

DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE ET TYPAGE EPIDÉMIOLOGIQUE DES LEGIONELLES

Camille ALLAM

Assistante hospitalo-universitaire

Institut des Agents Infectieux (IAI)
Centre National de Référence des Légionelles (CNRL)
Centre de Biologie Nord
HOSPICES CIVILS DE LYON

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Equipe Pathogénèse des Légionelles - INSERM U1111

02/11/2021

LEGIONELLES
Centre National de Référence



HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON

www.chu-lyon.fr

LEGIONELLA ... RESPONSABLE DE LÉGIONELLOSE

Fièvre de Pontiac

- Syndrome pseudo-grippal sans pneumonie
- Bénigne
- fort taux d'attaque

Legionnaires' Disease (LD)

- Pneumonie modérée à sévère
- 98% hospitalisation
- 40% en USI
- Risque épidémique
- **Maladie à DO**

Localisations extra-pulmonaires

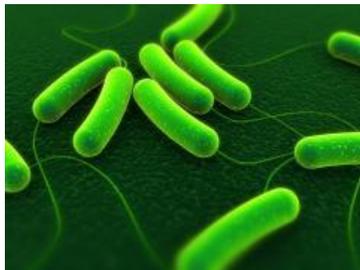
- Rares
- **articulaires**, cutanées, cardiaques ...

1800 cas
/ an en moyenne
8-10 % des PAC

10% de décès

$\frac{3}{4}$ des patients
ont un facteur
de risque

20 - 33% : cas nosocomiaux / patients immunodéprimés / USI



BESOINS EN TERMES DE DIAGNOSTIC ET D'INVESTIGATION

Pneumonie avec signes cliniques et radiologiques peu spécifiques

Diagnostic microbiologique doit être

- **Rapide** → Adaptation traitement antibiotique
- **Exhaustif** → Diagnostic de l'ensemble des légionelloses : **détection Lp1 avec une très grande sensibilité** et **détection Lp autres sérogroupes et autres espèces**

Cas à *Legionella* non Lp1, associés +++

- Patients immunodéprimés
- Cas nosocomiaux

Mortalité accrue chez ces patients

Méthodes permettant les investigations épidémiologiques



DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE

1

Détection de l'AgU soluble de Lp1 dans les urines



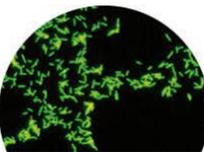
2

PCR *L.spp* ou *L.pneumophila* sur prélèvements respiratoires

Outils diagnostiques

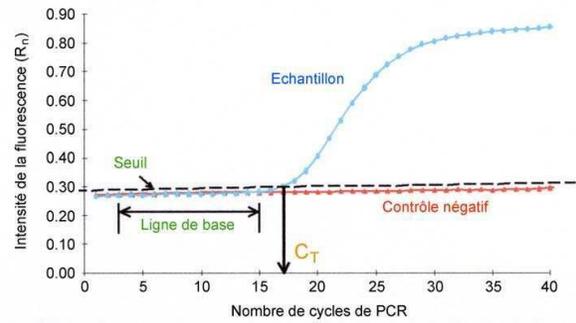
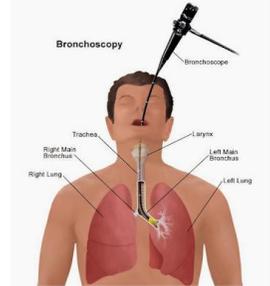
4

Sérologie



3

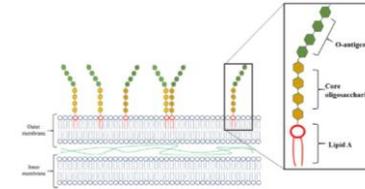
Mise en culture des prélèvements pulmonaires



OUTILS DIAGNOSTICS

ANTIGÈNES URINAIRES *LEGIONELLA* → 90% DES DIAGNOSTICS

- LPS de *L. pneumophila* sérotype 1 (Lp1)
- Détection **précoce** : **2 à 3 jours** après le début des symptômes
- **Persistence** de l'antigénurie :
 - plusieurs jours à **2 mois en moyenne**, jusqu'à plus d'1 an
 - pas le reflet d'un échec thérapeutique mais associée à l'immunodépression
=> s'assurer de la présence d'une pneumopathie
- **Excrétion peut être intermittente**
 - Ne pas répéter la recherche sur un autre échantillon d'urine
 - Plutôt changer de méthode si doute diagnostic (PCR)



OUTILS DIAGNOSTICS

Sensibilité

- **Dépendante de la souche**

Lp1 mAb 3/1+ (cas communautaires et voyages) : **95%**

Lp1 mAb 3/1- (cas nosocomiaux) : **≤ 71%**

Lp non 1 : ≤ 33% (pas de tests avec meilleure performance)

(Helbig and *al.* In Marre R, et al (ed), 2002)

(Helbig and *al.* JCM 2003)

(Yzerman EP et *al.*, JCM 2002)

- **Dépendante de la sévérité de la légionellose**

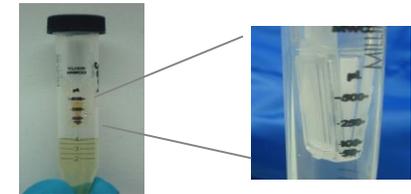
Sévère : 88% à 100%

Peu sévère : 40 à 53%

Pour ↑ Se

- **Concentration** des urines par ultrafiltration par centrifugation

- **Lecteur optique +++**



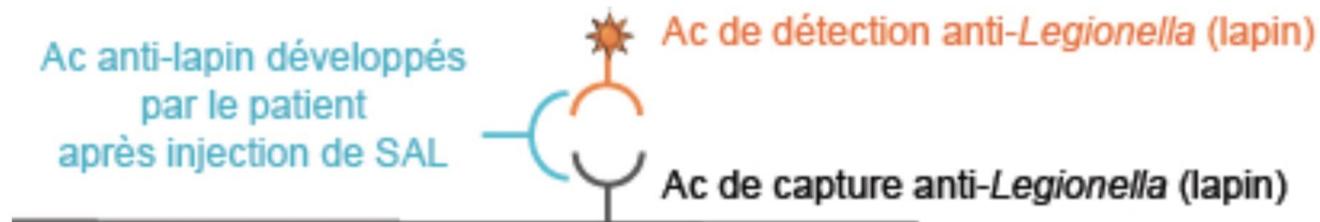
(Amikon Ultra-4 Ultracel-10k, Millipore)

OUTILS DIAGNOSTICS

Spécificité : 96% à > 99%

Faux positifs

- Bien caractérisé : patients greffés ayant reçu des injections de serum anti-lymphocytaire de lapin



(Deforges et al, CID 1999)

- Origine inconnue ++
- Traitement : déprotéinisation des urines par **chauffage** (Ac / protéines détruits ≠ LPS de *Legionella* non dégradés)

Stein et al. JCM, 1980 ; Birtles et al. 1990 ;
Sathapatayavongs et al. 1992 ; Dominguez et al. 1998

PCR SUR PRELEVEMENTS RESPIRATOIRES

● Cibles

- *L. spp* (toutes espèces & sérogroupes) : fragment du gène 16S rRNA
- *L. pneumophila* : gène *mip* ou autre
- Spécifique Lp1 : gène *wzm* (non commercialisé) (Merault et al. 2011; Mentasti et al. 2015)
- Identification des espèces : espace intergénique 23S-5S et séquençage (non commercialisé)

● Kits commerciaux

- ***L. pneumophila* uniquement +++**
- *L. spp* + *L. pneumophila* : rare
- **PCR syndromiques** → pour infections respiratoires basses (prélèvements profonds) / ne pas utiliser kits pour échantillons nasopharyngés

