

FICHE 8 - ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les analyses microbiologiques des échantillons et/ou des souches cliniques et des souches environnementales ont pour objectif de documenter le caractère groupé des cas et de préciser la source de contamination.

1 - Echantillons et souches cliniques

1.1 - Techniques disponibles pour le diagnostic et pour l'investigation des cas

Pour plus de 90 % des cas de légionellose, le diagnostic repose sur la positivité de la recherche d'antigènes urinaires. Cette méthode confirme le diagnostic mais ne permet pas de préciser la source de contamination (tableau 8.1).

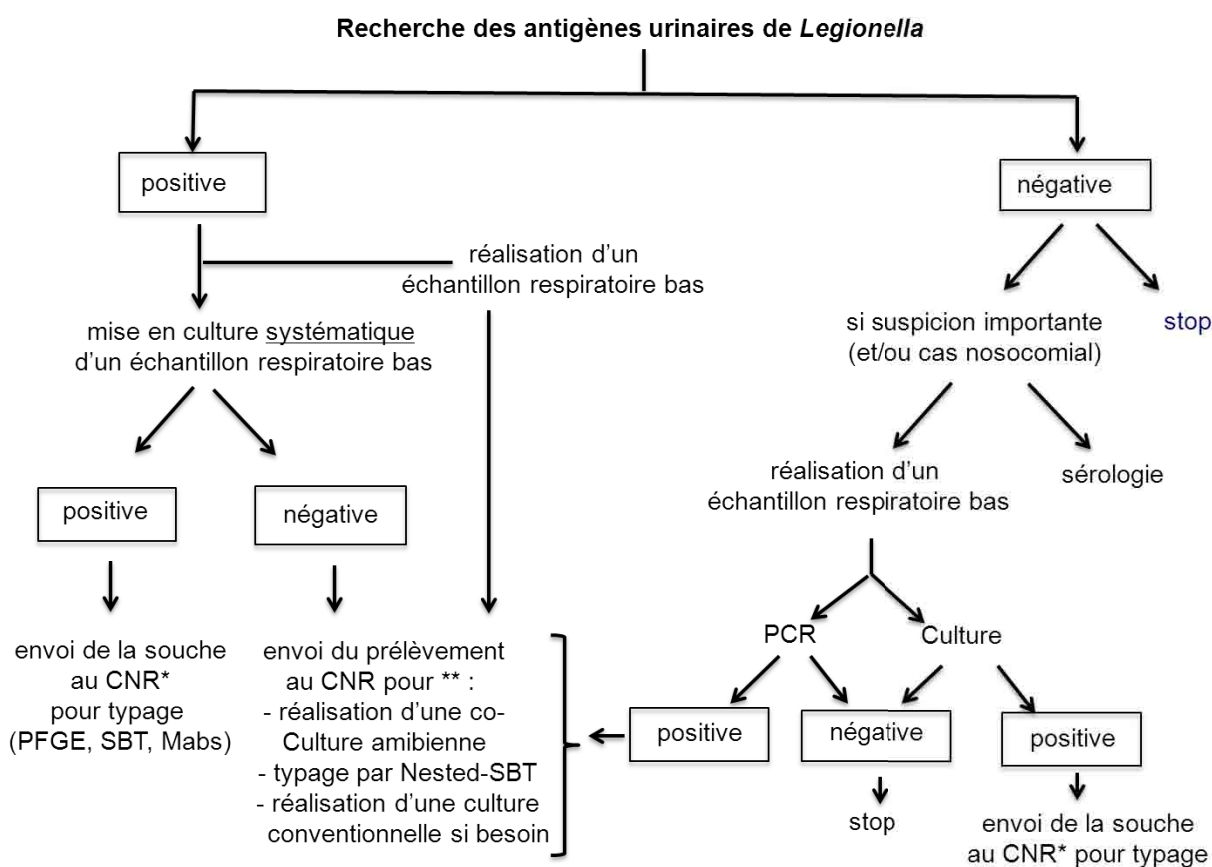
En présence d'un diagnostic de légionellose par antigénurie positive, et dans le but de compléter les données épidémiologiques avec des données microbiologiques, il est indispensable d'obtenir des prélèvements respiratoires bas (expectoration ou prélèvement invasif). A partir de ces prélèvements pourra être réalisée une mise en culture pour isolement de souches de légionelles. Si cette culture s'avère négative, un typage sur prélèvements respiratoires bas pourra alors être directement réalisé par la méthode de *Sequence-Based Typing* (Tableau 8.1 et Fig. 8.1) (cf. également Tableau 1.1).

