Plan du rapport annuel d'activité

2014

Centre National de Référence des Légionelles

Année d'exercice

2013

Dr Sophie Jarraud & Pr Gérard Lina
Centre de Biologie et de Pathologie Est
Institut de Microbiologie
Laboratoire de Bactériologie
59 Boulevard Pinel
69677 Bron cedex

Résumé analytique

Enjeux de santé publique

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

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

Les axes majeurs de la mission du CNR sont :

- la participation active aux investigations épidémiologiques ce qui implique une amélioration du nombre de souches disponibles, l'amélioration du diagnostic des cas de légionellose notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires et le développement de nouvelles méthodes de typage ;
- l'identification de nouvelles sources potentielles de contamination ;
- une veille constante sur l'apparition de résistance des légionelles aux antibiotiques ce qui implique le développement de techniques notamment moléculaires permettant cette surveillance ;
- une meilleure compréhension par différentes approches de la part des différents facteurs (environnementaux, bactériens, liés à l'hôte) qui conduisent au développement et à la sévérité d'un cas de légionellose ;
- l'évaluation de l'apport des nouvelles technologies de séquençage haut débit (NGS) pour le diagnostic clinique, la recherche de variants résistants aux antibiotiques, et l'épidémiologie moléculaire par le séquençage de génome complet sera une des préoccupations importantes à venir.

Faits marquants en 2013

Une culture de prélèvements pulmonaires a été positive pour **25,6% des cas** diagnostiqués. Ce pourcentage qui reste insuffisant est en augmentation régulière depuis 2008.

En 2013 et comme les trois années précédentes, **aucune épidémie (10 cas et plus)** suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée. Au total, **68% des domiciles investigués** semblent être à l'origine de la contamination de cas isolés.
En 2013, une 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 Publique a été menée et est aujourd'hui disponible.

Alors que plus de 1700 Sequence Type (ST) sont répertoriés dans la base de données européenne, 50% des souches responsables d'infection humaine en France appartiennent à 7 ST. Parmi ceux-ci, 3 ST sont prédominants (**ST23, ST47 et ST1**). Deux approches ont été envisagées pour explorer ce point : (i) l'analyse à large échelle par séquençage haut débit de souches appartenant à ces 3 ST (en collaboration avec l'Institut Pasteur Paris, le Sanger Institute et le Public Health England (PHE)). L'analyse des données est en cours et les résultats seront disponibles en 2014 ; (ii) la recherche de facteurs d'hôte ou d'exposition

associée à ces clones. Une étude descriptive réalisée avec l'InVS montre principalement que les cas avec une souche ST1 surviennent plus fréquemment à l'hôpital ou chez des patients immuno-déprimés. Cette étude descriptive soulève plusieurs hypothèses qu'il faudra investiguer tant sur le plan environnemental que sur le plan des facteurs bactériens et des facteurs liés à l'hôte.

Développement d'une PCR biplex pour la détection de la résistance des légionelles aux macrolides. L'incidence évaluée sur plus de 500 souches de légionelles et 150 prélèvements pulmonaires apparaît faible puisqu'aucune résistance n'a été détectée. Cette PCR est actuellement disponible pour les patients en échec thérapeutique.

Transfert de la technique de spoligotypage, permettant un sous-typage des souches de *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 ST1/pulsotype Paris, d'une technique sur membrane avec un faible débit et une lecture qualitative manuelle vers une technique haut débit sur 2 plateformes Luminex avec une révélation quantitative automatisée.

Organisation du 3ème colloque national SympoLegio à Lyon en Novembre 2013 qui a accueilli plus de 200 participants issus de la santé publique, de la microbiologie clinique et environnementale et des sciences plus fondamentales.

Points clés

- sur le plan épidémiologique, aucune épidémie n'a été identifiée en 2013 ;

- la constante augmentation du nombre d'isolats cliniques disponibles est le reflet de l'amélioration des méthodes de culture utilisées par les laboratoires et de l'envoi plus systématique des prélèvements au CNR quand les méthodes ne sont pas disponibles dans les laboratoires ;

- une première détection mondiale d'un échec thérapeutique en lien avec une résistance aux fluoroquinolones a été décrite en 2013, nous incitant à rechercher une résistance aux anti-infectieux de façon plus systématique. Nous avons développé et disposons d'outils moléculaires notamment pour la détection de la résistance aux macrolides ;

- le développement de PCR spécifique de clone devrait participer à l'amélioration de la surveillance des légionelloses

- Avant propos

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

Table des matières

1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 8

2 ACTIVITES D'EXPERTISE 8

2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2013 8
2.1.1 Techniques développées ou en développement 8
2.1.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses : méthode, état d'avancement, principaux résultats 10
2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires 12
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE : EVOLUTIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES EN 2013 12
2.2.1 Souches d'origine clinique 13
2.2.2 Prélèvements pulmonaires 16
2.2.3 Confirmation de tests urinaires 17
2.2.4 PCR sur prélèvements pulmonaires 18
2.2.5 Souches d'origine environnementale 18
2.2.6 Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats 19
2.2.7 Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués 20

3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE 21

3.1 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS 21
3.1.1 Réseau de partenaires 21
3.2 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX 26
3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées 26
3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance 27
3.2.3 Résultats et analyse des tendances 27
3.3 PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE 27
3.3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS 27
3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens 31
3.4 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE 31

4 ALERTE 32

4.1 PROCEDURE D'ALERTE DE L'INVS ET DE LA DGS EN CAS DE DETECTION DE PHENOMENE ANORMAL ET EVENEMENTS AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE EN 2013 32
4.2 DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX 32

5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 33

5.1 ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS AUX PROFESSIONNELS DE SANTE, ACCUEIL DE STAGIAIRES 33
5.1.1 Accueil de stagiaires 33
5.1.2 Encadrement de thèses d'Université et Master Recherche en lien direct avec le CNR 33
5.1.3 Enseignements, formations aux professionnels de santé 34
5.2 GUIDES ELABORES 34
5.3 MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET PRODUCTION DU CNR 34
5.3.1 Rétro-information aux partenaires 34
5.3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, site internet 35
5.3.3 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...) 35
5.3.4 Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC…) ou internationale (OMS…) 36

6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR 36

6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS NOTAMMENT CELLES AYANT UN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR 36
6.1.1 Legionella et résistance aux macrolides 36
6.1.2 Legionella et peptides antimicrobiens 37
6.1.3 Séquençage massif de souches de Legionella 37
6.1.4 Sous typage de Legionella pneumophila 1 clone Paris (ST1) 37
6.1.5 Recherche de bio-marqueurs de virulence de Legionella pneumophila 38

6.2 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS REALISEES OU PREVUES EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR 38
6.2.1 Publications nationales ... 38
6.2.2 Publications internationales ... 39
6.2.3 Communications nationales ... 40
6.2.4 Communications internationales ... 41
6.2.5 Conférences sur invitations ... 42
7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX ... 42
8 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES ... 43

Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2007 – 2013. 13
Tableau 2. Evolution du nombre de souches d'origine clinique isolées en France depuis 2005 et répartition des isolements de légionelles par espèces et sérogroupes. 14
Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues les souches d'origine clinique. 14
Tableau 4. Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2013. 15
Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvement pulmonaire. 17
Tableau 6. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des *Legionella* isolées de prélèvements d'eau par le CNR. 19
Tableau 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérogroupe 1 parmi les 1180 souches isolées entre 2008 et 2013. 23
Tableau 8. Nombre de souches appartenant aux 17 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2013. 25
Tableau 9. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000. 28
Tableau 10. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2013. 29
Tableau 11. Résultats des investigations réalisées ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination. 29

Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de mise en culture et de Nested-SBT réalisée sur prélèvements pulmonaires au CNR. 16
Figure 2. Evolution du nombre de laboratoires nous envoyant des prélèvements pulmonaires pour investigation épidémiologique alors que la culture de *Legionella* est négative ou non réalisée. 17
Figure 3. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des souches *L. pneumophila* et non *pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2013. 18
Figure 4. Distribution en terme de sérogroupes des *L. pneumophila* adressées au CNR en 2013. 19
Figure 5. Evolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009 21
Figure 6. Pourcentage des cas de légionellose avec souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France. 22
Figure 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérogroupe 1 parmi les 1180 souches isolées entre 2008 et 2013 23
Figure 8. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes du CNR. 24
Figure 9. Evolution du pourcentage de souches présentant un pulsotype sporadique et un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes du CNR. 24
Figure 10. Distribution des différents ST de *L. pneumophila* sérogroupe 1 issus des 323 souches d'origine clinique analysées au CNR en 2013 (ST regroupant plus de 2 souches). 26

1 Missions et organisation du CNR

Les missions et organisation du CNR des légionelles sont détaillées en annexe. Les modifications importantes ayant eu lieu courant 2013 sont les suivantes.

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

- Sur le plan des personnels affectés au CNR :
    - Dominique Moret technicien 100% a cessé ses activités pour départ en retraite en novembre 2013. Un technicien 50% a été affecté au CNR en avril 2014 pour le remplacer.
    - Monique Reyrolle, ingénieur référente environnement depuis plus de 30 ans, a cessé ses activités (retraite) en septembre 2013. Ce départ, ajouté au départ en retraite de Françoise Forey (étude du lien de clonalité) en janvier 2014, a nécessité la réorganisation du CNR. Une technicienne a pris des responsabilités de technicienne référente en environnement. Christophe Ginevra a été nommé ingénieur des HCL début 2014 et a pour importante mission le développement du NGS appliqué aux thématiques du CNR.

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en Annexe.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2013

2.1.1 Techniques développées ou en développement

2.1.1.1 Transfert de la technique de sous-typage des Lp1 ST1/Paris par spoligotypage sur membrane vers une technologie Luminex

Nous avons transféré la technique de spoligotypage (sous-typage des souches de *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 ST1/pulsotype Paris) d'une technique sur membrane avec un faible débit et une lecture qualitative manuelle vers une technique haut débit sur 2 plateformes Luminex (L200® et MagPix®) avec une révélation quantitative automatisée (Cf. paragraphe 6.1.4)

2.1.1.2 Développement d'une PCR de détection de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides

A partir de mutants de *L. pneumophila* résistants aux macrolides sélectionnés *in vitro*, nous avons identifié les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance. Un niveau de résistance modéré à élevé est associé à des mutations (*single nucleotide polymorphisms*) affectant deux régions distinctes sur les gènes codant l'ARN ribosomal 23S (gène *rrn* présent en 3 copies chez *Legionella*) : nucléotides 2057-2058-2059 et 2611 (numération de *E. coli*). Nous avons développé une PCR biplex en temps réel avec des sondes *sloppy molecular beacons* ciblant les deux régions du gène *rrn* impliquées dans la résistance. Le décalage de la température de fusion du produit de PCR permet de détecter les mutations qui sont ensuite identifiées par séquençage. Cette PCR est applicable à la fois sur les isolats et sur les prélèvements cliniques, ce qui permet de s'affranchir de l'isolement des souches pour diagnostiquer une résistance aux macrolides. Cette PCR permet de détecter une résistance aux macrolides au sein d'une population hétérogène : présence de *Legionella* sensibles et résistantes et/ou *Legionella* possédant des copies du gène mutées et non mutées dans une proportion de 50%-50% pour la région 2057-2058-2059 et 10%-90% pour le nucléotide 2611.
Une résistance aux macrolides a été recherchée sur 537 souches et 145 prélèvements cliniques de patients atteints de légionellose. Nous n'avons pas détecté de résistance aux macrolides, ce qui suggère une faible incidence. Cette PCR reste néanmoins proposée en cas d'échec thérapeutique sous macrolide.
Ce développement a fait l'objet d'un mémoire qui sera présenté en mai 2014 en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM) par N. Jacotin. Une publication est en cours.