Utilisation en augmentation en France : ↑ des cas à Lp non sg1

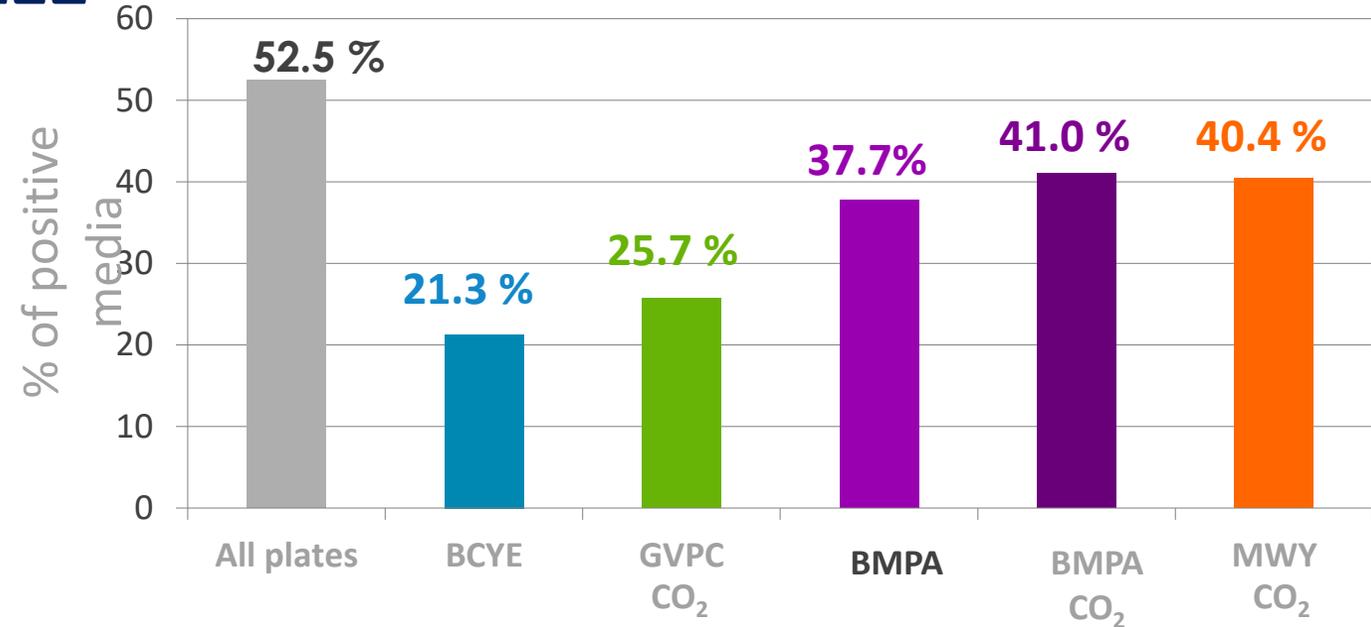
→ 2021 : 9% des cas culture positive

PCR SUR PRELEVEMENTS RESPIRATOIRES

- **Spécificité > 99%**
- **Sensibilité 85% - 100%**
 - PCR > culture (~30% plus sensible que la culture)
 - PCR > Ag urinaire sur certains sous-types de Lp1 (Mab3/1-); Lp sg 2-15, *L. non pneumophila*
 - PCR < Ag urinaires (pour les cas Lp1)
80 - 85% des AgU positive

CULTURE DE LEGIONELLE

- Milieux de culture avec cystéine et charbon
- Milieux avec des antibiotiques (BMPA ou MWY) permettent d'éliminer flore interférente, Se +++



Descours G et al. 2014

CNR

Amoebal Plate test (APT) : co-culture sur tapis amibien sur gélose

Capacité des Legionella à se multiplier dans amibes + Inhibition de la flore interférente

Durée d'incubation = 10j

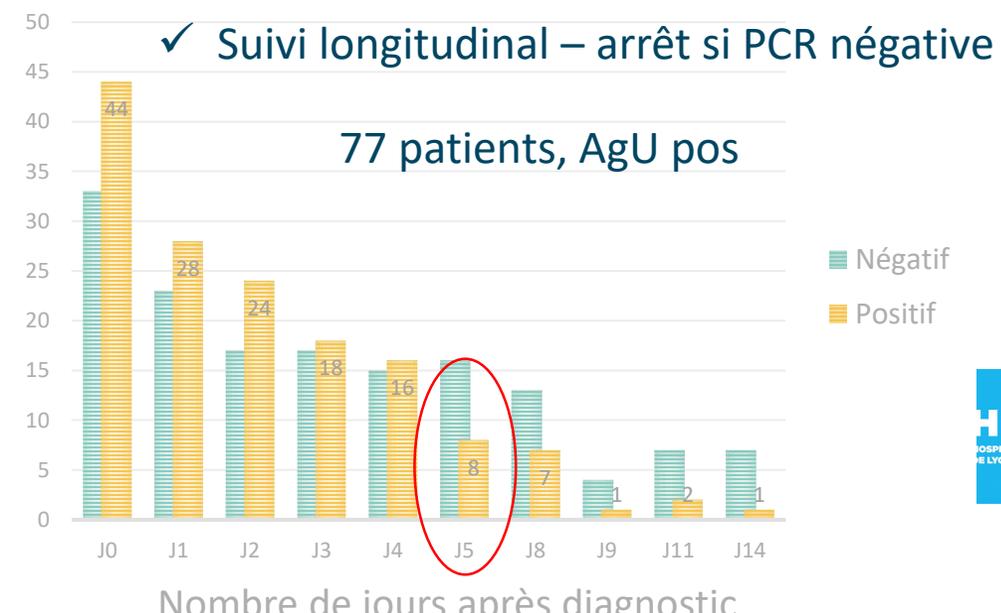
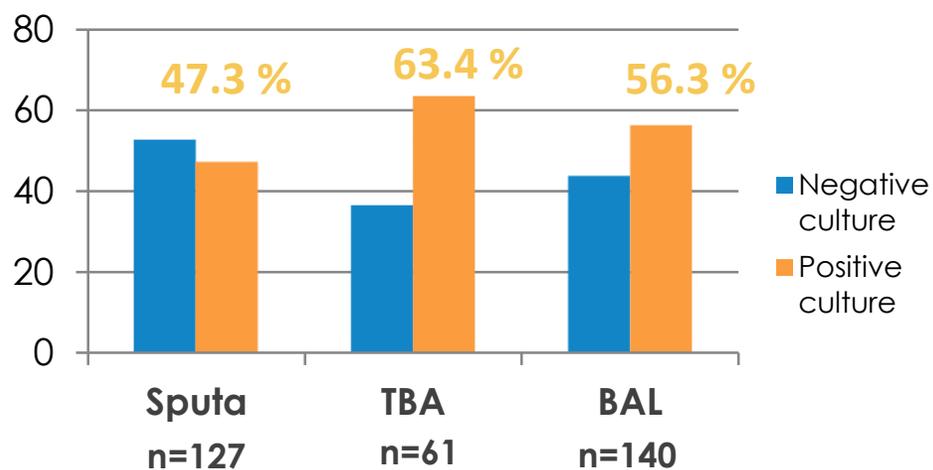
- ✓ J3 : 49% culture +
- ✓ J5 : 95% (Lp) / autres espèces plus tardives
- ✓ J10 : 100%

CULTURE DE LEGIONELLE

- Sensibilité : 50 – 60%
- Intérêt épidémiologique +++
- ATB >LBA > crachats
 - biais = nature du prélèvement liée à la sévérité

- crachats salivaires doivent être acceptés
(Ingram et al., J Clin Microbiol, 1994)
- accepter échantillons sous antibiothérapie
 - culture positive >J8 ... > J30

N= 328 patients, 183 cas de légionellose (CNR)



IDENTIFICATION DES COLONIES

Identification
présomptive

- ✓ Repérage : aspect en verre fritté à la loupe binoculaire (indispensable)
- ✓ Subculture sur BCYE /pas de croissance sur milieu sans cystéine



Identification

- ✓ **MALDI-TOF**
 - *L. pneumophila* et majorité des autres espèces cliniques dans les bases de données
 - *Legionella* autofluorescentes bleues : non distinguables
 - Sérogroupes de *L. pneumophila* : non identifiable



L. anisa sous UV

- ✓ **Agglutination de particules de latex** : sérogroupage de *L. pneumophila*
- ✓ Identification espèces par **séquençage du gène mip** (référence) / WGS