Tableau 8.1. – Techniques pour le diagnostic et l'investigation des cas de légionellose

Prélèvements	Technique	Intérêt pour le diagnostic	Intérêt pour l'investigation des cas
Urines	Recherche des antigènes urinaires	+++	0
Prélèvements pulmonaires	Culture	++	+++
	PCR	+++ (<i>L. pneumophila</i> et <i>L. non pneumophila</i>)	0
	Nested-SBT	++ (que <i>L. pneumophila</i>)	+++
Sérum*	Sérologie	+/-	0
	PCR	+	+ (Nested-SBT)

* L'envoi des sérums doit être exceptionnel et toujours effectué après discussion avec le CNR.

Fig. 8.1. - Algorithme pour le diagnostic et l'investigation d'un cas de légionellose



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

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

*** la mise en culture d'un échantillon respiratoire bas est liée à l'état de santé du patient

1.2 - Choix et importance des échantillons respiratoires bas

- **Types d'échantillons** : l'aspiration trachéale est le meilleur prélèvement pour la recherche de légionelles par mise en culture. Le lavage broncho-alvéolaire, lorsqu'il peut être pratiqué, donne de très bons résultats. Néanmoins, l'expectoration est un prélèvement acceptable pour la recherche de légionelles par mise en culture et doit être réalisée si les autres types de prélèvements ne peuvent être effectués. Le choix du type de prélèvement sera dépendant principalement de l'état clinique du patient et du service dans lequel il est hospitalisé. Dans l'ensemble tous les échantillons respiratoires bas peuvent être ensemencés : aspiration bronchique, aspiration trachéale, liquide pleural, biopsie pulmonaire ...
- **Le prélèvement** doit être réalisé de préférence avant la mise en place du traitement antibiotique. Si le cas a été confirmé par une antigénurie positive, le prélèvement devra être réalisé même si une antibiothérapie a été débutée depuis quelques jours. La chance d'isoler des légionelles diminue avec la durée du traitement mais peut varier en fonction de la gravité de la légionellose. De plus l'obtention d'échantillons respiratoires bas peut être nécessaire

pour la réalisation de la technique de Nested-SBT (voir paragraphe 4-1 infra) qui est plus modérément influencée par l'antibiothérapie.

- **Si la culture est négative**, la coculture d'échantillons respiratoires bas sur tapis ambien est possible et sera directement réalisée par le CNR pour tous les cas de légionellose avec antigénurie positive.
- **Exceptionnellement et après avis du C NR-L**, si le recueil d'expectorations n'est pas possible, la technique de Nested-SBT peut être réalisée à partir d'un prélèvement de sérum (sensibilité de la méthode moindre qu'à partir d'un échantillon respiratoire bas).

1.3 - Envoi des échantillons au CNR-L et rôle des ARS

Dans le cadre d'investigation épidémiologique, les échantillons suivants peuvent être adressés au CNR-L :

- souches de légionelles ;
- prélèvements cliniques (échantillon respiratoire bas, sang prélevé sur tube sec ou tube EDTA) ;
- ADN extrait d'échantillons pulmonaires.

L'envoi des souches d'origine clinique de légionelles au CNR-L est réalisé de façon systématique par les laboratoires. L'envoi des prélèvements respiratoires bas est recommandé.

L'ARS a un rôle primordial :

- en stimulant la réalisation de prélèvements respiratoires bas en présence d'une antigénurie positive ;
- en rappelant au laboratoire l'importance de conserver les prélèvements après ensemencement (à +4°C de préférence ou à -20°C) ;
- en demandant l'envoi des échantillons respiratoires bas au CNR-L si la culture est négative ou si les laboratoires ne réalisent pas la culture de légionelles ;
- en demandant exceptionnellement et après accord du CNR, un sérum pour la réalisation de la technique de Nested SBT si la réalisation d'un prélèvement respiratoire bas est impossible.