2.1.1.3 Evaluation de la technique de co-culture amibienne APT (*Amoebal Test Plate*) pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques

La technique de co-culture amibienne actuellement utilisée au CNR est une technique en milieu liquide. Notre objectif était de la faire évoluer vers une technique APT en milieu solide, réalisable en un seul temps à partir des prélèvements pulmonaires. Ce test combine la croissance des légionelles au niveau intracellulaire dans les amibes puis la croissance des légionelles sur le milieu solide BCYE en une seule étape. Un tapis d'amibes est réparti sur le milieu BCYE. Les légionelles sont déposées sur ce tapis et infectent les amibes. Une fois les amibes lysées par la multiplication des légionelles, ces dernières ont accès au milieu gélosé sur lequel elles peuvent croître et former des colonies.
Une mise au point de la technique APT sur des souches de référence et une première évaluation sur des prélèvements cliniques artificiellement contaminés par *Legionella* ont montré une sensibilité supérieure à la culture ainsi qu'un fort pouvoir décontaminant de la flore oro-pharyngée. L'évaluation sur une vingtaine de prélèvements cliniques congelés positifs en culture et/ou coculture en milieu liquide et/ou PCR, n'a cependant pas confirmé ces résultats préliminaires, en montrant une sensibilité inférieure à la culture.
Une évaluation prospective à plus grande échelle associée à des améliorations techniques est nécessaire afin d'envisager un transfert de la technique actuelle en milieu liquide vers un test APT.

Cette évaluation a fait l'objet d'un stage de deux mois à temps partiel et d'un mémoire d'une étudiante en Master 1 « Physiopathologie des maladies transmissibles », Université Claude Bernard, Lyon 1 (C. Kolenda).

2.1.1.4 Développement d'une PCR spécifique de la souche Lorraine (ST47)

La souche Lorraine (PFGE Lorraine, ST47) initialement isolée dans l'Est de la France est émergente depuis 2001 avec une distribution européenne (isolée dans 11 pays notamment Pays – Bas, Royaume-Uni) mais aussi mondiale (Canada). Elle est responsable en 2013 d'environ 8% des cas de légionellose diagnostiqués par culture en France.

Paradoxalement, cette souche est exceptionnellement isolée de l'environnement. Afin de détecter et identifier la souche Lorraine dans les prélèvements cliniques et environnementaux en s'affranchissant de la culture, une PCR spécifique de la souche ST47 a été développée.
Le génome de la souche ayant été entièrement séquencé, l'analyse de celui-ci en comparaison aux autres génomes séquencés (en collaboration avec l'IP Paris) a permis d'identifier 33 régions d'intérêt : 21 correspondant à des séquences codantes et 12 à des régions intergéniques. Après avoir testé les différentes cibles, une séquence intergénique de 146 pb a été retenue. Les amorces et une sonde Taqman spécifique ont été élaborées. Elles ont été évaluées sur 365 souches de *Legionella* et 16 souches non *Legionella*. La spécificité était de 89% avec une limite de détection de 2,36 UG/µL. Nous avons également évalué les performances de la PCR directement sur 99 prélèvements cliniques pour lesquels une souche et un typage moléculaire étaient disponibles. La PCR était positive sur les 6 prélèvements ST47 et négative pour 92/93 des prélèvements non ST47. Le prélèvement qui s'est avéré positif était associé à une souche ST109 qui a un PFGE Lorraine donc très proche.
En parallèle, l'équipe de Tim Harrison (PHA, Londres) a également développé une PCR spécifique du ST47. Nos deux équipes avaient choisi de façon indépendante la même cible, l'équipe de T. Harrison ayant choisi une séquence de 142 pb dans le gène adjacent. Nous avons convenu de collaborer et avons testé leurs amorces et sondes sur notre collection de souches. La spécificité évaluée sur les mêmes 365 souches de *Legionella* et 16 souches non *Legionella* était de 99,7%. Néanmoins la sensibilité apparaissait plus faible avec une limite de détection de 130 UG/µL. La PCR est en cours d'évaluation sur des prélèvements pulmonaires et environnementaux. L'un des objectifs est de détecter la source environnementale de ce clone non identifiée par culture et donc d'adapter les mesures de prévention.

2.1.1.5 Utilisation d'anticorps monoclonaux pour l'identification des sérogroupes de *L. pneumophila*

De nombreuses réactions croisées sont mises en évidence entre les sérogroupes de *L. pneumophila* lors de l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Ac du CNR ou Ac commercialisés ProLab). Nous avons validé l'utilisation au CNR des Ac monoclonaux distribués par Christian Lück (CNR Dresden, Allemagne) sur 16 souches de référence et une cinquantaine de souches sauvages. La technique d'immunofluorescence est actuellement pratiquée avec ces anticorps et ne montre pas de réactions croisées entre sérogroupes. Nous envisageons de transférer la technique IF vers une méthode ELISA.

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

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

Cette évaluation a été présentée à la RICAI 2013 (Paris), au SympoLegio 2013 (Lyon), au congrès *Legionella* 2013 (Melbourne) et sera présentée à l'ECCMID 2014 (Barcelone) sous forme de poster.

Les performances du test Sofia *Legionella* FIA sur urines concentrées et non concentrées ont été comparées à celles du test BinaxNOW® *Legionella* (Alere) utilisé au CNR sur urines concentrées. Les résultats sont les suivants :

		BinaxNOW® *Legionella* (urines concentrées)	
		-	+
Sofia *Legionella* FIA (urines non concentrées)	-	146	0
	+	4*	49

*Résultat négativé après chauffage

		BinaxNOW® *Legionella* (urines non concentrées)	
		-	+
Sofia *Legionella* FIA (urines non concentrées)	-	146	0
	+	6**	47

** Résultat négativé après chauffage pour 4 urines ; il s'agit donc de 4 résultats faussement positifs avant chauffage avec le test Sofia *Legionella* FIA. Pour 2 autres urines, les cas de légionellose ont été confirmés par le test urinaire Binax EIA et par PCR *Legionella* sur prélèvement respiratoire ; il s'agit donc de résultat faussement négatifs avec le test BinaxNOW® *Legionella* sur urines non concentrées. Les résultats sont positifs après concentration des urines.

Sur des urines non concentrées, le test Sofia *Legionella* FIA montre :

- une sensibilité supérieure au test BinaxNOW® *Legionella* sur urines non concentrées ;
- une spécificité inférieure au test BinaxNOW® *Legionella* avant chauffage des urines, et identique après chauffage.

La sensibilité du test Sofia *Legionella* FIA sur urines non concentrées est identique à celle du test BinaxNOW® *Legionella* sur urines concentrées.

La concentration des urines ne doit pas être réalisée avec le test Sofia *Legionella* FIA car elle diminue fortement la spécificité.

L'automatisation de l'étape de lecture permet d'éliminer toute subjectivité dans l'interprétation des résultats et offre une solution adaptée aux exigences de l'accréditation des laboratoires d'analyse médicale.

2.1.2.2 Evaluation du test immunochromatographique de NG Biotech pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*

En cours d'évaluation depuis la fin d'année 2013.

2.1.2.3 Evaluation du test immunochromatographique Bionexia *Legionella* (bioMérieux) pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*

En cours d'évaluation depuis la fin d'année 2013.

2.1.2.4 Evaluation du kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene)

Ce kit, commercialisé prochainement par BioMérieux, permet la détection de *L. pneumophila* par PCR en temps réel (sondes Taqman) à partir de prélèvements respiratoires. Ses performances ont été évaluées en comparaison aux résultats obtenus avec le kit actuellement utilisé au CNR (Diagénode, Dia-Lpn-050) pour la détection de *L. pneumophila*.
Un total de 275 échantillons respiratoires (principalement crachats et liquides broncho-alvéolaires) congelés et collectés dans le cadre de l'activité de routine du CNR ont été inclus dans cette étude.
Parmi ces 275 échantillons, 79 ont été sélectionnés comme positifs (culture positive de *L. pneumophila*) et 196 comme « tout venant » (détection des Ag urinaires négatifs ou sélection de prélèvements en absence de demande de diagnostic de légionellose).

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

		Kit Diagénode	
		+	-
Legio pneumo/Cc r-gene®	+	79	34
	-	1	161
		80	195

Une concordance entre les résultats obtenus par ces deux kits a été observée pour 240 prélèvements soit dans 87,3% des cas.

Sur les 275 échantillons testés, 35 présentaient des résultats discordants :

- 34 échantillons étaient positifs avec la trousse Legio pneumo/Cc r-gene® (CT>30) mais négatifs avec le kit Diagénode. Parmi eux, 14 ont été séquencés et caractérisés comme de vrais positifs, et 20 n'ont pu l'être en raison d'un signal de trop faible intensité ; on ne peut exclure de faux positifs, il s'agissait de prélèvements « tout venant » ;
- un échantillon était négatif avec le kit Legio pneumo/Cc r-gene® mais positif avec le kit Diagénode (avec un signal de faible intensité). Il n'a pu être séquencé pour confirmation du diagnostic.

Le kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene) montre de bonne performance en terme de sensibilité pour la détection de *Legionella pneumophila*. Du fait du nombre important de discordance entre les deux méthodes, une vigilance particulière devra être portée sur la spécificité du kit Legio pneumo/Cc r-gene® (Argene).

2.1.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Néant

2.2 Activités d'expertise : évolutions quantitatives et qualitatives en 2013

Le tableau 1 résume de façon chiffrée l'activité du CNR pour l'année 2013 et son évolution depuis 2007.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2007 – 2013.

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

* PCR *L. pneumophila*, *L.* non *pneumophila* et *L. pneumophila* sérogroupe 1.
** Pour des raisons de cohérence avec les données de l'InVS, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2013 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2013.
*** 489 souches ont été adressées par un laboratoire extérieur, 720 ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL.
**** 359 isolats cliniques (dont doublons) et 216 isolats environnementaux. Cette baisse du nombre de typage par PFGE est liée à la fin de deux études réalisées sur une large collection de souches.
***** 60 prélèvements étaient positifs pour au moins 1 gène.

2.2.1 Souches d'origine clinique

Parmi les 1262 cas notifiés en 2013, une souche a été isolée pour 323 cas, soit 25,6% (contre 23,7% en 2012) et analysée par le CNR. La majorité des souches (321/323 soit 99,4%) était des *L. pneumophila* et 305 (95%) appartenaient au sérogroupe 1 (Lp1).
Seize souches étaient des *L. pneumophila* non sg1 et deux des *L*. non *pneumophila* (tableau 2). Ces chiffres correspondent à la répartition des souches retrouvées chaque année depuis plusieurs années.

Parmi les Lp1, 94 (30,8%) étaient des souches endémiques dont 35 souches Louisa (10,8%), 27 souches Lorraine (8,3%) et 20 souches Paris (6,2%). Le fait le plus marquant et qui persiste depuis plusieurs années est la fréquence importante des souches appartenant au ST23 en France (voir chapitre 3.1.3).

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

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

* réactions croisées en immunofluorescence directe.

En 2013, les souches d'origine clinique nous sont parvenues de 119 villes en France, pour la grande majorité de laboratoires de Centres Hospitaliers. Ces données sont stables depuis 2011 (tableaux 3 et 4). L'isolement de souches d'origine clinique a concerné 71 départements.

Tableau 3. Couverture géographique d'où sont issues 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
2013	**323**	119

Tableau 4. Origine des laboratoires (ville) dans lesquels ont été isolées les souches d'origine clinique en 2013.

