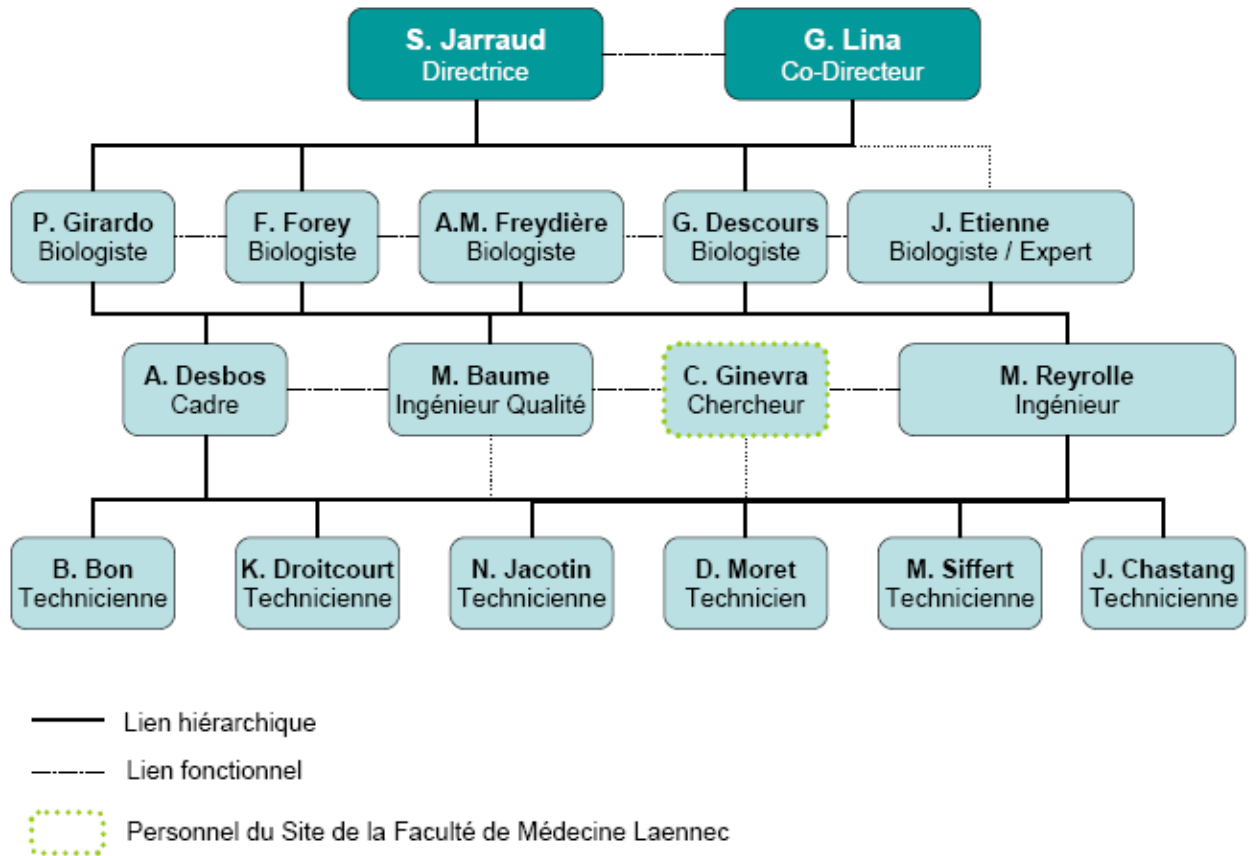
H : hospitalier, U : universitaire

Ajouté à ce personnel, François Vandenesch en tant que chef de service du laboratoire de Bactériologie du Centre de Biologie Est.