SEROLOGIE

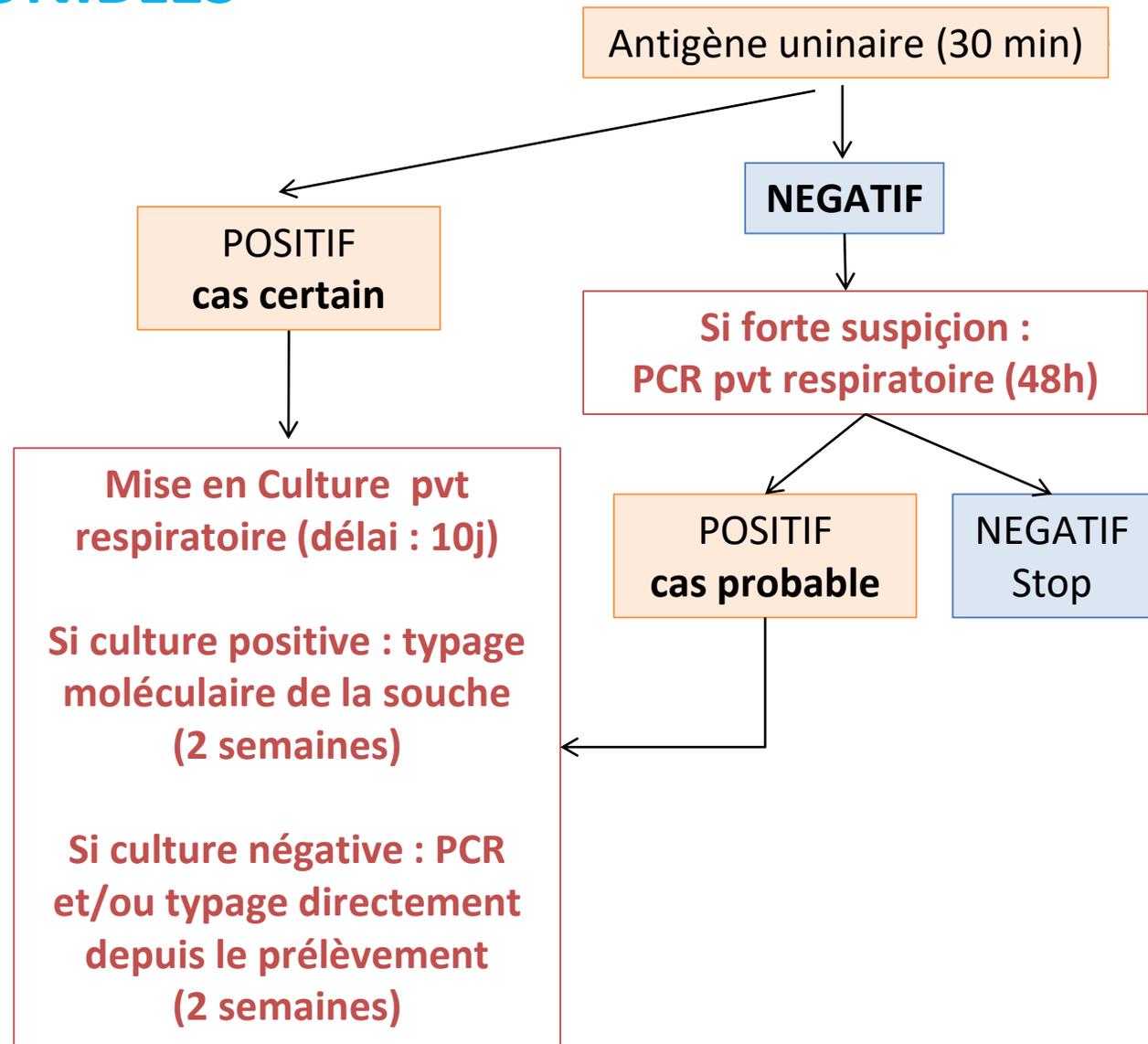
- Place très limitée
- Outils épidémiologique >> diagnostique
- Restreint au cas où :
 - Forte suspicion
 - Prélèvement respiratoire non réalisable
 - Identification du sérotype nécessaire
- 2 serums indispensables :
 - initial et 3 à 5 semaines après début de la maladie



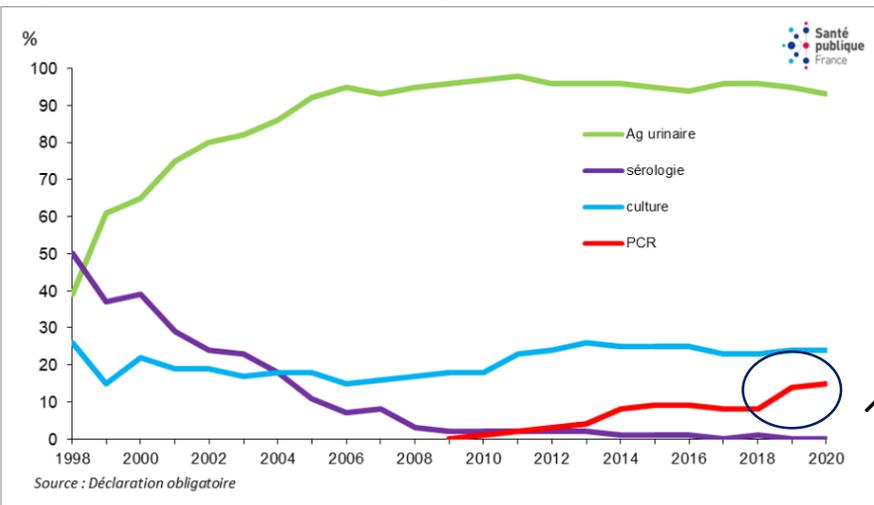
Utilisable en rétrospectif

BILAN DES METHODES DISPONIBLES

- 1 Ag urinaire **+++**
- 2 PCR **+++**
- 3 Culture **Indispensable pour le typage**
- 4 Sérologie **Si aucune autre méthode possible**



Répartition méthodes de diagnostic France 1998-2020.