Villes	Nombre de souches	Villes	Nombre de souches
Aix-en-Provence	**1**	Lyon	**23**
Albertville	**1**	Marseille	**3**
Alençon	**1**	Martigues	**3**
Alès	**1**	Massy	**1**
Angers	**5**	Maxeville	**1**
Angoulême	**3**	Monaco	**1**
Argenteuil	**2**	Montauban	**1**
Arles	**1**	Montbéliard	**2**
Armentières	**2**	Montceau les Mines	**2**
Aubenas	**3**	Montélimar	**1**
Bastia	**1**	Montpellier	**2**
Bayonne	**1**	Mulhouse	**2**
Beauvais	**1**	Nancy	**7**
Belfort	**3**	Nantes	**3**
Bergerac	**1**	Narbonne	**1**
Besançon	**8**	Nevers	**1**
Béthune	**1**	Nice	**4**
Béziers	**3**	Orléans	**3**
Blois	**1**	Paris	**26**
Bordeaux	**1**	Pau	**1**
Bourg en Bresse	**3**	Périgueux	**1**
Bourgoin Jallieu	**1**	Perpignan	**1**
Brives	**1**	Poissy	**2**
Caen	**2**	Poitiers	**4**
Cahors	**1**	Pontarlier	**1**
Castres	**1**	Pontoise	**3**
Chalon sur Saône	**5**	Pringy	**6**
Chaumont	**1**	Provins	**1**
Clamart	**4**	Reims	**3**
Clermont Ferrand	**3**	Roanne	**5**
Colmar	**9**	Rodez	**4**
Colombes	**4**	Romans	**2**
Compiègne	**1**	Rouen	**4**
Contamine sur Arves	**1**	Saint Dizier	**1**
Creil	**2**	Saint Etienne	**3**
Créteil	**5**	Saint Laurent Du Var	**1**
Dieppe	**1**	Saint Malo	**1**
Dijon	**3**	Saint Mande	**1**
Douai	**2**	Saint Ouen	**5**
Draguignan	**2**	Saint Quentin	**1**
Dunkerque	**3**	Sallanches	**1**
Fontenay le Comte	**1**	Saverne	**3**
Fréjus	**3**	Selestat	**1**
Garches	**5**	Strasbourg	**6**
Gonesse	**1**	Thionville	**1**
Grenoble	**3**	Thonon les Bains	**1**
La Roche/Yon	**3**	Toulon	**1**
Laon	**1**	Toulouse	**5**
Lavaur	**1**	Tours	**9**
Le Coudray	**1**	Valence	**6**
Le Kremlin Bicêtre	**4**	Valenciennes	**1**

Le Mans	**3**	Vannes	**2**
Libourne	**1**	Verdun	**2**
Lievin	**1**	Versailles	**1**
Lille	**1**	Vesoul	**6**
Limoges	**1**	Vichy	**1**
Longjumeau	**2**	Vienne	**2**
Lons le Saulnier	**1**	Villefranche sur Saône	**4**
Lunéville	**1**	Villeneuve sur Lot	**2**

2.2.2 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 d'origine. L'évolution de ces envois est représentée en Figures 1 et 2.

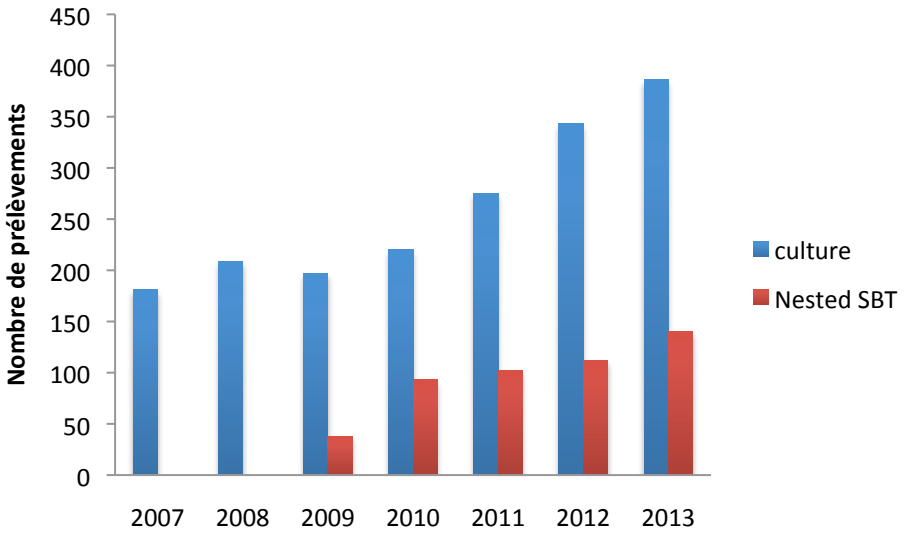


Figure 1. Evolution du nombre de mise en culture et de Nested-SBT réalisée sur prélèvements pulmonaires au CNR.

Depuis 2009, le nombre de laboratoires différents nous envoyant des prélèvements a plus que triplé (38 laboratoires hospitaliers différents en 2009 contre 116 en 2013). Cette augmentation est également nette entre 2012 et 2013 (85 en 2012 contre 116 en 2013).

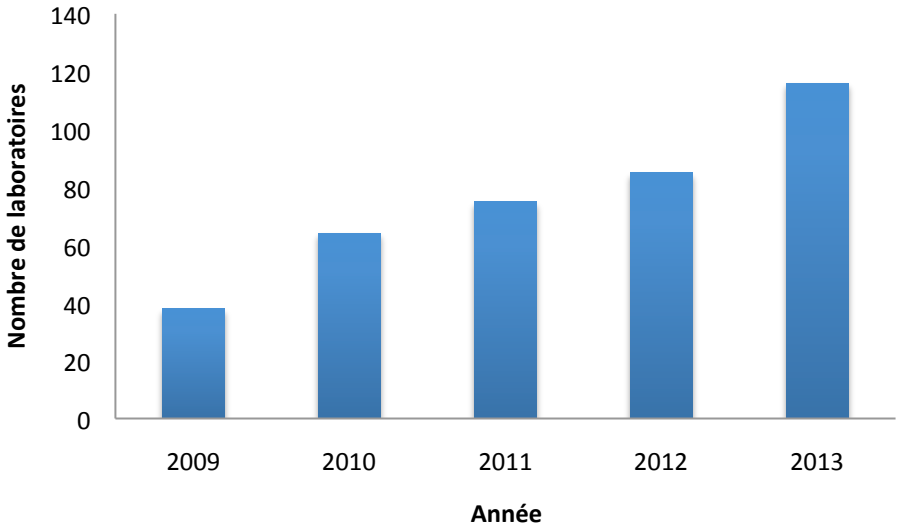


Figure 2. Evolution du nombre de laboratoires nous envoyant des prélèvements pulmonaires pour investigation épidémiologique alors que la culture de *Legionella* est négative ou non réalisée.

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

En 2013, 140 prélèvements ont été analysés par Nested SBT (Figure 1). Ces prélèvements appartiennent pour la plupart à des patients pour lesquels le diagnostic de légionellose a été posé par la détection d'antigènes urinaires.
Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 16 prélèvements. Pour 44 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié (Tableau 5).

Une absence d'amplification est observée pour 57% des prélèvements analysés, ce qui confirme la tendance déjà observée en 2012 (45% des cas en 2012). La technique utilisée au CNR pour le typage par Nested-SBT n'a pas été modifiée. La méthode Nested-SBT est utilisée lorsque la culture est négative. Nous avons amélioré la sensibilité de notre méthode culture utilisée au CNR depuis 2 ans suggérant que les prélèvements analysés par Nested SBT (culture négative) présentent un « taux » de légionelles très faible.

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par 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
2013	16	6	4	5	7	11	11	80	140

2.2.3 Confirmation de tests urinaires

En 2013, 16 urines testées avec différents kits mis sur le marché ont été reçues pour confirmation de positivité. Il s'agissait pour la plupart (15/16) de résultats faussement positifs. En effet, ces urines ont démontré un résultat négatif avec le test BinaxNOW® *Legionella*

(Alere) utilisé au CNR, confirmé par le test Binax™ EIA (Alere) après chauffage des urines. Un chauffage des urines (5 min, 100°C) est vivement recommandé afin de diminuer le nombre de résultats faussement positifs (négativation après chauffage).

2.2.4 PCR sur prélèvements pulmonaires

Parmi les 173 PCR *Legionella* réalisées, 25 ont été positives. Le diagnostic de 17 légionelloses à *L. pneumophila* et 8 *L.* non *pneumophila* a été posé par PCR. A noter que seules 2 souches de *L.* non *pneumophila* ont été isolées en France en 2013, la culture seule sous-estimant le nombre de cas à *L.* non *pneumophila*. Des méthodes sont en cours d'étude pour tenter d'identifier l'espèce de *Legionella* par biologie moléculaire en absence de souche, les méthodes utilisées actuellement n'étant pas très sensibles.

Afin de préciser le sérogroupe des *L. pneumophila* diagnostiqués par PCR, des PCR Lp1 ont été réalisées pour 7 de ces cas : 5 sont des cas à Lp1, 2 des cas à *L. pneumophila* sérogroupe non-1. La PCR Lp1 est réalisée depuis 2014 en systématique sur l'ensemble des PCR positives pour l'espèce *L. pneumophila* afin de préciser la prévalence des cas *L. pneumophila* sérogroupe non-1.

La PCR Lp1 a été positive pour 1 cas pour lequel les PCR Lp et L. spp étaient négatives. Ce résultat peut s'expliquer par la plus forte sensibilité de la PCR Lp1.

2.2.5 Souches d'origine environnementale

Parmi les 1209 souches d'origine environnementale identifiées au CNR en 2013, 489 souches ont été adressées par un laboratoire extérieur, et 720 ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL.

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

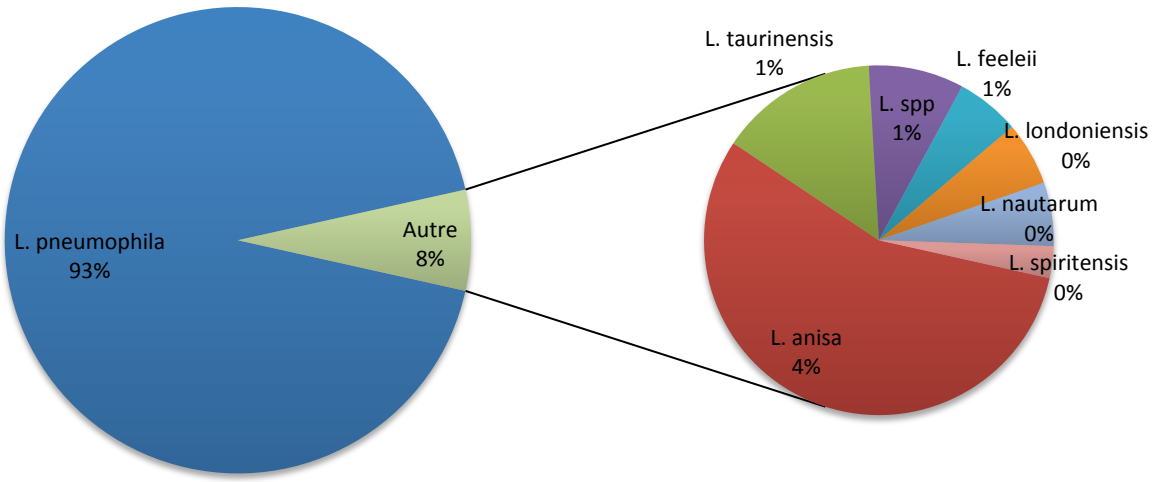


Figure 3. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des souches *L. pneumophila* et non *pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2013.

Sérogroupe *L. pneumophila*	Nombre de souches
1	276
2	11
3	30
4	1
5	8
6	30
8	18
9	2
10	26
12	9
13	1
14	2
RC	40
Total	**454**

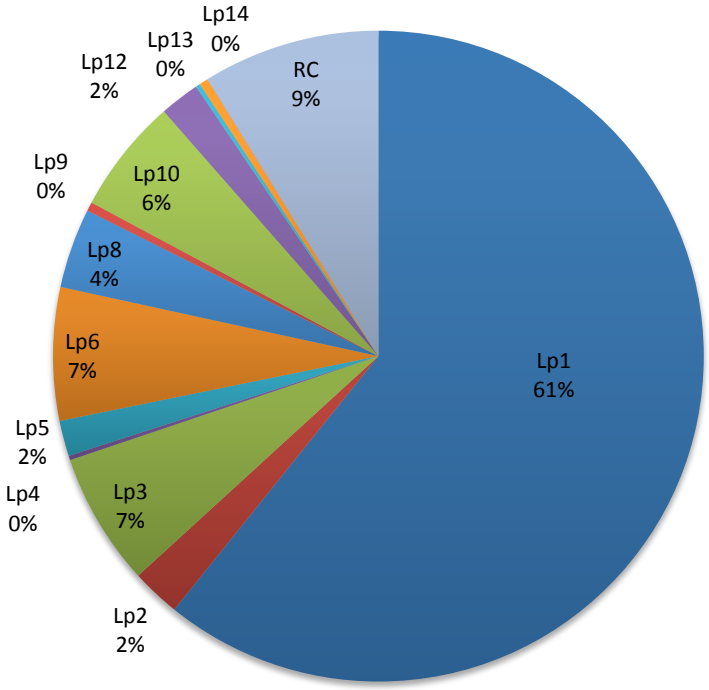


Figure 4. Distribution en terme de sérogroupes des *L. pneumophila* adressées au CNR en 2013.

Un total de 720 souches ont été isolées de prélèvements d'eau des HCL au CNR (Tableau 6).