- Organigramme

Le CNR des légionelles fait partie intégrante du laboratoire de Bactériologie du Centre de Biologie Est composé de 3 secteurs : la bactériologie conventionnelle, le diagnostic moléculaire et les Centres Nationaux de Références des Légionelles et des Staphylocoques. Sur le plan des ressources humaines, le laboratoire de Bactériologie emploie 81 personnes (16 biologistes, 4 ingénieurs, 4 secrétaires, 2 cadres, 47 techniciens, 2 OPbio) réparties dans les 3 secteurs du laboratoire. Nombre de personnels émargent à plusieurs domaines fonctionnels du laboratoire ; c'est le cas de la majorité des biologistes qui consacrent une partie de leur temps aux activités des CNR (Tableau 1).

Figure 1. Organigramme fonctionnel du Centre National de Référence des légionelles (au 1^{er} janvier 2012)



Annexe 3

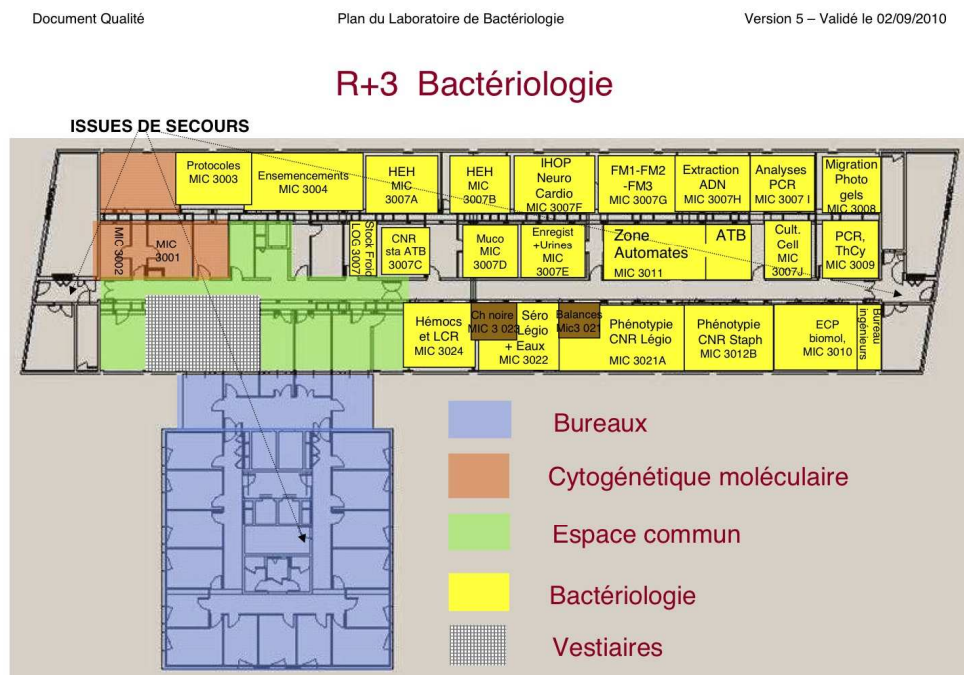
1.3. Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés)

o Surface et plan

Le laboratoire de Bactériologie du CBPE occupe pratiquement la totalité d'un étage soit environ 1000 m² (plan, Figure 2), auxquels il faut ajouter les surfaces communes partagées avec le laboratoire de virologie au 2^{ème} étage à savoir un laboratoire P3, un espace dédié à la biologie moléculaire sur prélèvement et la laverie-stérilisation. Au 3^{ème} étage, des espaces spécifiques sont dévolus aux activités du CNR des légionelles (cf. pièces portant la mention CNR sur le plan ci-dessous) : une pièce consacrée à l'enregistrement (MIC 3007^E), ou aux espaces de secrétariat (zones vertes) et de bureaux (zones bleues) ; une pièce consacrée à la mise en culture des prélèvements environnementaux (A3-03-MIC-3022), une pièce pour l'analyse PCR des eaux (A3-03-MIC-3004), une pièce destinée à la mise en culture de prélèvements pulmonaires, la recherche d'antigènes urinaires, la fabrication d'antigènes et la sérologie (A3-03-MIC-3012A) et plusieurs pièces communes qui permettent la réalisation des techniques de biologie moléculaire, (typage par PFGE, analyses PCR,...). Le CNR dispose également d'une pièce spécifiquement dédiée à la culture cellulaire (A3-03-MIC-3007J). Le CNR a accès au laboratoire P3.