↑ diagnostics par PCR

INVESTIGATIONS - TYPAGE

4 interlocuteurs



Hôpital



© Can Stock Photo

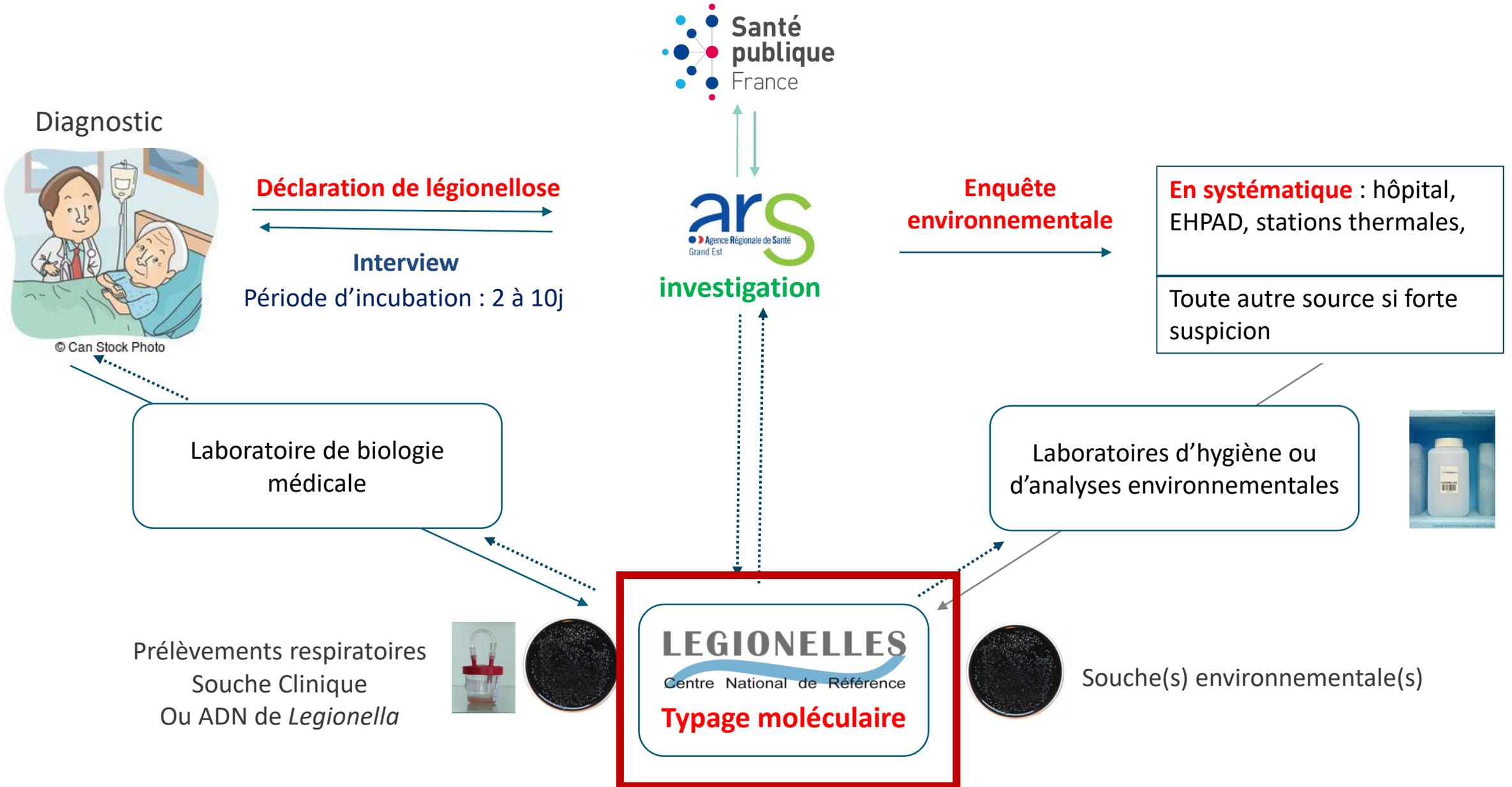


LEGIONELLES

Centre National de Référence

- Pr S. Jarraud
- Dr G. Descours
- Dr L. Beraud
- Dr C. Allam
- C. Ginevra

INVESTIGATION DES CAS EN FRANCE



COMPARAISON DE SOUCHES CLINIQUES ET ENVIRONNEMENTALES

1. S'assurer qu'une souche clinique est disponible
2. S'assurer que **l'espèce et le sérogroupe sont identiques (Lp1 ou Lp 2-15)**
3. Faire envoyer la(es) souche(s) environnementale(s) au CNR accompagnée(s) de la fiche spécifique par le laboratoire environnemental
4. Transmission de la fiche de demande de comparaison par l'ARS au CNR à GHN_CNRLegionelles@chu-lyon.fr en récoltant le numéro de la souche auprès de Santé publique France

Si autre situation, en discuter avec Santé publique France ou le CNR avant envoi de souches environnementales



**DEMANDE DE TYPAGE ET DE COMPARAISON DE SOUCHES DE LEGIONELLES
D'ORIGINE CLINIQUE ET ENVIRONNEMENTALE**

Fiche mise à jour tous les ans et disponible sur le site du CNR : <http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr/>
Fiche à remplir par l'ARS et à envoyer par mail à GHN_CNRLegionelles@chu-lyon.fr

ARS

ARS : Déléation territoriale : Tampon :

Nom du correspondant :

Courrier adressé à :

Adresse :

Tel :

Fax :

Email :



Date de la demande :

REFERENCE DU / DES CAS

Cas n°1 : souche prélèvement pulmonaire ADN de prélèvement pulmonaire

Date de naissance :

Lieu d'hospitalisation :

Référence du CNR des Légionelles (à demander à Santé Publique France) :

Code anonymat du cas :

Cas n°2 : souche prélèvement pulmonaire

Date de naissance :

Référence du CNR des Légionelles (à demander à Santé Publique France) :

Code anonymat du cas :

Cas n°3 : souche prélèvement pulmonaire ADN de prélèvement pulmonaire

Date de naissance :

Lieu d'hospitalisation :

Référence du CNR des Légionelles (à demander à Santé Publique France) :

Code anonymat du cas :

SOUCHES ENVIRONNEMENTALES

Sites d'isolement et informations complémentaires :

Coordonnées du laboratoire d'envoi des souches environnementales :

Nom du correspondant :

Ville :



**ENVOI DE SOUCHES ENVIRONNEMENTALES POUR TYPAGE MOLECULAIRE
A LA DEMANDE DE L'ARS**

Fiche mise à jour tous les ans et disponible sur le site du CNR : <http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr/>
Fiche à remplir par le laboratoire expéditeur et à faxer à GHN_CNRLegionelles@chu-lyon.fr

Transport à température ambiante

LABORATOIRE EXPEDITEUR

Cachet du laboratoire :

Nom du correspondant :

Adresse du laboratoire d'envoi :

SOUCHE CLINIQUE SOUCHE ENVIRONNEMENTALE

La souche est une souche clinique ou environnementale. La croissance doit être visible lors de l'envoi.

Spécies de la souche : Lp1 Lp2-14 L. non pneumophila

Date de prélèvement :

Date d'isolement :

Nature du prélèvement : Eau chaude Eau froide Autre (préciser) :

Point de prélèvement (robinet, douche, ballon ...) :

Site de prélèvement, précisant bâtiment (TAR, hôpital, Industrie, domicile...), adresse, ville :

RENSEIGNEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES

Seules les souches issues de prélèvements environnementaux rentrant dans le cadre d'investigations épidémiologiques et pour lesquelles une ou des souches cliniques ont été isolées seront typées.

Souche isolée dans le cadre d'enquête épidémiologique : Cas isolé Cas groupés

Souche envoyée à la demande de l'ARS de la région :

Département :

Coordonnées du correspondant à l'ARS :

Référence CNR de la (les) souche(s) clinique(s) :

Coordonnées du laboratoire ayant isolé la (les) souche(s) clinique(s) :

Mail au CNR
GHN_CNRLegionelles@chu-lyon.fr

COMMENT COMPARER LES SOUCHES ?

- 1. SBT : Sequence Based Typing**
- 2. Core genome MLST (cgMLST)**
- 3. Comparaison basée sur les SNPs : lien de parenté phylogénétique**

1. SBT – SEQUENCE BASED TYPING

- Amplification et séquençage nucléotidique de 7 gènes

flaA - proA - mompS - asd – mip - pilE - neuA

2003 Gaia V, *et al.* J Clin Microbiol.

2005 Gaia V, *et al.* J Clin Microbiol.

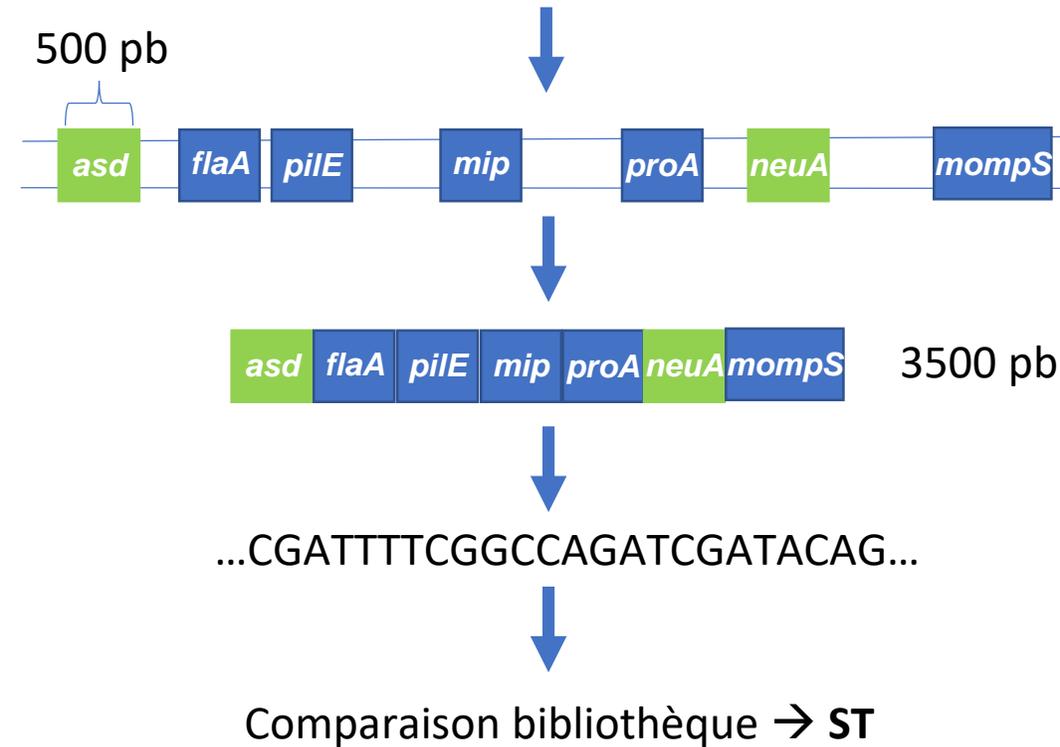
2007 Ratzow S, *et al.* J Clin Microbiol.