Tableau 6. Distribution en terme d'espèces et de sérogroupes des *Legionella* isolées de prélèvements d'eau par le CNR.

Espèces de *Legionella*	Nombre de souches
L. anisa	304
L. fallonii	3
L. jordanis	5
L. micdadei	7
L. pneumophila	401
Total	**720**

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

En 2013, le CNR n'a répondu à aucune demande d'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour des souches cliniques ou environnementales.

Néanmoins, nous avons mis au point une PCR permettant de détecter la résistance aux macrolides (voir chapitre 2.1.1.2). Pour évaluer l'incidence de cette résistance, nous avons

testé 537 souches et 145 prélèvements pulmonaires. Aucune *Legionella* résistante aux macrolides n'a été mise en évidence. Une publication est en cours et une information à large échelle de la disponibilité de cette nouvelle méthode à nos correspondants est envisagée en 2014. Des communications à ce sujet ont déjà été faites notamment à la RICAI.

De plus, nous collaborons depuis plusieurs années avec le CHU de Grenoble (Max Maurin) pour la détection de la résistance aux fluoroquinolones par PCR. Cette méthode a été mise au point par le CHU de Grenoble ; nous pourrons proposer cette méthodologie à nos correspondants au cours de l'année 2014.

Les travaux réalisés ont permis de déposer un brevet : Max Maurin, Lubana Shadoud, Jean François Timsit, Dominique Schneider, Sophie Jarraud, Jérôme Etienne. Méthode de détection *in vitro* de souches de *Legionella pneumophila* résistantes aux antibiotiques. Demande de brevet en France n° 13/56225 déposée le 27 juin **2013** (IFB 13 BJ UJF EGIO/cgf-kb). Une publication collaborative est en cours.

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

- 5 souches sauvages *L. pneumophila* sg 6 et 5 souches sauvages *L. pneumophila* sg 7, Sam Dukan, CNRS UMR 7283, Laboratoire de Chimie Bactérienne, MARSEILLE
- souche *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 de référence Paris, Madame Iris GUILLOCHIN, Laboratoire SOCSA Analyse, 31 L'UNION
- 3 souches *Legionella fallonii*, 2 souches *Legionella hackeliae ,* 4 souches *Legionella pneumophila* de sg9, sg11, sg13 et sg indéterminé (14-15-9) Carmen Buchrieser, Institut Pasteur, PARIS
- 15 souches *L. pneumophila* sérogroupe 1 à 15, Olivier Challemel Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, PARIS
- 1 souche *L. pneumophila* sérogroupe 1 Lens, Dr. Cagla BOZKURT-GUZEL, Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Dept of Pharmaceutical Microbiology Beyazit, Istanbul, TURQUIE
- 3 échantillons de 1 mL d'urines avec détection positive d'antigènes urinaires *Legionella*, Pr. Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE, Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, 92110 CLICHY
- 11 souches *L. pneumophila* sérogroupes 2, 4 et de 7 à 15, Julien Verdon Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022 POITIERS
- distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à 31 laboratoires environnementaux dont 5 étrangers (Belgique, Hollande, Allemagne, Canada).

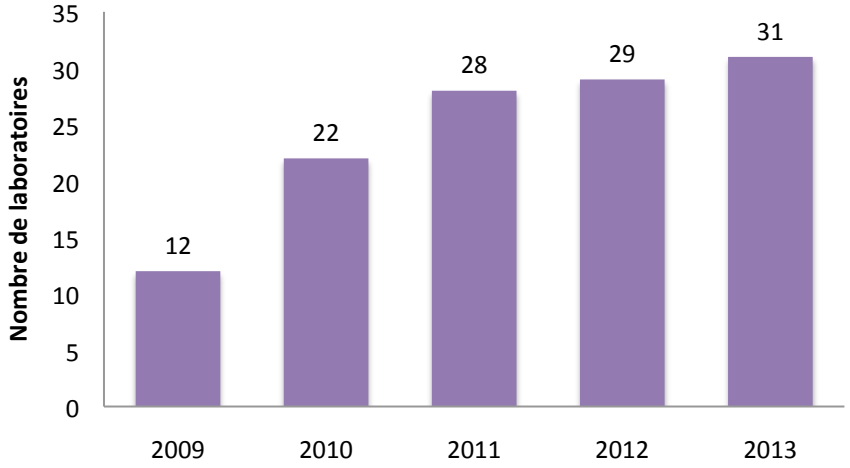


Figure 5. Evolution de la distribution de l'ADN étalon en nombre de laboratoires demandeurs depuis 2009

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.1.1 Réseau de partenaires

Nos partenaires sont l'InVS, les Agences Régionales de Santé (ARS), la Direction Générale de la Santé (DGS), le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, les Cellules Inter-Régionales d'Epidémiologie (CIREs), les Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL), les laboratoires de microbiologie de CHG et de CHU, les laboratoires d'analyses environnementales, les équipes d'hygiène opérationnelles (EHO) et les cliniciens.
En 2013, nous avons été en contact avec 180 correspondants de Centres Hospitaliers pour l'activité clinique et 70 correspondants pour l'environnement (laboratoires privés et CH). Le réseau couvre l'ensemble du territoire Français. Nous avons été en contact lors d'investigations de cas avec près de 20 ARS et Délégations Territoriales associées.
La couverture et la représentativité de ce réseau s'est nettement améliorée depuis la mise en place conjointement avec la DGS et l'InVS de fiches de demande de typage de souches environnementales envoyées d'une part par l'ARS et d'autre part par le laboratoire environnemental après accord de l'InVS (fiches disponibles sur le site internet du CNR).

3.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées

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

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

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

Enfin la méthode de spoligotypage permet de sous-typer les souches *L. pneumophila* sérogroupe 1 ST1/pulsotype Paris.

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

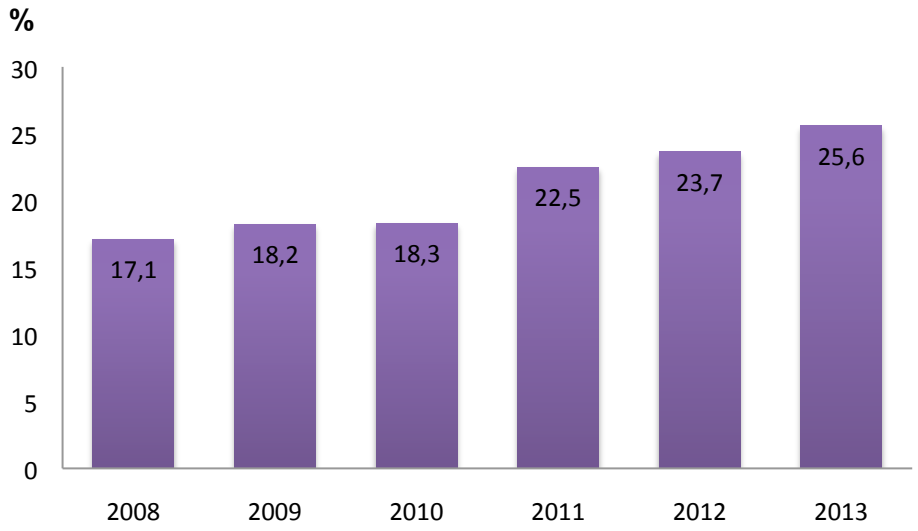


Figure 6. Pourcentage des cas de légionellose avec souche disponible parmi l'ensemble des cas notifiés en France.

En 2013, 575 souches (359 souches humaines (dont des doublons) et 216 souches environnementales) ont été analysées par PFGE, 419 par SBT (dont 49 souches environnementales) et 607 par anticorps monoclonaux (dont 237 souches environnementales).

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

- **Sous-groupage des souches *L. pneumophila* sérogroupe 1**

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

Tableau 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérogroupe 1 parmi les 1180 souches isolées entre 2008 et 2013.

Sous-groupe de Lp1	Nombre de souches	Pourcentage
France / Allentown	641	54,3%
Knoxville	247	20,9%
Benidorm	91	7,7%
Philadelphia	90	7,6%
Olda	60	5,1%
Bellingham	36	3,1%
Oxford	13	1,1%
Camperdown	2	0,2%
Heysham	0	0,0%
TOTAL	1180	100%

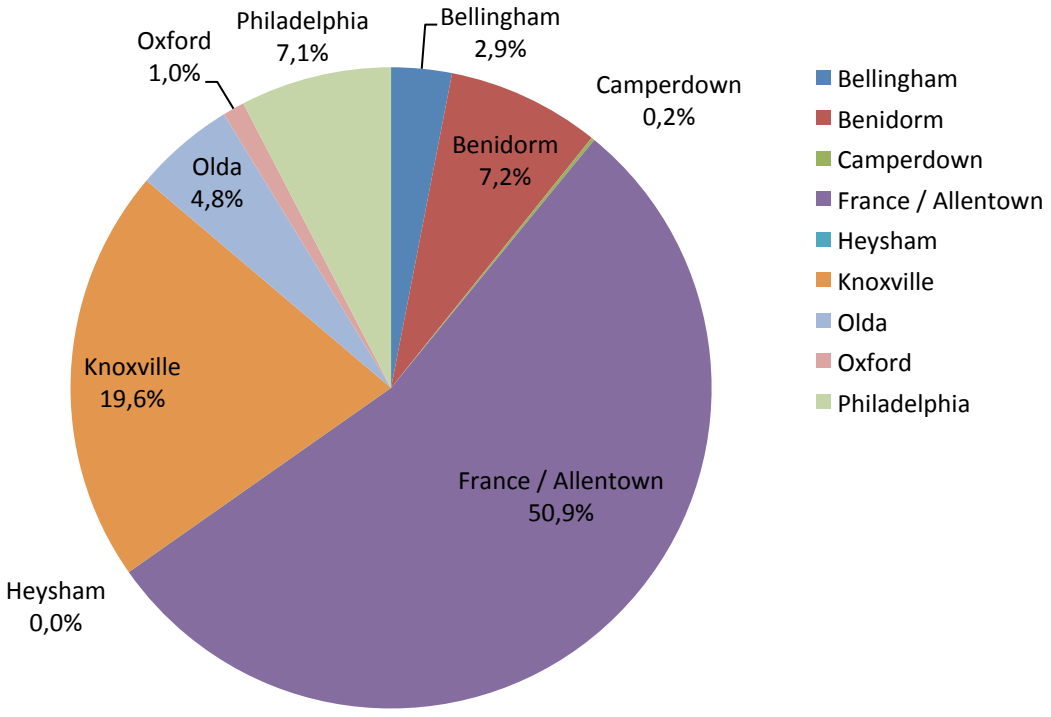


Figure 7. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérogroupe 1 parmi les 1180 souches isolées entre 2008 et 2013

- **PFGE**

L'analyse systématique par PFGE des souches d'origine clinique depuis 15 ans montre une diminution chaque année de la proportion de souches sporadiques par rapport à l'ensemble des souches analysées (Figures 8 et 9). Cette diminution est liée en grande part à l'augmentation du nombre de profils présents dans notre base de données.

La caractérisation du caractère « sporadique » d'une souche est exact lors de l'analyse et lors de la comparaison à la base de données mais évolue au cours du temps du fait de l'analyse des souches suivantes. Il est donc extrêmement difficile de mettre à jour ces

données. La méthode PFGE a surtout une grande utilité lors des investigations de cas car c'est la méthode la plus discriminante disponible. Pour l'analyse plus globale de la population des *Legionella* présentes en France, la méthode SBT est utilisée.

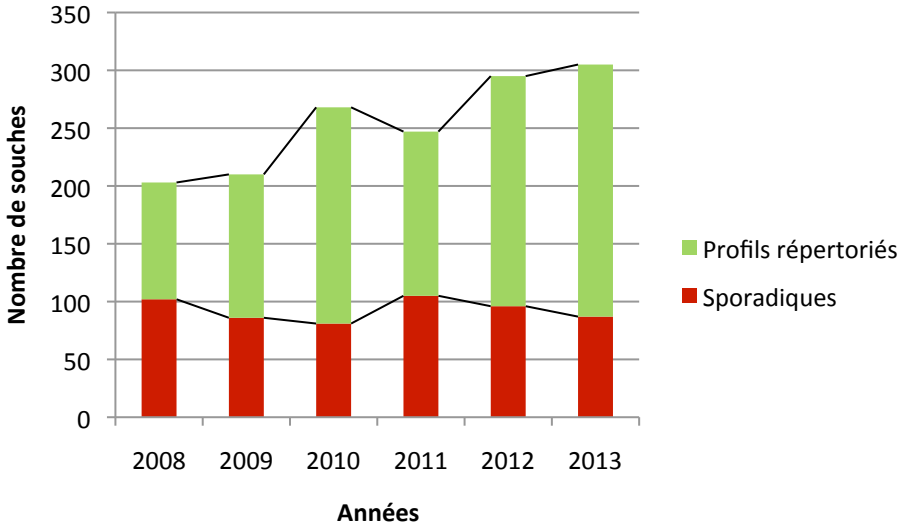


Figure 8. Evolution du nombre de souches présentant un pulsotype sporadique ou un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes du CNR.