Sur le site Laennec de la faculté de Médecine Lyon Est, l'équipe Pathogénie bactérienne et immunité innée du laboratoire INSERM U851 a une surface de 400 m² et ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR des légionelles. L'activité du laboratoire est consacrée à l'étude de la physiopathologie des infections à *Legionella* et staphylococciques.

Figure 4. Plan du laboratoire de Bactériologie du CBPE



- **principaux équipements**

Les principaux équipements dont dispose le CNR qu'ils aient été acquis sur des crédits InVS ou du fait de la mutualisation avec les autres secteurs du laboratoire, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à tout un équipement technologique comme des cytomètres de flux (utilisé pour étudier l'interaction hôte bactérie au niveau cellulaire), des appareils PCR temps réels (Light Cycler), de nombreux thermocycleurs conventionnels, des extracteurs d'ADN, des hottes à flux et des PSMs, trois systèmes d'électrophorèse en champs pulsé Chef Biorad, un système informatique de traitement des images électrophorétiques et d'analyse des données, des centrifugeuses de différentes capacités, un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des protéines recombinantes), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimatsu couplé à la base de données Saramis) et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Les moyens informatiques : outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie, incluant celles du CNR, le laboratoire s'est doté d'un outil de gestion de base de données spécifiques pour les CNR sur une base du logiciel Bionumerics de la société Applied Maths hébergé sur un serveur sécurisé à la direction de l'informatique des Hospices Civils de Lyon.

Annexe 4

2.1. Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux disponibles au CNR :

Méthodes de diagnostic des légionelloses

- Mise en culture de prélèvements pulmonaires sur des milieux spécifiques (BCYE, BMPA, MWY, GVPC)

- Co-culture amibes-prélèvement pulmonaire réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline).
 - Contribution of amoebic coculture to the recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples. Prospective analysis over a period of 32 months. Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Feb 8.

- Détection d'antigènes dans les urines par immunochromatographie sur membrane (Now *Legionella*®, Alere) et par ELISA (Bartels®, Trinity Biotech).
 - Concentration des urines par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore®).
 - Chauffage des urines pour élimination des faux positifs

- Sérodiagnostic par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antigènes préparés selon la méthode de Taylor *et al.* sur sacs vitellins d'embryons de poulet (Public Health Laboratory, Colindale, UK). Des antigènes polyvalents et monovalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces de *Legionella* sont ainsi préparés par le CNR.

- PCR sur prélèvements pulmonaires, sérum, sang sur EDTA ou autres prélèvements pathologiques :
 - utilisation du réactif Diagenode® (*Legionella* species and *Legionella pneumophila* Real-time PCR)

- PCR spécifique du séro groupe 1 de *L. pneumophila* (Lp sg1) PCR qualitative et quantitative spécifique du séro groupe 1 de *Legionella pneumophila* mise au point et applicable aux prélèvements environnementaux et aux prélèvements cliniques
 - Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL; the DELPH-I group, Lawrence C, Buchrieser C. A specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1708-17.

- PCR-séquençage de la région intergénique 23S-5S pour identifier les espèces de *Legionella non pneumophila*
 - Grattard F., Ginevra C., Riffard S., Ros A., Jarraud S., Etienne J., Pozzetto B. Analysis of the genetic diversity of *Legionella* by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region: from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. Microbes Infect. 2006;8:73-83.

Méthodes d'identification

- identification phénotypique de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles par immunofluorescence directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR et par agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, Pro-Lab, Biomérieux).

- identification génotypique des *L.* non *pneumophila* par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), séquençage du gène *mip* et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI (www.ewgli.org) et par amplification et séquençage de l'espace intergénique 23S-5S.