Par ailleurs, l'ADN extrait d'échantillon respiratoire bas (à disposition si le laboratoire réalise des PCR *Legionella*) peut être envoyé en complément du prélèvement ou seul si la quantité de prélèvement est insuffisante.

L'envoi des prélèvements ou de l'ADN est réalisé à température ambiante.

2 - Souches environnementales

Seules les souches issues de prélèvements environnementaux entrant dans le cadre d'investigations pour lesquelles on dispose d'une (ou plusieurs) souche(s) clinique(s) ou d'échantillons respiratoires bas doivent être envoyées au CNR-L par le laboratoire qui a effectué les analyses.

L'envoi sera systématique pour les cas groupés et pour les cas isolés lorsqu'une source environnementale est fortement suspectée.

Critères d'envoi

- souches environnementales de même espèce et de même sérotype que les souches cliniques isolées (ex : Lp1) ; ne pas envoyer de *L. non pneumophila* en présence d'un ou de plusieurs cas à Lp1. Exceptionnellement, des souches environnementales de sérotype différent de *L. pneumophila* pourront être envoyées après discussion avec le CNR.
- investigation de cas groupés : le nombre de souches à envoyer peut être discuté avec le CNR-L (en général : 5 colonies par prélèvement, selon la norme NF T90-431) ; il pourra être demandé

au laboratoire de conserver d'autres colonies (n>5) jusqu'à la fin de l'enquête épidémiologique et environnementale.

En période d'alerte et en concertation avec les différents partenaires de l'investigation, les souches identifiées doivent être envoyées dès que possible (à J3 ou J5) sans attendre les résultats définitifs tels que préconisés à J10 par la norme NFT 90-431.

A noter : si les seuils de concentration en légionelles dans l'eau sont supérieurs aux seuils réglementaires, les souches doivent être conservées pendant 3 mois (Circulaire n°DGS/EA4/2010/448 du 21 décembre 2010, circulaire du 13 décembre 2004).

L'envoi des souches environnementales est réalisé à la demande de l'ARS et doit être accompagné de deux formulaires établis par le CNR (annexes 4 et 5) :

- un formulaire type à renseigner systématiquement par l'ARS à l'attention du CNR-L pour le typage et la comparaison des souches de légionelles d'origine clinique et environnementale ;
- un formulaire type à renseigner systématiquement par le laboratoire à l'attention du CNR-L pour l'envoi de souches environnementales pour typage moléculaire à la demande de l'ARS.

3 - Modalités réglementaires d'expédition des échantillons et des souches par les laboratoires

L'expédition des souches de légionelles d'origine clinique ou environnementale et des échantillons cliniques est soumise aux recommandations de l'ONU et sont encadrées par la réglementation du transport des matières dangereuses (ADR par route ou IATA par air).

Les légionelles appartiennent aux matières infectieuses de catégorie B lorsqu'elles sont cultivées. Elles sont classées dans la division 6.2 N°ONU 3373.

Les échantillons cliniques (par exemple échantillons pulmonaires) font partie de la catégorie B des matières infectieuses. Ils sont classés dans la division 6.2 affectés du N°ONU 3373 (échantillons de diagnostic ou échantillons cliniques).

Les modalités réglementaires d'expédition sont explicitées dans un guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2011–2012 publié par l'Organisation mondiale de la santé (WHO/HSE/IHR/2010.8 Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2011–2012).

4 - Typage moléculaire des légionelles

Des outils moléculaires sont utilisés pour établir des liens de clonalité entre des souches isolées de malades et des souches isolées de l'environnement permettant ainsi de préciser la source de la contamination. Ces mêmes marqueurs documentent également le caractère groupé des cas par comparaison de souches cliniques entre elles.