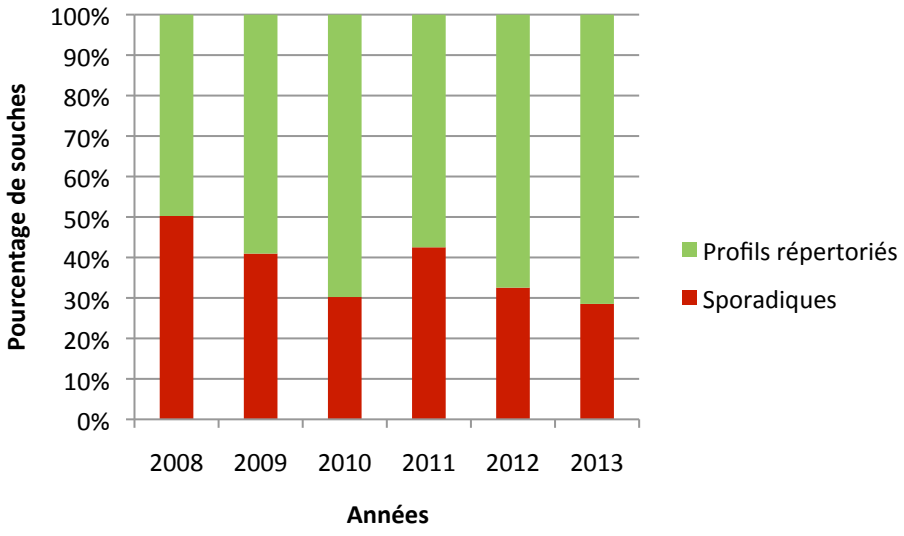


Figure 9. Evolution du pourcentage de souches présentant un pulsotype sporadique et un profil déjà répertorié dans la base de données de pulsotypes du CNR.

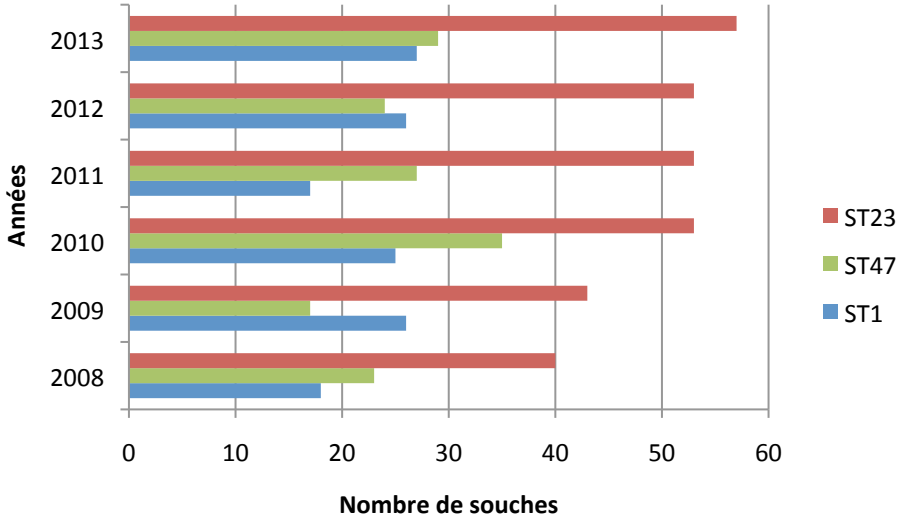
- **Sequence Based Typing (SBT)**

En 2013, l'ensemble des Lp1 étudiées appartenait à 75 Sequence Type (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans la figure 10**. Plus de 50% des souches appartiennent à 7 ST, les ST 23, ST 47, ST 1, ST 62, ST 146, ST 40, ST 42.**

L'analyse de la distribution des différents STs a été réalisée sur une période de 6 ans de 2008 à 2013 (Tableau 8).

Tableau 8. Nombre de souches appartenant aux 17 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2013.

ST	Années						TOTAL	%
	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
23	40	43	53	53	53	57	299	19,0%
47	23	17	35	27	24	29	155	9,9%
1	18	26	25	17	26	27	139	8,8%
62	5	10	13	16	11	18	73	4,6%
146	8	14	12	5	11	18	68	4,3%
82	6	4	9	17	10	7	53	3,4%
20	7	11	9	7	8	8	50	3,2%
259	4	4	14	2	17	7	48	3,1%
40	5	11	9	3	6	10	44	2,8%
42	1	3	4	4	9	10	31	2,0%
94	3	3	8	0	9	7	30	1,9%
701	0	6	4	5	5	9	29	1,8%
9	5	1	4	3	10	3	26	1,7%
444	4	2	4	5	6	4	25	1,6%
96	3	3	5	3	5	5	24	1,5%
48	2	5	2	8	3	3	23	1,5%
107	10	3	3	0	2	5	23	1,5%
Autres	64	55	62	73	87	92	433	27,5%
TOTAL	**208**	**221**	**275**	**248**	**302**	**319**	**1573**	**100,0%**



Fait marquant depuis quelques années : prédominance des souches ST 23.
Le fait le plus marquant et qui persiste depuis plusieurs années est la fréquence importante des souches appartenant au ST 23 en France (près de 20% de l'ensemble des souches). Les souches ST 23 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 ST 23 sont isolées de cas diagnostiqués sur l'ensemble du territoire français.

Un total de 519 souches d'origine clinique et 56 souches d'origine environnementale ST 23 a été déposé sur le site de typage européen par 19 pays européens et 3 pays non européens (USA, Japon et Israël) ; **presque 80% des souches ST 23** soit 406 souches d'origine clinique et 29 souches d'origine environnementale 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 déposent de façon régulière leurs souches d'origine clinique et (ii) ce chiffre de 80% apparaît important.

Le séquençage d'une trentaine de souches ST 23 et de souches de complexes clonaux proches est en cours en collaboration avec Carmen Buchrieser (Institut Pasteur Paris), J. Parkhill (Sanger Institute, UK) et T. Harrison (Health Protection Agency, UK) (voir chapitre 6.1.3). Une étude spécifique sur ces souches ST 23 a été réalisée avec l'InVS (voir chapitre 3.3.1.4).

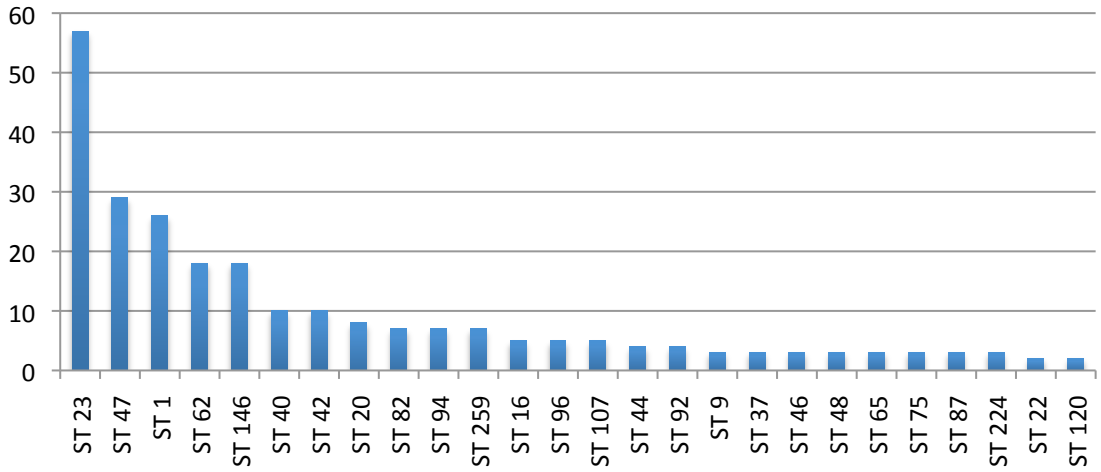


Figure 10. Distribution des différents ST de *L. pneumophila* sérogroupe 1 issus des 323 souches d'origine clinique analysées au CNR en 2013 (ST regroupant plus de 2 souches).

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

3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Aucune souche clinique ou environnementale résistante aux antibiotiques n'ayant été décrite jusqu'à présent, *Legionella* est définie comme constamment sensible aux antibiotiques (macrolides, fluoroquinolones, rifampicine). Cependant, exceptionnellement, des échecs thérapeutiques chez des patients sous antibiothérapie peuvent motiver une demande d'antibiogramme. Parallèlement, des antibiogrammes peuvent également être réalisés sur des souches environnementales puisque certains environnements aqueux (eaux de pisciculture, effluents) sont connus pour contenir des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques.

La détermination de la sensibilité des souches cliniques et environnementales de *Legionella* n'est pas réalisée systématiquement au CNR. Cependant, une veille constante sur l'apparition de résistance apparait nécessaire. Le CNR dispose ainsi de techniques permettant cette surveillance.

3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Aucune méthode de référence pour la réalisation des antibiogrammes de *Legionella* n'est actuellement définie.
Depuis 2009, le CNR dispose de techniques phénotypiques de détection de la résistance :
- méthode extracellulaire par microdilution en plaques multi puits, permettant de déterminer les CMI des antibiotiques ;
- méthode intracellulaire sur lignée monocytaire permettant de déterminer les CMIE.

Une résistance est définie par une augmentation significative des CMI ou CMIE des antibiotiques de la souche testée par rapport aux CMI ou CMIE définies pour la souche de référence Paris.
Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche de légionelles, nous avons souhaité développer des méthodes moléculaires de détection de résistance.
En 2013, nous avons déterminé les mécanismes moléculaires de la résistance aux macrolides à partir de lignées de *Legionella* sélectionnées *in vitro* en laboratoire L3. Ces travaux nous ont permis de développer une PCR en temps réel ciblant les mutations ribosomales associées à un haut niveau de résistance aux macrolides.
Un travail superposable réalisé en collaboration avec le CHU de Grenoble nous permettra prochainement de disposer également d'une PCR ciblant l'ADN gyrase et détectant la résistance de *Legionella* aux fluoroquinolones.
Une résistance est définie par la présence d'une mutation sur l'ADN amplifié, connue pour être associée à un haut niveau de résistance aux macrolides / fluoroquinolones.

3.2.3 Résultats et analyse des tendances

Aucune résistance aux macrolides n'a pour le moment été décrite sur les 537 souches et 145 prélèvements cliniques testés au CNR, suggérant une implication faible de ces mécanismes dans les échecs thérapeutiques.
Cependant, la première description d'un cas d'échec thérapeutique en lien avec une résistance aux fluoroquinolones (Shadoud *et al.*, congrès *Legionella*, Melbourne, 2013) nous incite à rechercher une résistance aux anti-infectieux de façon plus systématique.
Une PCR détectant la résistance aux macrolides sera donc réalisée sur toutes les souches cliniques et tous les prélèvements adressés au CNR.

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

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

3.3.1.1 Périodicité

Les échanges avec l'InVS sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, fax, courriers postaux) et ont pour objectifs :
- de valider les cas de légionellose posant problème ;
- de s'informer des investigations en cours (résultats de typage, prélèvements adéquates à réaliser, etc) ;
- d'élaborer de nouvelles études ou analyses communes.

3.3.1.2 Echanges de données

- Notification du CNR à l'InVS des diagnostics par culture (par 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 souche(s) clinique(s) isolée(s) et de la (des) souche(s) environnementale(s). Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.

- Un fichier Excel commun a été mis en place permettant d'associer des données du CNR et de l'InVS. Chaque fin d'année, les données de ce fichier concernant les cas de légionellose validés par l'InVS et le CNR sont 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 2013, dans le cadre du diagnostic des cas de légionellose et de l'investigation de cas, plus de 557 courriers personnalisés ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à l'InVS (soit une augmentation de 23% par rapport à 2012).