- identification par la méthode MALDI-TOF-MS
 - Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. J Med Microbiol. 2010;59:273-84
 - Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydiere AM, Vandenesch E, Etienne J, Jarraud S. Évaluation du spectromètre de masse AXIMA SARAMIS SIRWEB-MALDI-TOF pour l'identification d'espèce des légionelles par MALDI-TOF-MS. Communication affichée, 28^{ème} RICA 2009, Paris.

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

- Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques extracellulaire en milieu liquide en microplaque ou en milieu gélosé sans charbon BYE (Buffer Yeast Extract) en utilisant la méthode Etest®

- Evaluation de la concentration extracellulaire minimale inhibant complètement la multiplication intracellulaire (CMIE).
 - Descours G, Ginevra C, Forey F, Molmeret M, Jarraud S, Etienne J. Évaluation de l'activité intracellulaire d'antibiotiques seuls et en association sur *Legionella pneumophila* par PCR quantitative, sur la lignée cellulaire U-937. Présentation orale, 28^{ème} RICA 2009, Paris.
 - Descours G, Ginevra C, Forey F, Lina G, Etienne J, Jarraud S. Intracellular activity of antibiotics, alone and in combination, on *Legionella pneumophila* using a quantitative real-time PCR assay. Communication orale, 24nd EWGLI 2010, Copenhagen, Danemark.
 - Rifampicin-macrolide synergy against *Legionella pneumophila* serogroup 1 in human macrophages using a quantitative real-time PCR assay. Descours G, Ginevra C, Ader F, Forey F, Lina G, Etienne J, Jarraud S. Int J Antimicrob Agents. 2011 Aug;38(2):188-9.

Méthodes de typage

- Méthodes appliquées sur souches :
 - typage phénotypique réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mabs). Nous possédons le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden de 24 Mabs permettant le sous groupage des *L. pneumophila* séro groupe 1 en 9 sous-groupes (souche Philadelphia, Knoxville, Oida, Oxford, etc.)
 - "Sequence Based Typing" (SBT), méthode de référence Européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes
 - Analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (pulsed-field gel electrophoresis ou PFGE) en utilisant l'enzyme *Sfi*I,

- Méthode de spoligotypage permettant de discriminer les souches du clone endémique *Legionella pneumophila* Paris
 - Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Arquillère R, Meugnier H, Vandenesch F, Lina G, Etienne J, Caro V, Jarraud S. Development and evaluation of a spoligotyping method for *Legionella pneumophila* Pulsotype Paris-ST1 subtyping, communication affichée, FEMS 2011, Genève.
 - Christophe Ginevra¹, Olivier Bastien², Francois Vandenesch¹, Jerome Etienne¹ and Sophie Jarraud¹. Development and evaluation of a spoligotyping method for *Legionella pneumophila* Paris subtyping. Communication orale, 24th Annual Meeting European Working Group for *Legionella* Infections. EWGLI, Copenhagen, 15-17 September 2010
 - *Legionella pneumophila* Sequence Type 1/Paris Pulsotype Subtyping by Spoligotyping. Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V, Jarraud S. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):696-701.
- Identification des isolats porteurs du gène *lag-1* par PCR.
- Méthode de typage appliquée sur prélèvement clinique :
 - La technique de SBT peut être appliquée directement sur prélèvement clinique en s'affranchissant de l'isolement de souches. Cette méthode a été développée par le CNR. Le protocole est maintenant disponible sur le site de l'HPA (Health Public Agency).
 - Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. Evaluation of a nested-PCR based Sequence-Based Typing method (SBT) applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2009;47:981-7.

Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement

- Culture de prélèvement d'eau selon la norme NFT90-431
- Culture de compost, terre et lagunes d'épuration
- PCR quantitative en temps réel selon la norme XPT90-471 : PCR quantitative détectant *L. pneumophila* et *Legionella spp.* avec un système commercialisé, le GeneCycler (GeneCycler®).
 - Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2801-8.
 - Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Real-time PCR detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1452-6.