- Applicable directement sur prélèvements cliniques (=Nested SBT)

- Peut-être extrait des données de WGS

- 1 combinaison de gènes = 1 ST

- Existence de ST endémique (exemple : ST1, ST23, ...)

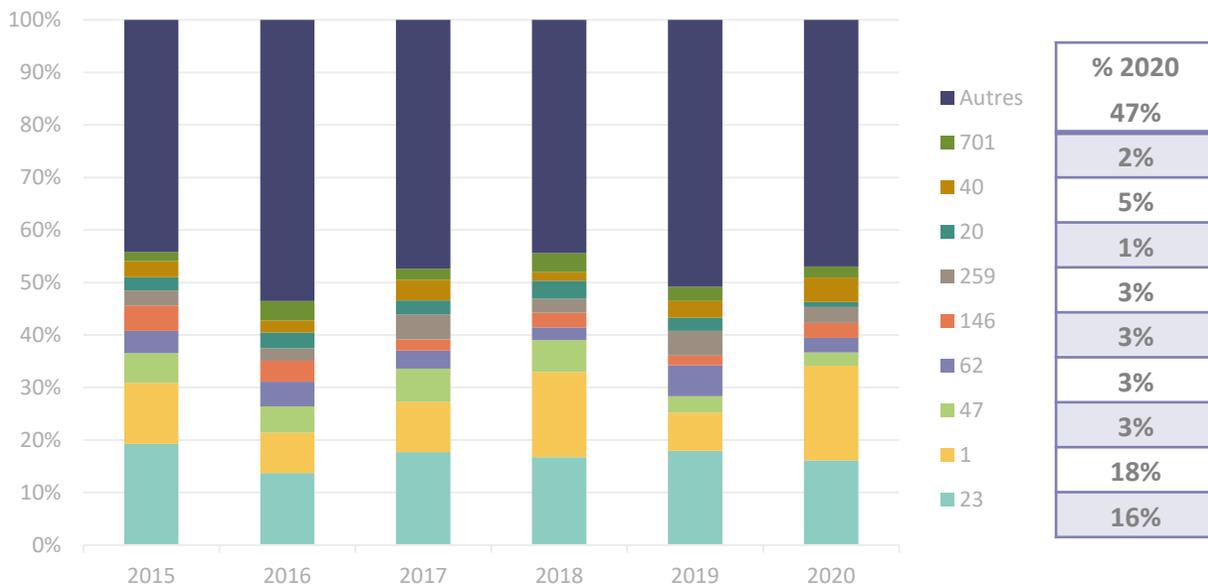


Ex : 1, 4, 3, 1, 1, 1, 1 = ST 1 (Sequence Type)

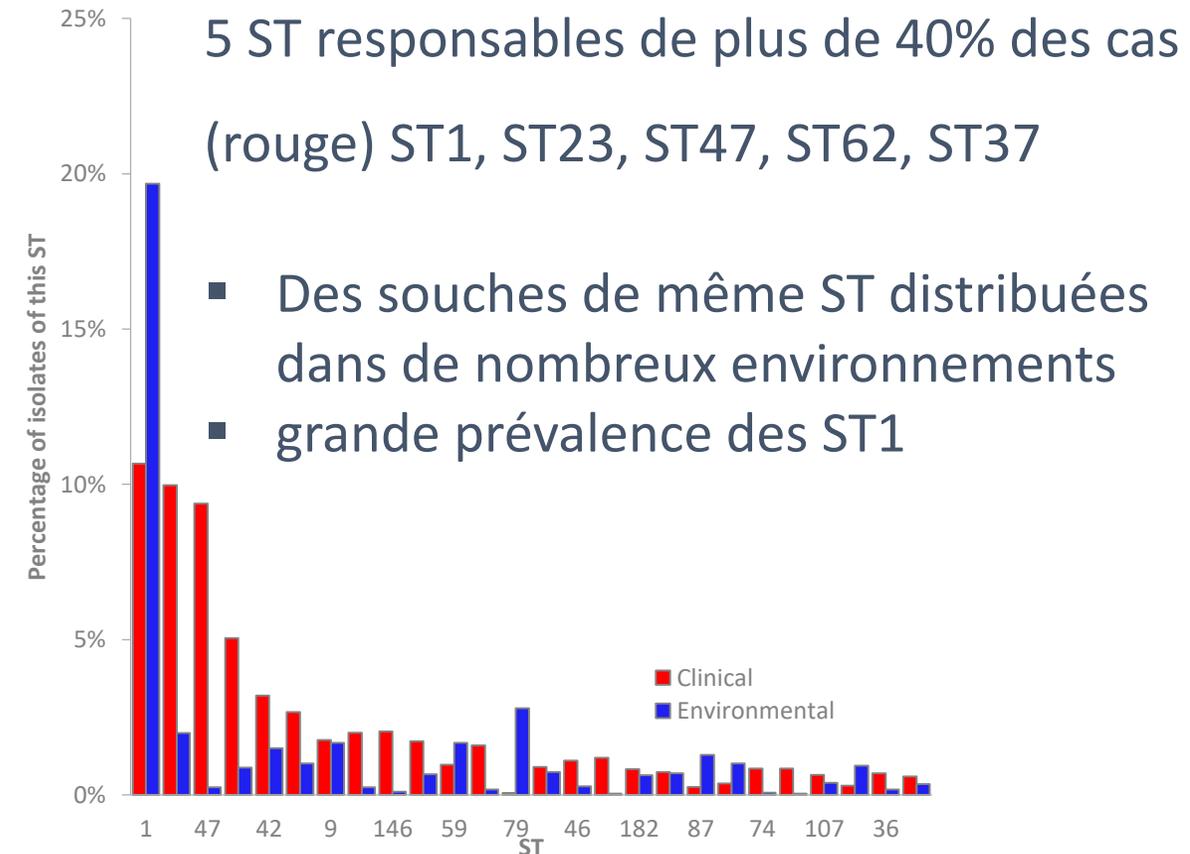
RÉPARTITION DES ST SELON LES SOUCHES

En France

En Europe

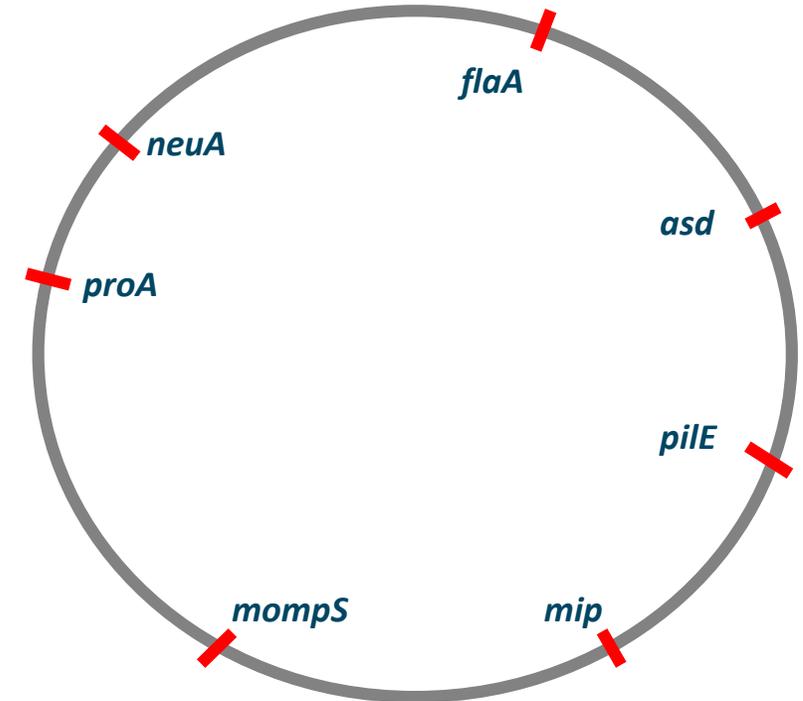


Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2015 à 2020 et représentation de ces STs (en pourcentage) en 2020.