Ce typage moléculaire est réalisé en systématique sur toutes les souches d'origine clinique reçues au Centre national de référence des légionelles et sur les souches d'origine environnementale lorsqu'une source environnementale est fortement suspectée. Pour les cas isolés, la réalisation du typage moléculaire pour les souches environnementales isolées de sources suspectées d'exposition, est soumise à l'accord préalable de l'InVS. Sans cet accord, le typage de la (des) souche(s) environnementale(s) est à la charge du demandeur.

4.1- Méthodes de typage appliquées sur souche *L. pneumophila* séro groupe 1

Le typage est réalisé préférentiellement à partir d'une souche de *Legionella* car trois méthodes complémentaires peuvent alors être appliquées :

- **Le typage phénotypique (Mabs)** réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux par une technique d'immunofluorescence présente un faible pouvoir discriminant, car il regroupe l'ensemble des souches *Legionella pneumophila* séro groupe 1 en 9 sous-groupes. L'utilisation de ce marqueur a comme principal intérêt d'augmenter le pouvoir discriminant des deux autres marqueurs moléculaires utilisés lorsqu'il leur est associé. Les 9 sous-groupes sont France-Allentown, Knoxville, Philadelphia, Olda, Benidorm, Bellingham, Oxford, Heysham, Camperdown.
- **Le "Sequence Based Typing" (SBT)** est la méthode de référence européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes consensus comprenant 2 gènes de ménage (ou du métabolisme de base) *asd* (« aspartate- β -semialdéhyde dehydrogenase »), *neuA* (N-acylneuraminate cytidyltransferase) et 5 gènes associés à la virulence *flaA* (« Flagellum A »), *pilE* (piline de type IV), *mip* (« macrophage infectivity potentiator »), *mompS* (« outer membrane protein ») et *proA* (metalloprotéase au zinc). Un profil allélique correspond à la succession de numéros comprenant le numéro de chaque allèle (ou gène) séparé par une virgule dans un ordre prédéfini *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* et *neuA*. A chaque profil allélique correspond un « Sequence Type » (ST) (par exemple le profil allélique 1,4,3,1,1,1,1, correspond au ST1). L'assignation du profil allélique et du ST est obtenue en soumettant les données des séquences sur le site <http://www.evgli.org/>. Cette méthode présente un pouvoir discriminant d'environ 96 – 97 %.
- **L'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total** par électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE) présente un fort pouvoir discriminant (supérieur à 98 %) pour typer des souches *L. pneumophila* séro groupe 1. Le profil obtenu est appelé pulstotype. Les inconvénients majeurs de cette méthode sont que cette technique est longue et dépendante du laboratoire. En effet, d'une part, elle nécessite un repiquage de la souche et 4 jours consécutifs de technique et d'autre part l'interprétation basée sur la lecture de profils (obtenus après migration électrophorétique) n'est pas comparable d'un laboratoire à l'autre. Cependant cette méthodologie présente un grand avantage car elle présente un très fort pouvoir discriminant (supérieur à la technique SBT). De plus, cette technique utilisée depuis 1996 au CNR-L a permis de constituer une base de données contenant en 2012 plus de 9 000 profils de *L. pneumophila* d'origine clinique et environnementale dont plus de 4 000 profils de *L. pneumophila* séro groupe 1 d'origine clinique.

4.2- Méthodes de typage appliquées sur souche *L. pneumophila* séro groupe non 1 et *L. non pneumophila*

Pour les souches *L. pneumophila* séro groupe non-1, seules les techniques SBT et PFGE peuvent être appliquées.

Pour les souches *L. non pneumophila*, seule la méthode PFGE peut être appliquée mais celle-ci n'a pas été développée pour toutes les espèces. Le pouvoir discriminant de cette méthode n'est pas clairement identifié pour ces espèces.

4.3- Méthode de typage appliquée sur échantillon clinique

La technique de SBT peut être appliquée directement sur prélèvement clinique en s'affranchissant de l'isolement de souches. Cette méthode, nommée Nested-SBT, doit être privilégiée secondairement à la mise en culture du prélèvement et après échec de celle-ci (méthode phénotypique et PFGE non applicables sur prélèvement).