3.3.1.3 Analyses communes

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

En 2013, **des investigations environnementales** à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **51 cas** sporadiques. Parmi les 1262 cas de légionellose diagnostiqués en 2013 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2013), **25,6 %** ont été diagnostiqués par une **culture positive**. La comparaison entre souches environnementales et souches cliniques a été réalisée dans **4 %** de l'ensemble des cas et **16,7 %** 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
2013	**55**	**30**	**55**
Total	625	343	55

Un total de 55 investigations a été réalisé pour 51 cas. La souche clinique a pu être comparée aux souches environnementales isolées d'un lieu fréquenté par le malade, et pour 30 cas (55%), les profils génomiques des souches se sont révélés identiques.

Pour ces cas, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que les réseaux d'eaux sanitaires étaient la source de contamination la plus probable pour 9 hôpitaux, 13 domiciles, 3 établissements de tourisme et 5 autres établissements.

Tableau 10. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2013.

	Investigations positives		Investigations négatives		Total des investigations*	
	N	*%*	N	*%*	N	*%*
Domicile	13	*68*	6	*32*	19	*35*
Tourisme	3	*50*	3	*50*	6	*11*
Hôpitaux	9	*82*	2	*18*	11	*20*
Autre	5	*71*	2	*29*	7	*13*
Tar	0	*0*	12	*100*	12	*22*
TOTAL	30	*55*	25	*45*	55	*100*

* Pour 1 cas, plusieurs investigations ont été réalisées

Au total,

- **parmi les domiciles investigués, 68% semblent être à l'origine de la contamination ;** ce chiffre est similaire à 2012 ;
- **parmi les hôpitaux investigués, 82% semblent être à l'origine de la contamination ;** ce chiffre est en augmentation par rapport à 2012 (54%) ; quatre cas sur 11 sont dus à des souches Paris (ST1).

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

		Profil souches cliniques / environnementales						
		identique						différent
	total	Autres	Paris	Louisa	Lorraine	Mondial	Biarritz	
Domicile	19	8	3	1	0	1	0	6
Tourisme	6	1	2	0	0	0	0	3
Hôpitaux	11	5	4	0	0	0	0	2
Autre	7	1	0	2	0	0	2	2
Tar	12	0	0	0	0	0	0	12
TOTAL	55	15	9	3	0	1	2	25

3.3.1.4 Etudes collaboratives

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

L'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses), le CNR des légionelles et l'InVS ont été chargés par la Direction énérale de la santé (DGS) de conduire une étude visant à apprécier le lien entre l'exposition aux retombées des panaches émis par les 28 grandes Tours aéro-réfrigérantes (Tars) des 11 Centres nucléaires de production électrique (CNPE) d'Electricité de France (EDF) contrôlées par l'Agence de Sûreté Nucléaire (ASN) et la survenue de cas de légionellose à proximité de ces installations.

Cette étude a nécessité une collaboration étroite entre l'Anses, le CNR-L, l'InVS et 18 ARS. L'étude a porté sur une période de 3 ans (2010-2012) au cours de laquelle 98 cas ont été inclus dans l'étude.

Le CNR a analysé un total de 1281 souches environnementales, près de 900 souches ont été typées par PFGE, 120 souches par SBT et 700 par anticorps monoclonaux.

Les résultats de cette étude seront publiés sur le site de l'Anses et de l'InVS au 2ème trimestre 2014.

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

Les cas de légionellose à Lp1 déclarés entre 2008 et 2012, pour lesquels une souche a été isolée, ont été inclus dans notre étude. Une analyse multivariée par régression de Poisson a permis de calculer des Incidence Rate Ratio (rapports de taux d'incidence) et d'identifier des caractéristiques clinico-épidémiologiques spécifiquement associées à un ST. La répartition géographique des cas a également été étudiée en prenant comme répartition les 5 régions définies par des les indicatifs téléphoniques. Nous avons choisi de comparer le clone ST23 à chacun des 3 autres groupes ST1, ST47 et autres ST.

Au total, 1192 patients ont été inclus dans l'étude et les souches isolées étaient respectivement du ST1 (n=109), ST23 (n=236), ST47 (n=123) ou d'un autre ST (n=724). Comparé aux souches ST1, le profil ST23 était associé significativement à l'absence de traitement par corticoïdes (IRR=0,56 ; p=0,016) et à des infections communautaires (IRR infection nosocomiale = 0,32 ; p=0,001). Par contre, le génotype ST23 était associé significativement à des infections nosocomiales et en maison de retraite en comparaison aux souches ST47. Par rapport au groupe des autres ST, les souches ST23 étaient, statistiquement non associées aux cas liés à un voyage (IRR=0,66 ; p=0,023). Concernant la répartition géographique des cas, les 3 ST majoritaires présentent des profils différents : les cas ST1 sont principalement observés en Ile de France alors que les cas ST23 sont retrouvés sur l'ensemble de la France mais avec une prédominance dans le nord-est et le sud-est. Les cas ST47 sont, eux, majoritaires dans les régions du nord-est. Les différences observées étaient statistiquement significatives.

Malgré de nombreux cas de légionellose à Lp1 ST23, ceux-ci ne se révèlent pas significativement associés à un facteur de risque particulier comparés aux autres ST. Cette étude confirme le fait que les infections à Lp1 ST1 surviennent plus fréquemment à l'hôpital ou chez des patients immuno-déprimés comme observé dans d'autres études.

Cette étude descriptive soulève plusieurs hypothèses qu'il faudra investiguer. Sur le plan environnemental, la description de la distribution des souches ST1 peu connue actuellement paraît importante (hôpital *versus* hors hôpital) pour vérifier que ce clone n'est pas adapté aux environnements hospitaliers. Sur un plan plus physiopathologique, il faudra vérifier si des facteurs bactériens particuliers du ST1 pourraient être plus adaptés à certaines caractéristiques d'hôte.

3.3.1.5 Publications communes en 2013

- Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.

- Campese C, Le Strat Y, Cassier P, Che D,, Jarraud S. Epidemiological characteristics associated with specific sequence types ST1, ST23, ST47 of Legionnaires' disease cases in France, 2008-2012. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella,* October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.

- Campese C, Jarraud S, Forey F, Che D. Clusters of travel associated Legionnaires' disease in France; 2001-2012. Communication orale, 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.

3.3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Le CNR collabore au réseau européen de surveillance des légionelloses ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Le CNR participe tous les ans aux réunions et aux activités de ce réseau.
- 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 2013, les données de **344** souches ont été renseignées, correspondant à 317 souches de patients, 27 souches environnementales. Au total, les données de **2270** souches ont été renseignées sur le site.
- Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen
- Coordination avec Valeria Gaia (Suisse) d'une étude européenne sur l'évaluation des kits pour la détection des antigènes urinaires (groupe de travail, Soren Uldum, Tim Harrison). Cette étude sera proposée au prochain congrès ELDSNet / ESGLI à Barcelonne.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- 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 2.1.1.4.

- Analyse des **facteurs de risque** (facteurs d'hôte, exposition) **associés aux trois génotypes** principaux (ST23, ST1, ST47). Voir chapitre 3.3.1.4.

- **Intérêt de la PCR quantitative *Legionella* comme marqueur pronostique.**
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 pronostique de cette infection (dépôt d'un projet PHRC).

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

Objectifs : Identifier les facteurs d'adaptation chez le patient d'une souche de *L. pneumophila* et confronter ces données à celles de la littérature obtenues *in vitro*. Nous disposons au laboratoire de 17 isolats d'un même patient, isolés sur une période de 6 semaines. Le séquençage du génome complet de ces 17 souches nous permettra de déterminer des marqueurs d'adaptation de la bactérie sélectionnés chez ce patient. Ces données seront comparées aux résultats obtenus *in vitro* par Ensminger *et al*. après évolution de la bactérie dans une lignée cellulaire de macrophages. Chez le patient, la bactérie a été soumise à une pression de sélection antibiotique. Le séquençage du génome des isolats tardifs nous permettra peut-être de mettre en évidence des marqueurs de résistance aux antibiotiques utilisés au cours du traitement.

Partenaires : Le séquençage de ces souches serait réalisé en partenariat avec la plateforme de séquençage des Hospices Civils de Lyon.

Etat d'avancement & principaux résultats : Projet déposé pour une demande de financement à la Cellule Recherche & Développement du PAM Biologie et Anatomie Pathologique des Hospices Civils de Lyon.

4 Alerte

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

L'alerte de l'InVS est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Didier Che et Christine Campese. La DGS est alertée par courrier électronique adressé à Monsieur Yannick Pavageau (à compter du 1er Janvier 2014, le nouveau Référent légionelles à la DGS est Romain Boissonnot)

Aucune alerte n'a été lancée en 2013.

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

En 2013 et comme les trois années précédentes, aucune épidémie (10 cas et plus) suggérant une source commune de contamination n'a été identifiée.

- **Investigation de 2 cas de légionellose à Vesoul**

Des cas de légionellose chez deux frères âgés de 75 et 76 ans nous ont été signalés par l'ARS de Franche Comté, Délégation Territoriale de Haute-Saône (70) en février 2013. Les souches de *L. pneumophila* sérogroupe 1 isolées des aspirations bronchiques réalisées chez ces patients ont été comparées à une souche isolée au niveau du robinet de lavabo de la salle de bains d'un des patients. Toutes présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE sporadique identique, ST 23, sous-groupe France/Allentown.
Les quatre prélèvements réalisés au niveau du matériel d'aérosolthérapie d'un des patients n'ont pas permis d'isoler de souche de *Legionella*. Par ailleurs, la nested-SBT réalisée sur l'un des quatre prélèvements n'a permis aucune amplification génique.

Cette investigation a permis de confirmer le caractère groupé des cas et d'identifier le domicile d'un des patients comme source de contamination.
Bien que le matériel d'aérosol thérapie n'ait pas été identifié comme source de contamination dans cette enquête, nous soulignons l'importance de nous adresser ces prélèvements (eau restante, masque de l'appareil, réservoir) pour la réalisation d'investigations épidémiologiques.

- **Investigation *a posteriori* d'un cas de légionellose diagnostiqué à Soulac sur Mer en 2012**

Suite au signalement de la présence de *Legionella pneumophila* dans le réseau d'eau chaude sanitaire d'une résidence à Soulac sur Mer en 2013, nous avons comparé la souche à d'autres souches environnementales isolées dans la même ville (autre résidence et réseau d'eau chaude sanitaire de la ville) en 2004 et à une souche isolée en 2012 chez une patiente âgée de 61 ans (cas signalé par l'ARS Aquitaine).
Les souches cliniques et environnementales présentaient les mêmes caractéristiques : profil PFGE identique, ST 42, sous-groupe France/Allentown.

Cette investigation n'a pas permis d'identifier avec précision le point de contamination de la patiente. Elle montre cependant la persistance de la colonisation du réseau d'eau chaude de la ville par la même souche *L. pneumophila* entre 2004 et 2013.

- **Bilan des investigations par spoligotypage**

En 2013, le CNR a utilisé la technique de spoligotypage (permettant de sous typer les souches ST1/pulsotype Paris) dans le cadre de 7 enquêtes (6 françaises et 1 suisse). Cette technique n'est actuellement disponible qu'au CNR. Les souches isolées des sources présumées de contamination présentaient des spoligotypes identiques à ceux des patients pour les 6 enquêtes françaises, ce qui a permis de confirmer l'identification de la source de contamination. En revanche, dans l'investigation suisse, les isolats environnementaux présentaient des spoligotypes différents de ceux des souches cliniques, ne permettant pas de confirmer la source de contamination.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

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

5.1.1 Accueil de stagiaires

- Mireille Favard, Laboratoire Charles Nicolle Environnement de Casablanca, Maroc : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la surveillance environnementale des légionelles par culture selon la norme NF T90-431.
- Souad Silhadi, Centre Hospitalier d'Aix-les-Bains : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la surveillance environnementale des légionelles, 5 juin 2013
- Pascale Pricaz, Centre Hospitalier d'Aix-les-Bains : stage dans le cadre d'une démarche d'accréditation pour la surveillance environnementale des légionelles, 5 juin 2013
- Nathalie Jacotin, stagiaire ingénieur CNAM : développement d'une PCR de détection de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides, de septembre 2013 à juin 2014 (voir paragraphe 2.1.1.2)
- Camille Kolenda, Master 1 « Physiopathologie des maladies transmissibles », Université Claude Bernard Lyon 1 : évaluation de la technique de co-culture amibienne APT (*Amoebal Test Plate*) pour l'isolement de *Legionella* à partir de prélèvements cliniques, avril à juin 2013 (voir paragraphe 2.1.1.3)
- Thomas Berger, Master professionnel « Management des biobanques », Université Catholique de Lyon : mise en place de la base de données Bionumerics, juin à août 2013.