Détection et quantification des bactéries viables :

- Marquage de bactéries viables par différents marqueurs (TVC, Bac Light Kit, Dapi, Immunologique) et lecture au microscope à fluorescence
 - Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. A PCR-Based Method for Monitoring *Legionella pneumophila* in Water Samples Detects Viable but Noncultivable *Legionellae* That Can Recover Their Cultivability. *Appl Environ Microbiol.* 2008 ;74:4817-24.

- Détection des bactéries viables par utilisation du PMA associé à une PCR

- Slimani S, Ginevra C, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Reyrolle M, Etienne J, Jarraud S. PCR-quantification of viable *Legionella* in water samples: Development of a propidium monoazide pretreatment of bacteria directly applied on membrane filters. Communication affichée. *Legionella* 2009, Paris.
- Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J, Ginevra C. *J Microbiol Methods*. 2012 Feb;88(2):319-21.

Evaluation par un test de screening de la capacité de multiplication intra-amibienne des légionelles :

- test APT (Amoeba Plate Test) qui est un test de screening semi-quantitatif, utilisé pour évaluer la capacité de multiplication intracellulaire des légionelles dans les amibes.

Quantification de l'adhésion et de la multiplication des légionelles par différentes méthodologies (microscopique, PCR, cultivabilité) sur différents types cellulaires (U937, A549, amibes ...)

Annexe 5

2.2. Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

Description : nombre de souches, caractérisation

En conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain, l'ensemble de la collection du CNR des Légionnelles a été déclaré sous le numéro DC-2008-176.

Tableau 2. Collections DC-2008-176 de souches, sérums et autres prélèvements au CNR Légionnelles

Collection ou stockage échantillons	Nombre approximatif d'échantillons	conditions de conservation température
sérums	12 800	-20°C
souches patients	3 800	-20°C et -80°C
souches environnementales	21 100	-20°C et -80°C
souches de référence	200	-20°C et -80°C
sérums de lapins immunisés	4 300	-20°C
Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	900	-20°C
urines	200	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	1 450	-20°C
ADN (souches)	3 500	-20°C

Collection de souches :

- souches de référence inscrites à l'ATCC soit 41 *L. pneumophila* et 56 *Legionella non pneumophila*
- souches de référence européennes du groupe EWGLI parfaitement caractérisées par différents marqueurs moléculaires (AFLP, PFGE, SBT, AP-PCR) (109 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale caractérisées par leur identification phénotypique, leur profil en champ pulsé et pour certaines souches leur profil en Sequence Based Typing et de leur habillage en gènes de virulence

Collection d'antigènes produits par le CNR et utilisés pour le sérodiagnostic. Ces antigènes sont produits au CNR depuis 1980. Des échantillons fabriqués il y a plusieurs dizaines d'années sont encore utilisés.

Collection d'immun-sérums produit à partir des souches de référence chez le lapin

Collection de sérums de patients

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose

Collection d'urines de patients atteints de légionellose

- **Conditions de stockage**

Collection de souches

Les collections de souches d'origine clinique et les souches de référence sont stockées à -20°C et à -80°C (2 stockages avec une surveillance des congélateurs à l'aide du système SPY avec le logiciel SIRIUS de la société JRI ; la surveillance est effectuée par 7 personnes avec un planning hebdomadaire et une surveillance quotidienne du lundi au vendredi).

Toutes les souches d'origine clinique sont conservées sans délai de temps.

Toutes les souches d'origine environnementale sont conservées pendant 3 ans puis après sélection, une partie de ces souches est conservée sans délai en prenant en compte la représentativité de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles, la diversité géographique, la prévalence de certains clones...

Les collections d'antigènes et d'immun-sérums sont stockées à 4°C et à -20°C.

Collection de sérums

Les sérums sont conservés systématiquement 3 ans. Une collection de sérums est élaborée par un tri des sérums intéressants pour plusieurs critères : l'objectif étant de garder l'ensemble de sérums positifs et négatifs d'une séroconversion, les sérums (positifs et/ou négatifs) des patients pour lesquels le diagnostic de légionellose est confirmée à notre connaissance par une autre technique, tous les sérums positifs.