GENOME DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

- 7 gènes du SBT \approx 3 500 pb
 - Génome complet :
 - 3 500 000 paires de bases (pb)
 - 3 500 gènes
- Meilleur pouvoir discriminant !



→ Séquençage du **génom complet**
(*Whole genome Sequencing, WGS*)

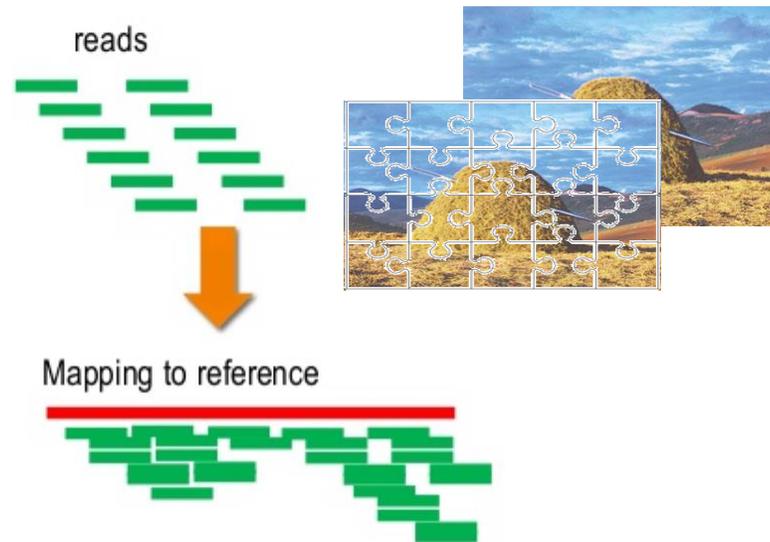
PRINCIPE DU WGS

- Extraction de l'ADN
- Fragmentation de l'ADN en petits fragments
- Séquençage de l'ADN en des milliers à des millions de courts reads par souche

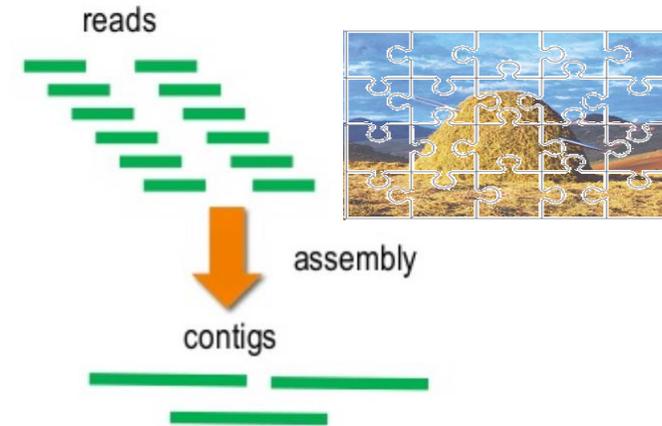
ACGCGATTCAGGTTACCACG ← Reads
GCGATTCAGGTTACCACGCG
GATTCAGGTTACCACGCGTA
TTCAGGTTACCACGCGTAGC
CAGGTTACCACGCGTAGCGC
GGTTACCACGCGTAGCGCAT
TTACCACGCGTAGCGCATT
ACCACGCGTAGCGCATTACA
CACGCGTAGCGCATTACACA
CGCGTAGCGCATTACACAGA
CGTAGCGCATTACACAGATT
TAGCGCATTACACAGATTAG

QUE FAIRE DE L'ENSEMBLE DE CES DONNÉES ?

- Les reads sont cartographiés à un génome de référence = mapping



- Assemblage *de novo* (sans référence, génomes non connus)

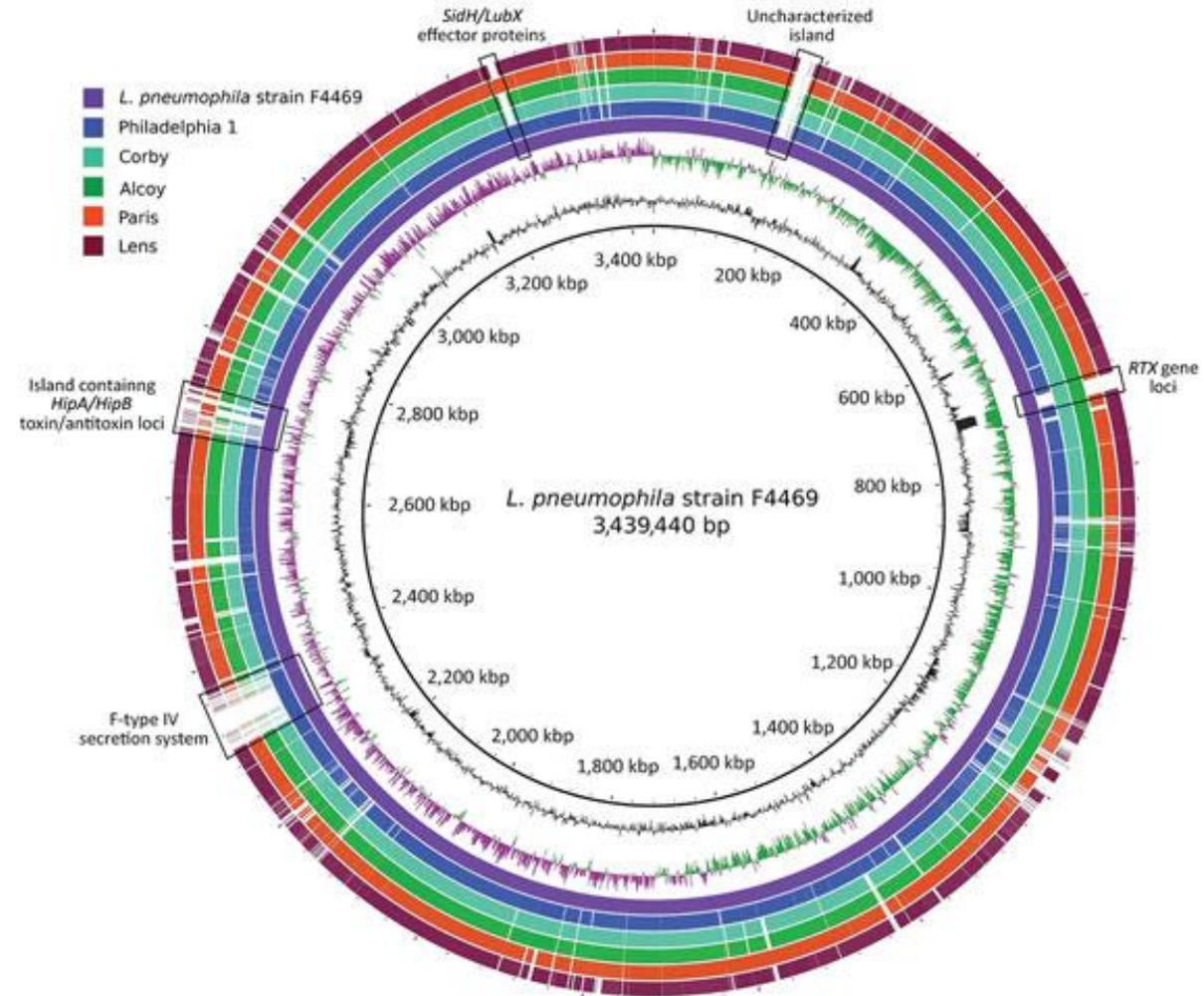


Source: modified from JA Carriço

2. CORE-GENOME MLST (CG MLST)

- Similaire au SBT (= MLST) mais avec plus de gènes, tous sélectionnés dans le **core génome** (>1500 gènes possibles)
- Outil avec **50 gènes** développé par le groupe européen ESGLI
 - profil allélique avec 50 numéros
 - comparaison plus discriminante
- obtention d'un cgST (outils européen en cours de développement pour assigner un ST)