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

- Ghislaine Descours : *Legionella pneumophila* et macrolides : de l'antibiogramme à la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance (S. Jarraud, co-encadrant C. Ginevra) (novembre 2011 – décembre 2013)
- Emilie Talagrand : Résistance de *Legionella pneumophila* à la cathélicidine humaine LL-37 (Juin 2013)

5.1.3 Enseignements, formations aux professionnels de santé

- Impact de la surveillance des cas de légionellose sur la compréhension de la maladie, réunion scientifique, Centre de Biologie Est, Groupe Hospitalier Est, Lyon, février 2013 (1h)
- *Legionella*, aspect diagnostique et épidémiologique, cours de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris (2h)
- Module de formation "Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses" organisée à l'InVS, Château de Vacassy, Hôpital Saint Maurice (1h)

5.2 Guides élaborés

- Risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion. Haut Conseil de la Santé Publique (11 juillet 2013). Actualisation des recommandations relatives à la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de légionellose ou face à une contamination environnementale. Diffusion du guide sur le site en ligne du HCSP. (http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspr20130711_risqlegionnelguideinvestigation.pdf)

- Deux chapitres d'ouvrages publiés dans *Methods in Molecular Biology* relatifs aux méthodes recommandées pour l'identification de *Legionella* dans les prélèvements cliniques (PCR, antigènes urinaires, culture) et le typage des *Legionella* :
  - Chapitre "Identification of *Legionella* in Clinical Samples" de la revue Methods in Molecular Biology. 2013, S Jarraud, G Descours, C Ginevra, G Lina and J Etienne.
  - Chapitre. "Typing methods for *Legionella*" de la revue Methods in Molecular Biology. 2013, Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG Methods Mol Biol. 2013;954:119-48.
  - Chapitre "Molecular typing of *Legionella*" du livre "Molecular typing of bacteria", Humana press, 2013, C Ginevra.

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

5.3.1 Rétro-information aux partenaires

- Site web : le CNR dispose d'un site web (http://cnr.univ-lyon1.fr) et d'un site spécifique dédié à l'étalon ADN en français et en anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon (voir ci-dessous).

- Les données de surveillance peuvent être publiées en collaboration avec d'autres institutions notamment l'InVS dans des journaux internationaux à comité de lecture :
  - Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.

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

5.3.2 Diffusion aux professionnels : conférences, site internet

- Congrès Français : Organisation du SympoLegio 2013, Lyon, 26 et 27 Novembre **2013** (200 participants) (Programme en annexe 7).

- Une conférence Formation médicale continue sur « Les dix erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des légionelloses » (RICAI, 21-22 Novembre 2013) a permis de sensibiliser de nombreux bactériologistes sur les points critiques notamment aux tests de détection des antigènes dans les urines, à la PCR et à la culture de prélèvements pulmonaires 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Plusieurs microbiologistes nous ont contacté suite à cette formation.

- Le site internet pour le Centre National de Référence des Légionelles est hébergé par le serveur de l'Université Claude Bernard Lyon 1 : cnr-legionelles.univ-lyon1.fr
La version de la plateforme a évoluée en 2013. Le portail des CNR (cnr.univ-lyon1.fr) comprends le CNR des staphylocoques, le CNR des légionelles, un site dédié à l'ADN étalon de *Legionella* (Legionelles ADN étalon) et ce même site en langue anglaise (*Legionella* standard DNA). Il propose des informations sur le fonctionnement et les activités du CNR (prélèvements analysés, techniques utilisées,…), les fiches téléchargeables pour l'envoi d'échantillons et les modalités d'envoi ainsi que des informations ponctuelles (enquêtes en cours ou symposium).
Le rythme des actualisations dépends de l'actualité mais une révision est prévue au minimum 1 fois par an. Le site sera révisé avant l'été 2014. Le dernier rapport d'activité mis en ligne est le dernier : rapport d'activité 2012.

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

- Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne de 1 à 10 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes (conseil diagnostique, thérapeutique, typage) et ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage, conseil). Les appels téléphoniques sont redistribués en fonction des demandes par les secrétaires. Les spécificités des correspondants (aspect diagnostic clinique, lien de clonalité, environnement…) et leurs coordonnées sont indiquées sur les lettres de rendu de résultat ou au niveau du site internet. Depuis 2014, les appels téléphoniques sont consignés dans un fichier informatique Excel disponible pour chaque acteur du CNR qui annote les coordonnées du correspondant, le message/demande et l'action entreprise. Ce fichier n'existait pas en 2013.

- Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation. Près de 600 courriers postaux ont été envoyés. A ces courriers sont le plus souvent doublés, si une demande d'investigation a été faite, d'un message électronique résumant les résultats.

- Glossaires envoyés avec les courriers de résultats explicitant les méthodes de typage des souches employées et les souches endémiques décrites

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

- 2010 - 2013 : Membre du comité de pilotage (COPIL) de l'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, en collaboration avec l'ANSES et l'InVS (S. Jarraud).

- 2012 - 2013 : Membre du groupe de travail du Haut Conseil de la Santé Publique – commission spécialisée Maladie transmissibles : révision du guide d'aide à l'investigation des cas de légionellose (S. Jarraud)

- Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010)

- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : Détection des *Legionella* – méthode alternative, AFNOR T90E, Norme XPT 90-471 puis NFT 90-471 (Maud Baume)

- Membre de la commission AFNOR de Normalisation : NF T90-431 Septembre 2003 : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation (Monique Reyrolle puis Maud Baume)

- Sur un plan plus recherche, membre de l'«International Scientifique Programme Committee », 8th international Conference on *Legionella*, 29 Oct – 1 Nov 2013, Melbourne, Australie (S. Jarraud)

- Modératrice : Congrès International de la Bio-Surveillance de l'environnement, Casablanca, Maroc, 24-26 Octobre 2013 (S. Jarraud)

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

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

6.1.1 *Legionella* et résistance aux macrolides

Objectifs : évaluer l'incidence de la résistance aux macrolides chez *Legionella* et son impact dans les échecs thérapeutiques.

Etat d'avancement & principaux résultats : A partir de mutants de *L. pneumophila* résistants aux macrolides sélectionnés *in vitro* en laboratoire, nous avons identifié les mécanismes moléculaires impliqués dans cette résistance puis développé une PCR biplex en temps réel ciblant les régions du gène *rrn* impliquées dans la résistance. Cette PCR est applicable à la fois sur les isolats et sur les prélèvements cliniques et permet de détecter une résistance aux macrolides au sein d'une population hétérogène. Nous n'avons pas détecté

de résistance aux macrolides sur les souches et prélèvements testés, ce qui suggère une faible contribution dans les échecs thérapeutiques.

6.1.2 *Legionella* et peptides antimicrobiens

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

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

Etat d'avancement & principaux résultats : Les résultats préliminaires de cette étude montrent une différence de sensibilité des différents isolats à certains peptides antimicrobiens, allant jusqu'à une résistance totale de certaines souches. Il ne semble pas y avoir de lien entre le sérogroupe de la souche et sa sensibilité aux peptides antimicrobiens humains. Une des étapes ultérieures est d'étudier s'il existe une corrélation entre la production de PAM au cours de l'infection dans les poumons de patient, la sensibilité aux PAM de la souche isolée et la sévérité de l'infection (demande de PHRC national en cours).

6.1.3 Séquençage massif de souches de *Legionella*

Objectifs : Caractériser les souches de différentes espèces de *Legionella,* de différents sérogroupes de *L. pneumophila* et les principaux clones de *L. pneumophila sérogroupe 1*

Partenariat et apport du CNR : Le séquençage de toutes les espèces de *L. pneumophila* et de 3 souches par sérogroupes de *L. pneumophila* se fait en collaboration avec l'équipe de Biologie des bactéries intracellulaires de l'institut pasteur de Paris (Carmen Buchrieser). En Europe, plus de 50% des isolats cliniques appartiennent à moins de 15 STs incluant 5 clones majoritaires (ST1, ST23, ST47, ST37, ST62). Nous nous interessons particulièrement à ces 5 clones. Un échantillonage de plus de 30 souches par ST a été sequencé par l'institut pasteur de Paris (Carmen Buchrieser), et le Sanger Institute de Cambridge (J. Parkhill) en collaboration avec le CNR et l'équipe de l'Heath Protection Agency de Londres (Tim Harrison). Le CNR a apporté sa connaissance sur l'épidémiologie de *Legionella* pour la sélection des isolats à séquencer parmi sa collection de souches caractérisées au niveau génotypiques et phénotypique.

Etat d'avancement & principaux résultats

L'analyse est en cours et une publication est prévue courant 2014. Elle montre notamment une très grande homogénéité des souches de ST47 avec l'identification de moins de 20 SNPs entre les souches.

6.1.4 Sous typage de *Legionella pneumophila* 1 clone Paris (ST1)

Abstract (Accepté pour Publication dans JCM) :

A 42-Plex CRISPR-based typing technique (spoligotyping) was recently developed at the French National reference center for *Legionella*. It allows the subtyping of the *Legionella pneumophila* Sequence Type1/Paris Pulsotype. In this study, we present the transfer of the membrane-based spoligotyping technique to a microbead-based multiplexed format. This microbead-based high-throughput assay uses devices such as Luminex 200® or the recently launched Magpix® system (Luminex Corp., Austin, TX, USA).
We designated this new technique as "LP-SPOL". We used two sets of samples previously subtyped by the membrane-based spoligotyping method to set-up and validate the transfer

on the two microbead-based systems. The first set of isolates (n=56) was representing the whole diversity of the CRISPR patterns known to date. These isolates were used for transfer set-up (determination of spacer cut-offs for both devices). The second set of isolates (n=245) was used to validate the transfer to the two microbead-based systems. The results obtained by the Luminex 200® system were 100% concordant to those obtained by the Magpix® system for the 2 sets of isolates. In total, 10 discrepant results were observed when comparing the Membrane-based method to the microbeads-based methods. These discrepancies were further resolved by repeating either the membrane-based or the microbeads-based assays. This new assay is expected to play an emerging role for surveillance of *L. pneumophila*, starting by one of the most frequent genotype, the Sequence Type1/Paris Pulsotype. However the generalization of this typing method of all *L. pneumophila* strains is not feasible, since all *L. pneumophila* strains do not contain CRISPRs.

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

Objectifs :

La Légionellose est une pneumonie aiguë caractérisée par un polymorphisme clinique et une sévérité variable. En France, 98% des cas confirmés de légionellose sont hospitalisés et 40% nécessitent une admission en réanimation. Le taux de mortalité global est d'environ 10% et peut atteindre plus de 30 à 50% pour les patients en unités de soins intensifs. Dans une étude multicentrique prospective d'une cohorte de 595 cas confirmés de légionellose, nous avons récemment identifiés des facteurs clinicobiologiques associés à une plus forte mortalité (C. Chidiac et al. 2012). Cependant, à ce jour aucune donnée n'est disponible sur l'association entre certains facteurs bactériens et l'évolution péjorative de la légionellose.

Les données de séquences génomiques complètes de souches Lp1 montre une diversité importante du génome accessoire (jusqu'à 10%). Le suivi épidémiologique régulier des souches *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.

L'objectif de ce projet est de réaliser une étude à large échelle d'expression différentielle de gènes (DGE) par RNA-Seq sur une trentaine de souches qui nous permettra d'identifier les déterminants de pathogénicité au niveau transcriptomique. En parallèle le séquençage NGS de ces mêmes souches sera réalisé. Ces souches responsables d'infections sévères et non sévères seront issues 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 (Projet financé par la FRM).

Etat d'avancement & principaux résultats : étude en cours

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

6.2.1 Publications nationales

1. Perpoint T, Jamilloux Y, Descloux E, Ferry T, Chidiac C, Lina G, Étienne J, Jarraud S, Ader F. PCR-confirmed *Legionella* non-*pneumophila* meningoencephalitis. Med Mal Infect. 2013 Jan;43(1):32-4.