- **Conditions de mise à disposition de ces collections**

- Les souches sauvages d'origine clinique et/ou environnementale de la collection du CNR ainsi que les ADN de ces souches peuvent être adressées aux laboratoires académiques, hospitaliers, ou environnementaux après demande motivée et sous le seul jugement des responsables du CNR.
- Les prélèvements de patients (urines positives ou sérum positifs ou prélèvements pulmonaires) peuvent être adressés anonymisés à des laboratoires médicaux hospitaliers après demande motivée dans le contexte le plus souvent de contrôle d'une technique en cours de validation et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n°2007-1220 du 10 août 2007).
- Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature d'une lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles.

Annexe 6

6.1 Mécanismes moléculaires de la résistance de *Legionella* aux macrolides

Les macrolides (érythromycine, azithromycine, clarithromycine, spiramycine, josamycine) font partie de l'arsenal thérapeutique utilisé dans le traitement des légionelloses. En 1985, Dowling *et al.* montraient la facilité avec laquelle une résistance de *Legionella* à l'érythromycine pouvait être obtenue *in vitro*. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance étaient jusqu'à présent non déterminés.

Notre objectif était, à partir de la souche de référence Paris séquencée, de sélectionner des mutants résistants par passages successifs sur des milieux liquides contenant des macrolides. Sur une période de 3 mois, nous avons sélectionné en laboratoire L3 6 lignées résistantes à l'érythromycine et 7 lignées résistantes à l'azithromycine à partir de la souche ancestrale Paris, en 12 à 20 passages successifs. Pour chacune des lignées, chaque passage a été conservé au laboratoire L3 à -80°C, afin de déterminer ensuite la séquence d'apparition des mutations.

Les résultats sont les suivants :

- la sélection de souches résistantes a été plus aisée par l'érythromycine que par l'azithromycine et a permis l'obtention de mutants de niveau de résistance plus élevé ;
- les mutants présentent des CMI comprises entre 500 et 4000 fois la CMI initiale ;
- les mutants présentent des résistances croisées à tous les macrolides, mais ne présentent pas de résistance croisée aux fluoroquinolones, à la rifampicine, à la doxycycline et au linézolide.

Dans un deuxième temps, un séquençage NGS (plateforme de séquençage ProfileXpert, Lyon) a permis d'identifier différentes mutations sur les 13 lignées. Pour toutes les lignées, nous avons observé des mutations sur les gènes codant les protéines et l'ARN ribosomal 23S : *rplD* (protéine L4), *rplV* (protéine L22), et sur les gènes codant les 3 opérons de l'ARN ribosomal 23S.

Nous avons ensuite mis au point des PCR spécifiques de ces 5 cibles impliquées dans la résistance de *Legionella* aux macrolides. Puis, nous avons déterminé la séquence d'apparition des mutations à partir des passages intermédiaires conservés.

Les résultats montrent que :

- les mutations sur les gènes *rplD* et *rplV* apparaissent précocement et sont associées à des résistances de bas niveau ;
- les mutations sur les gènes codant l'ARN ribosomal 23S apparaissent plus tardivement et sont associées à des résistances de niveau plus élevé ;
- le niveau de résistance obtenu est corrélé à la nature de la mutation sur les gènes codant l'ARNr 23S et au nombre d'opérons mutés.

Dans un troisième temps, afin de valider l'implication des mutations identifiées dans la résistance, nous reconstruirons des mutants résistants à partir de la souche Paris sauvage.

Nous étudierons ensuite les autres gènes pour lesquels des mutations ont été identifiées par séquençage NGS, afin de déterminer s'ils sont impliqués ou non dans la résistance aux macrolides.