Whole genome from *L. pneumophila* different strains



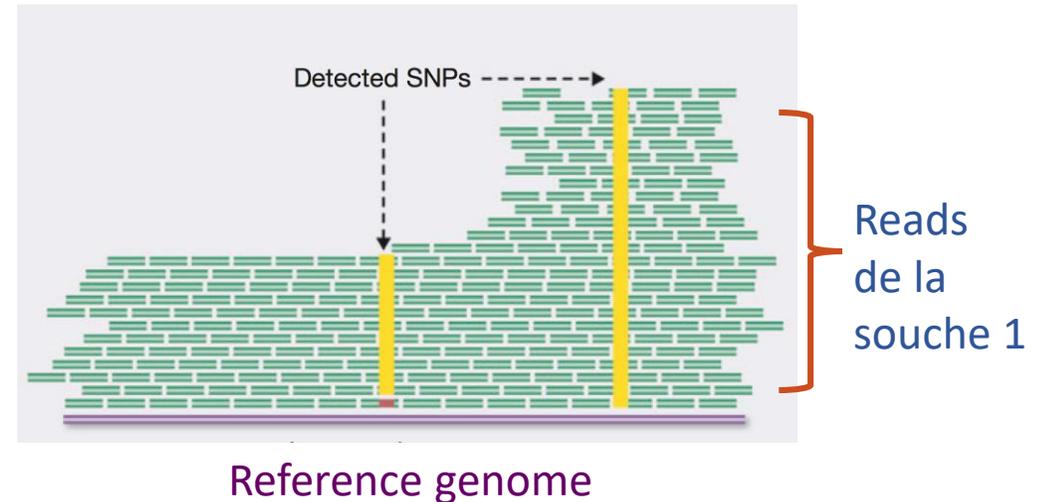
3. Comparaison basée sur les SNPs = Single Nucleotide Polymorphism



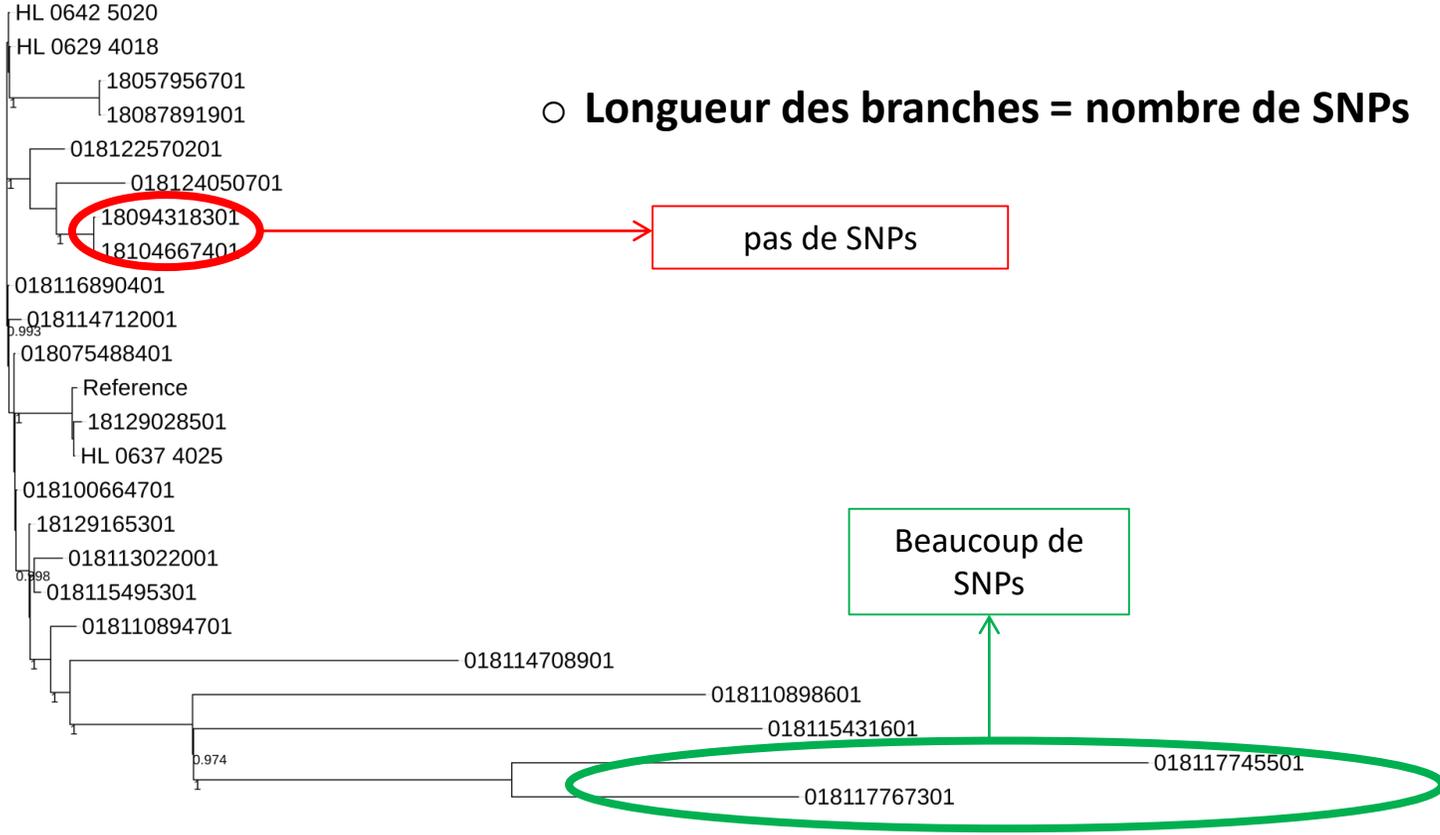
Sequences des reads

Sequences des reads
cartographiées
sur **genome de reference**

Detection des
Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)



INTERPRÉTATION ARBRE PHYLOGÉNÉTIQUE



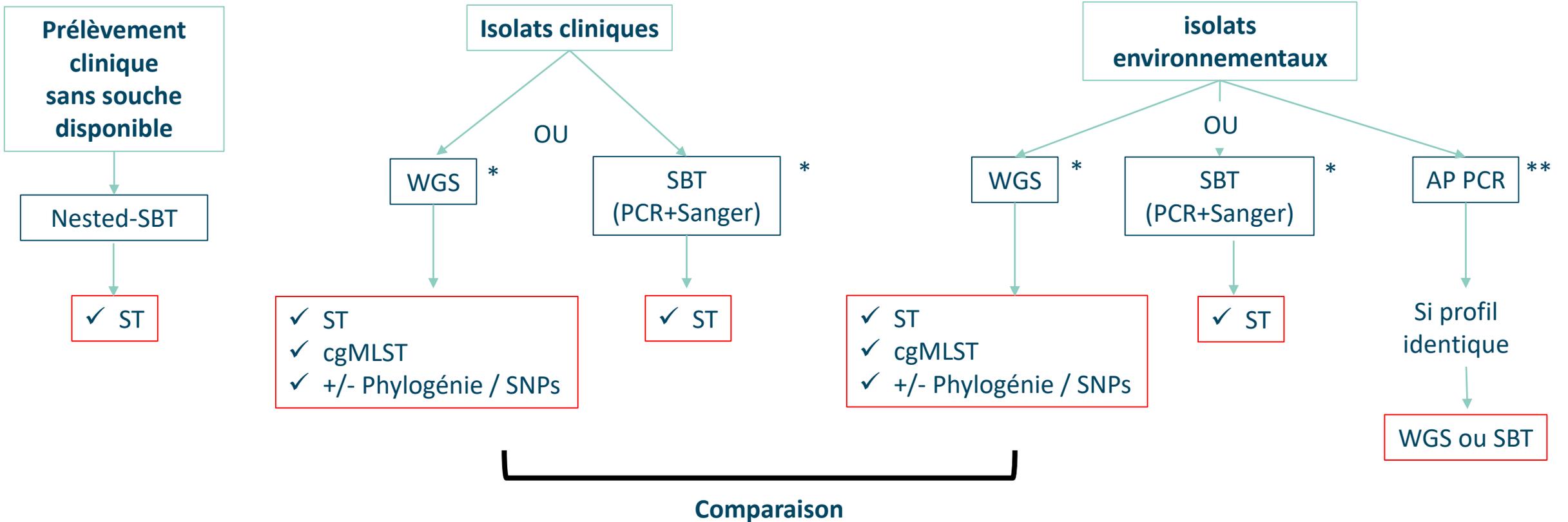
○ Longueur des branches = nombre de SNPs