6.2.2 Publications internationales

1. Leclerc O, Fraisse PO, Labarraque G, Oster C, Pichaut JP, Baume M, Jarraud S, Fisicaro P, Vaslin-Reimann S. Method development for genomic *Legionella pneumophila* DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Anal Biochem** 2013;435:153-8.

2. Campese C, Jarraud S, Sommen C, Maine C, Che D. Legionnaires' disease in France: sensitivity of the mandatory notification has improved over the last decade. **Epidemiol Infect** 2013:1-6.

3. Baume M, Garrelly L, Facon JP, Bouton S, Fraisse PO, Yardin C, Reyrolle M, Jarraud S. The characterization and certification of a quantitative reference material for *Legionella* detection and quantification by qPCR. **J Appl Microbiol** 2013. Jun;114(6):1725-33.

4. Ghrairi T, Chaftar N, Jarraud S, Berjeaud JM, Hani K, Frere J.Diversity of *Legionella*e strains from Tunisian hot spring water. **Res Microbiol** 2013;164:342-50.

5. Jamilloux Y, Pierini R, Querenet M, Juruj C, Fauchais AL, Jauberteau MO, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Roy CR, Henry T, Davoust N, Ader F. Inflammasome activation restricts *Legionella pneumophila* replication in primary microglial cells through flagellin detection. **Glia** 2013;61:539-49

6. Chaabna Z., Forey F., Reyrolle M., Jarraud S., Atlan D., Fontvieille D. Gilbert C, Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. **BMC microbiology 2013**; doi : 10.1186/1471-2180-13-17

7. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella.* **Methods Mol. Biol**. 2013; 954:119-48.

8. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. **Methods Mol. Biol**. 2013; 954:27-56.

9. Descours G, Tellini C, Flamens C, Philit F, Celard M, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Legionellosis and lung abscesses: contribution of *Legionella* quantitative real-time PCR to an adapted followup. **Case Rep Infect Dis**. 2013;2013:190183.

10. Den Boer JW, Euser SM, Nagelkerke NJ, Schuren F, Jarraud S, Etienne J. Prediction of the origin of French *Legionella pneumophila* strains using a mixed-genome microarray. **BMC Genomics**. 2013 Jul 1;14:435.

11. Cassier P, Landelle C, Reyrolle M, Nicolle MC, Slimani S, Etienne J, Vanhems P, Jarraud S. Hospital washbasin water: risk of *Legionella*-contaminated aerosol inhalation. **J Hosp Infect.** 2013; 85: 308-11

12. Beauté J, Zucs P, de Jong B, European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires' disease in Europe, 2009-2010. Euro Surveill **2013;**18:20417.

Travaux réalisés en 2013, publiés en 2014

1. Abdel-Nour M., Duncan M., Prashar M., Rao C., Ginevra C., Jarraud S., Low D., Ensminger A., Terebiznik M., and Guyard C. The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, auto-aggregation and pathogen-phagocyte interactions. **Appl Environ Microbiol**. 2014, 80(4):1441.

2. Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples. **J Microbiol Methods.** 2014, 98: 119-21.

3. Gomgnimbou M., Ginevra C., Pero-Cane C., Versapuech M., Refregier G., Jacotin N., Sola C., and Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. accepted for publication in **Journal of clinical microbiology**

Travaux réalisés en 2013, en cours de soumission 2014

1. Cassier P., Campese C., Le Strat Y., Che D., Ginevra C., Jarraud S., Etienne J. Epidemiological characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaire's disease cases in France.

2. Freydiere AM., Gervasoni K., Descours G., Vandenesch F., Lina G., Gaia V., Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA in comparison with the Binax NOW *Legionella* Urinary Antigen Card in two national reference centers.

6.2.3 Communications nationales

Communications nationales orales

1. Le Cann P*., Jarraud S., Robaldo G., Guégan J.-F., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *L. pneumophila* dans l'environnement. Communication orale, Sympolégio**,** Lyon, 26- 27 novembre 2013.

2. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, Jacotin N, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides. Communication orale, 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.

3. Descours G*, Ginevra C, Forey F, Chastang J, N. Jacotin, J. Etienne, G. Lina, S. Jarraud. Mécanismes de résistance des légionelles aux macrolides. SympoLegio, 26-27 Novembre 2013, Lyon. SympoLegio, 26-27 Novembre 2013, Lyon.

4. P Cassier, C Ginevra, L Gomez-Valero, N Jacotin, C Buchrieser, S Jarraud and J Etienne. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in environmental samples. SympoLegio 2013, 26-27 Novembre 2013, Lyon

Communications nationales affichées

1. Freydière AM, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Evaluation du test immunochromatographique fluorescent Sofia *Legionella* FIA pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*. Communication affichée, 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.

2. Jacotin N, Descours G, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Détection rapide de la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides par PCR en temps réel utilisant des sondes « *sloppy molecular beacons* », Communication affichée, 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.

3. Le Cann P., Gérard A., Jarraud S., Loisy-Hamon F., Guégan J.F., Vergnaud G., Pourcel C. Stabilité spatio-temporelle des souches de *Legionella pneumophila* dans

l'environnement. Communication affichée, 9è congrès de la Société Française de Microbiologie, Lille, 7-8 février 2013.

6.2.4 Communications internationales

Communications internationales orales

1. Rusniok C, Gomez-Valero L, Ginevra C, Ma L, Bouchier C, Jarraud S, Buchrieser C Population genomics and evolution of virulence of *Legionella*. Communication orale 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (*IMMEM*-10). 02 October 2013 - 05 October 2013.

2. Campese C, Jarraud S, Forey F, Che D. Clusters of travel associated Legionnaires' disease in France; 2001-2012. Communication orale, 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.

3. Le Cann P, Jarraud S, Robaldo G, Guégan J.-F, Pourcel C. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in the environment. 8th International conference on *Legionella*, Melbourne, Australie, 29 octobre-1er novembre 2013.

Communications internationales affichées

1. Le Cann P, Gérard A, Jarraud S, Guégan J, Vergnaud G, Pourcel C. Spatio-temporal stability of *Legionella pneumophila* strains in the environment. Communication affichée 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10), 2 October 2013 - 5 octobre 2013, Institut Pasteur, Paris.

2. Gomez-Valero L, Rusniok C, Reuter S, Harris S, Petty N, Jarraud S, Dougan G, Hartland H, Frankel G, Buchrieser C. The *Legionella* genus genome: comparative genomics of the entire bacterial genus. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

3. Fuche F, Andrea C, Jarraud S, Doublet P, Gilbert C. A functional Type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

4. C Ginevra, N Jacotin, T Geissmann, F Vandenesch, G Lina, J Etienne and S Jarraud. Influence of spacers position on CRISPR-based defense efficiency. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

5. Descours G, Ginevra C, Forey F, Chastang J, Jacotin N, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Molecular mechanisms involved in macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

6. Jacotin N, Descours G, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Rapid detection of macrolides resistant *Legionella pneumophila* by use of sloppy molecular beacons in a real-time PCR assay. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

7. Cassier P, Nicolle MC, Descours G, Benet T, Brunet F, Buron M, Morelon E, Vanhems P, Jarraud S. May oropharyngeal colonization induce Legionnaires' disease in a kidney

transplant? Communication affichée, 8th International conference on Legionella, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.

8. Freydière AM, Descours G, Vandenesch F, Lina G, Jarraud S. Evaluation of the Sofia *Legionella* FIA, a fluorescent immunochromatic assay, in comparison with the BinaxNOW *Legionella* urinary antigen card. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

9. P Cassier, C Ginevra, L Gomez-Valero, N Jacotin, C Buchrieser, S Jarraud and J Etienne. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in environmental samples. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

10. MK Gomgnimbou, C Ginevra, C Peron-Cane, M Versapuech, G Refregier, N Jacotin, C Sola and S Jarraud. Transfer of *Legionella pneumophila* sequence type 1/paris pulsotype spoligotyping on a microbead-based high throughput format. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie

11. Campese C, Le Strat Y, Cassier P, Che D, Jarraud S. Epidemiological characteristics associated with specific sequence types ST1, ST23, ST47 of Legionnaires' disease cases in France, 2008-2012. Communication affichée, 8th International conference on *Legionella*, October 29th – November 1st 2013, Melbourne, Australie.

6.2.5 Conférences sur invitations

1. Jarraud S*. Can surveillance and control of legionellosis rely on antigen / DNA detection methods ? European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany 27-30 April **2013**

2. Jarraud S*. Evaluation du risque lié aux légionelles Congrès International de la Bio-Surveillance de l'environnement, Casablanca, Maroc, 24-26 Octobre **2013**

3. Jarraud S*, Descours G, Ginevra C, Cassier P, Lina G, Etienne J. Detection of *Legionella* in clinical samples, still in need of improvement. *Legionella* 2013, 29 octobre – 1er novembre **2013**, Melbourne, Australie.

4. Descours G*, Jarraud S. Formation médicale continue « Les dix erreurs à ne pas faire dans le diagnostic des légionelloses ». 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 21-22 Novembre 2013, Paris.

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

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

Collaborations dans le domaine de l'environnement :

- Participation active au groupe de travail de la révision de la norme AFNOR NFT90-431 (Monique Reyrolle et Maud Baume) ;
- Distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à 31 laboratoires environnementaux dont 5 étrangers (Belgique, hollande, Allemagne, Canada) ;
- Partenariat avec LGC Standards, distributeur de matériaux de référence en microbiologie, afin qu'ils distribuent l'ADN étalon et le CQE auprès des potentiels clients à l'étranger. Ces matériaux sont disponibles sur le site : http://www.lgcstandards.com.
- 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 (COPIL) « 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) ;
- Accueil de stagiaires de laboratoires environnementaux pour la détection des légionelles dans l'environnement (norme NFT90-431).

8 Programme d'activité pour les années suivantes

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

1. Evaluation de l'apport des nouvelles technologies de séquençage haut débit (NGS) pour le diagnostic clinique, la recherche de variants résistants aux antibiotiques, et de la place du séquençage de génome complet dans l'épidémiologie moléculaire et l'évolution de la bactérie chez le patient.

   - Plusieurs approches sont à l'étude pour l'utilisation du NGS dans le diagnostic infectieux de plusieurs pathogènes simultanément : l'objectif est de séquencer une ou plusieurs régions spécifiques de microorganismes à partir d'un prélèvement clinique.
     - Une approche consiste à amplifier l'ARNr 16S et séquencer l'ensemble des amplicons en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des bactéries présentent dans le prélèvement.
     - Une autre approche est la capture ciblée de plusieurs ADN de microorganismes suivi de leur séquençage en NGS ce qui permet d'identifier l'ensemble des pathogènes recherchés.
   - La recherche de variants résistants aux antibiotiques, en particulier la recherche de sous-populations minoritaires de légionelles résistantes aux traitements directement à partir du prélèvement respiratoire par séquençage ciblé des régions impliquées dans la résistance
   - La place du séquençage de génome complet (*de novo* whole genome sequencing) dans l'épidémiologie moléculaire locale (enquêtes épidémiologiques) et globale (émergence de clones) (voir chapitre 6.1.3)
   - L'évolution de la bactérie chez le patient par le séquençage du génome complet d'isolats précoces et tardifs issus d'un même patient (voir chapitre 3.4).

2. Une des grandes implications du CNR sera sur l'étude des facteurs pouvant être impliqués dans la sévérité des légionelloses. Pour cela nous souhaitons :
    - étudier les facteurs bactériens par des approches de génomique et transcriptomique associés à la sévérité des cas de légionelloses (projet financé par la FRM) (chapitre 6.1.5) ;
    - étudier des facteurs génétiques d'hôte associés aux cas sévères (en collaboration avec Laurent Abel, dans le cadre d'une demande de PHRC national)
    - identifier des marqueurs de sévérité (caractérisation de la souche, statut immunitaire du patient, détection de mutants résistants aux antibiotiques, suivi du taux de légionelles dans les prélèvements pulmonaires au cours du temps par PCR) (demande de PHRC national)

3. Mise en place d'une étude européenne sur l'apport du spoligotypage dans les investigations des cas liés aux souches ST1/pulsotype Paris.