Notre objectif à terme est de détecter les mutations impliquées dans la résistance aux macrolides, à partir des souches et directement sur les prélèvements pathologiques. Sur la base des mutations identifiées sur les protéines L4 et L22 et sur l'ARN ribosomal 23S, la mise au point de cette nouvelle technique est en cours.

Recherche de bio-marqueurs de virulence de *Legionella pneumophila*

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. Peu de données bibliographiques sont disponibles sur les facteurs étio-pathogéniques impliqués dans la sévérité de la Légionellose. Le suivi épidémiologique régulier des souches *L. pneumophila* sg 1 appartenant à la collection du CNR des légionelles suggère que toutes les souches *L. pneumophila* sg 1 n'ont pas le même potentiel pathogène vis-à-vis de l'homme. Afin d'identifier les gènes responsables de cette différence de virulence, nous voulons comparer les profils transcriptomiques par RNAseq de souches cultivées sur amibes (*Acanthamoeba castellanii*) d'infections sévères et non sévères (sur la mortalité) récoltées lors de l'enquête nationale 2007-2009). Ce travail sera fait en collaboration avec G. Perrière, UMR CNRS 5558-LBBE, équipe « Biométrie et Biologie Evolutive », Lyon 1.

Résistance de *Legionella pneumophila* aux peptides antimicrobiens humains

Les défensines et cathélicidines, peptides antimicrobiens (PAMs) humains, sont d'importants constituants de l'immunité innée. Ils permettent à l'organisme de lutter contre l'infection soit par des effets bactéricides directs soit par des effets indirects tels que l'inhibition de la croissance intracellulaire. Les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance à ces peptides. Cette résistance fait partie intégrante des mécanismes de virulence de nombreuses bactéries pathogènes. Les mécanismes décrits impliquent des altérations de la fluidité membranaire, des pompes à efflux ou encore la production par les bactéries d'enzymes protéolytiques agissant contre les PAMs, des modifications de charge membranaire par la modification de molécules anioniques (e.g. acides téichoïques, phospholipides and lipide A. Par exemple, chez *Salmonella*, le facteur de virulence PagP qui contrôle l'acétylation du lipide A intervient dans la résistance aux peptides cationiques. Chez *Legionella pneumophila*, le gène *rcp* qui présente des homologies avec *pagP*, a été impliqué dans la résistance aux peptides cationiques synthétique. Néanmoins, aucune résistance aux peptides antimicrobiens humains n'a été décrite à ce jour pour *Legionella*.

Notre objectif était d'étudier les interactions entre *Legionella* et les PAMs humains par différentes approches :

- évaluer l'impact sur la croissance extracellulaire et intracellulaire en présence de PAMs,
- évaluer la possibilité d'une sensibilité aux PAM humains différentes entre plusieurs isolats cliniques de *L. pneumophila* en fonction du sérotype par exemple,
- vérifier sur des souches sauvages de patients s'il peut y avoir acquisition d'une résistance aux PAM humains au cours de l'infection,
- construire des mutants délétés pour des gènes homologues à d'autres genres bactériens impliqués dans ces résistances (en particulier *rcp*).

Nous avons pu mettre en évidence un effet bactéricide de la cathélicidine humaine LL -37 et un effet indirect de la défensine HBD-3 sur la croissance intracellulaire de la souche de référence *Lp1* Paris. L'étude de l'effet bactéricide d'un panel d'isolats cliniques de différents sérogroupes démontre une différence de sensibilité à LL-37 des isolats allant jusqu'à une résistance totale de certains isolats. Ces différences de sensibilité ne sont pas corrélées avec le séro groupe de l'isolat. Aucune acquisition de résistance n'a pu être mise en évidence pour des souches isolées successivement chez un même patient.

Le rôle de la protéine Rcp dans les interactions *L. pneumophila* et hPAM est en cours.

Les peptides antimicrobiens étant une des premières lignes de défenses de l'hôte contre l'infection, la compréhension du rôle de ces peptides dans l'infection par légionelles pourrait permettre d'expliquer la prépondérance de certains clones endémiques, ou encore l'ampleur de certaines épidémies.