4.4 - Interprétation des données de typages épidémiologiques microbiologiques

Ces trois méthodes permettent d'identifier des cas groupés et de préciser les sources de contamination.

Cependant, l'identité des souches n'est pas suffisante pour établir une relation épidémiologique. Ceci est lié :

- au pouvoir discriminant de la technique (entre 96 % et 100 %),
- à l'existence de souches endémiques de *L. pneumophila* sérotype 1.

Une information sur l'épidémiologie clinique (activités du patient) est donc indispensable pour l'interprétation des données de typage microbiologique.

L'utilisation complémentaire des trois méthodes permet d'augmenter le pouvoir discriminant global des méthodes et de faciliter l'interprétation des résultats.

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

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

- les souches sporadiques possédant un profil (pulsotype - ST - sous-groupe) unique et spécifique, jamais identifié auparavant (~60 % des souches d'origine clinique isolées en France) ;
- les souches épidémiques ayant un profil spécifique à une épidémie et responsable de cas de légionellose regroupés dans le temps et l'espace ;
- les souches endémiques qui regroupent des isolats ayant des génotypes identiques (pulsotype – ST) responsables de cas sans lien spatio-temporel entre eux. Une souche est considérée comme endémique lorsque son génotype a été responsable (arbitrairement) de plus de 30 cas de légionellose (~30 % des souches cliniques) (Tableau 8.2) ;
- les souches présentant un génotype déjà répertorié dans la base de données du CNR-L mais responsables de moins de 30 cas de légionellose identifiés par culture, sans lien spatio-temporel entre eux, sont désignées « souche profil connu ». Les souches « profils connus » les plus fréquentes sont représentées dans le Tableau 8.3.

Trois souches endémiques prédominantes en France :

- la souche Paris (PFGE Paris, ST1) initialement décrite à Paris, présente une distribution mondiale [37-39]. Cette souche est responsable en 2011 en France d'environ 6 % des cas de légionellose pour lesquels une souche a été isolée ;
- la souche Lorraine (PFGE Lorraine, ST47) initialement isolée dans l'Est de la France est émergente depuis 2001. Elle est responsable en 2011 d'environ 13 % des cas de légionellose diagnostiqués par culture. De façon surprenante, cette souche est exceptionnellement isolée de l'environnement ;
- la souche Louisa (PFGE Louisa, ST23) nouvelle souche émergente en France, est responsable d'environ 11 % des cas pour lesquels une souche a été isolée.

Tableau 8.2 – Caractéristiques génotypiques et phénotypiques de six souches endémiques de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 françaises, mars 2013.

Souches endémiques	PFGE	STs	Sous-groupe Mabs*
Paris	Paris	1	Philadelphia,
Lorraine	Lorraine	47	France/Allentown
Louisa	Louisa	23	France/Allentown,
Mondial	Mondial	107	Philadelphia
Biarritz	Biarritz	40	France/Allentown
Pulsotype G	Pulsotype G	20	Knoxville

* Sous-groupes les plus fréquents. D'autres sous-groupes peuvent être identifiés, notamment pour les souches Paris et Louisa

Tableau 8.3 – Caractéristiques génotypiques et phénotypiques de neuf souches « profils connus » de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 les plus représentées en France, mars 2013.

Profils PFGE	ST	Sous-groupe Mabs
Pulsotype A	9	Knoxville
Pulsotype B	62	France/Allentown
Pulsotype C	96	France/Allentown
Pulsotype D	94	Knoxville
Pulsotype E	82	France/Allentown
Pulsotype F	259	Philadelphia
Pulsotype H	62	Knoxville
Pulsotype K	146	Knoxville
Souche Belfort	82	France/Allentown

Références

- [38] Cazalet C, *et al.* Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* 2008 Mar; 18(3): 431-41.
- [39] Cazalet C, *et al.* evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet.* 2004 Nov; 36(11): 1165-73.
- [40] Ginevra C, *et al.* Host-related risk factors and clinical features of community-acquired legionnaires disease due to the Paris and Lorraine endemic strains, 1998-2007, France. *Clin Infect Dis.* 2009 Jul 15; 49(2): 192-94.