pas de SNPs

Beaucoup de SNPs

○ Noeux joignant les branches :
ancêtre commun le plus récent

TYPAGE AU CNR - CONDUITE À TENIR ACTUELLE



* En 2021 : ~100 % des souches analysées en WGS

** pour les souches environnementales, AP-PCR utilisée comme méthode de screening si nombre important

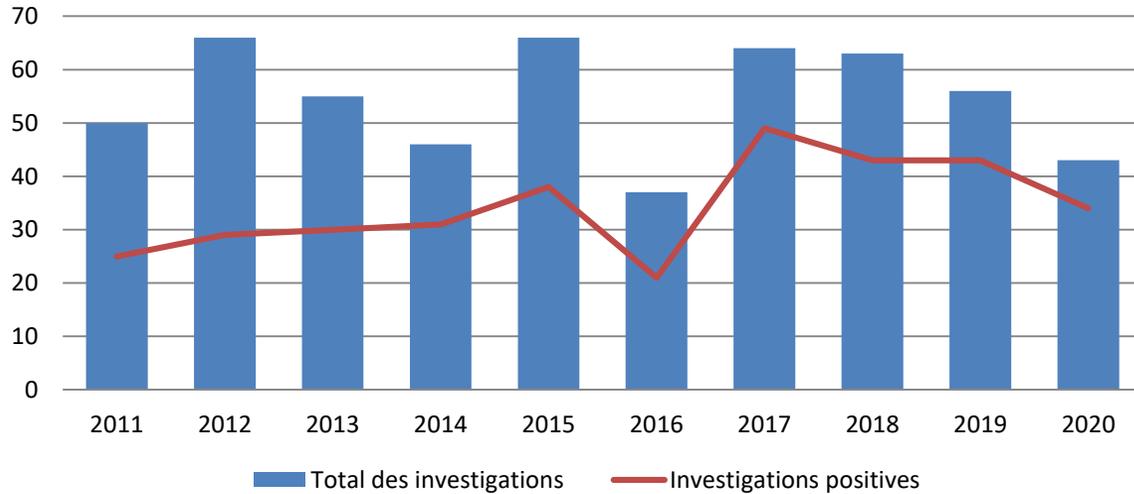
Comparaisons souches cliniques et environnementales

2008-2020



2011 -2021

LEGIONELLES
Centre National de Référence



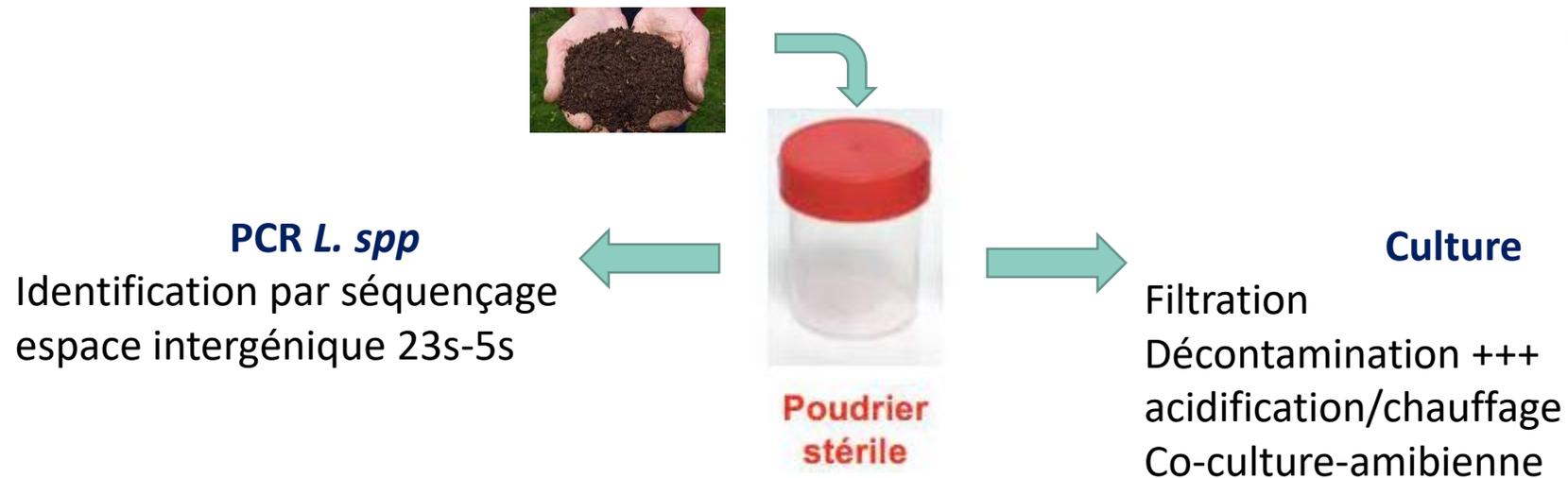
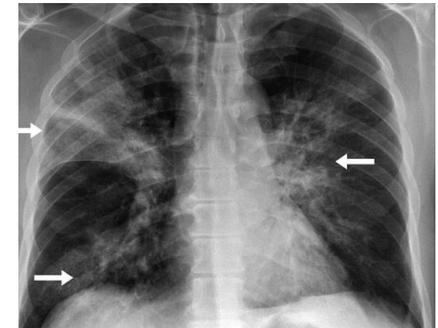
2019 : 56 comparaisons /1807 cas (3%)
 2020 : 42 comparaisons /1378 cas (3%)
2021 ≈ 105

Sites	%	Nb comparaisons
Collectivité de personnes âgées*	93	30
Etablissement hospitalier*	75	160
Domicile *	71	176
Etablissement de tourisme *	71	95
Autre *(spa, lieu de travail , loisirs ...)	65	11
Tar	7	113
Total	61	691

* Eau sanitaire

LEGIONELLA LONBEACHAE

- Légionelle endémique en Australie et Nouvelle-Zélande
- Facteurs de risque = exposition **terreaux, plantes et composts**
→ Rechercher notion de jardinage ou une exposition professionnelle
- 8 cas en France en 2021 (4 Sud Ouest, 3 Grand Est) , 5 en 2020 (majorité Sud Ouest)
→ Pneumopathie sévères
- Comparaisons au CNR possible si envoi de terreaux mais isolement difficile +++ (flore interférente)



DIAGNOSTIC – TYPAGE LEGIONELLA : TAKE HOME MESSAGES

34

- Diagnostic rapide : AgU en priorité mais intérêt ++ de la PCR sur prélèvement respi si suspicion et AgU négatif
- Prélèvement respiratoire indispensable
 - Souche isolée → envoi souche au CNR
 - Pas de souche isolée → envoi du prélèvement (plus de milieux de culture, techniques additionnelles, PCR...)
- Communication avec les partenaires (ARS, SpF, Laboratoires) +++ pour aboutir à une comparaison
- Techniques de typage = dominé à l'heure actuelle par le WGS +++
 - permet meilleure discrimination entre les souches
 - outils d'harmonisation en discussion au niveau européen



MERCI DE VOTRE ATTENTION

REMERCIEMENTS :

Pr S. Jarraud

Pr G. Lina

Dr G descours

Dr L. Beraud

C. Ginevra

Equipe technique du CNR légionelles

QUESTIONS ?

www.chu-lyon.fr



HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON



LEGIONELLES
Centre National de Référence

CENTRE DE BIOLOGIE NORD
Institut des agents infectieux
103 Grande rue de la croix-rousse
69317 LYON Cedex 04