



Étude de la non détectabilité de la souche de *Legionella pneumophila* Sequence Type 47 pulsotype Lorraine dans l'environnement

Pierre Cassier

► To cite this version:

Pierre Cassier. Étude de la non détectabilité de la souche de *Legionella pneumophila* Sequence Type 47 pulsotype Lorraine dans l'environnement. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10332 . tel-01315622

HAL Id: tel-01315622

<https://theses.hal.science/tel-01315622>

Submitted on 13 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 332-2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale « Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation »

DIPLOME DE DOCTORAT

soutenue publiquement le

17/12/2015

par

Pierre CASSIER

Etude de la non détectabilité de la souche de *Legionella pneumophila* Sequence Type 47 pulsotype Lorraine dans l'environnement

Directeur de thèse : Professeur Jérôme ETIENNE

JURY

Professeur Carmen BUCHRIESER, rapporteur

Docteur Didier CHE

Professeur Jérôme ETIENNE

Docteur Valeria GAIA, rapporteur

Docteur Sophie JARRAUD

Professeur Philippe VANHEMS

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à l'ensemble des membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je souhaiterais en premier lieu remercier les rapporteurs (doit-on dire rapporteuses ?) de cette thèse, Madame le Professeur Carmen Buchrieser et Madame le Docteur Valeria Gaia. J'admire votre immense connaissance des légionelles et je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je remercie très sincèrement le Docteur Didier Che d'avoir accepté de participer à ce jury. J'ai apprécié les différents échanges que nous avons eus et le duo que tu formais avec Christine était des plus sympathiques.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr Sophie Jarraud. Merci Sophie d'avoir été, avec Jérôme, à l'initiative de ce travail et de l'avoir suivi de près. J'ai pu mesurer tout au long de cette thèse tes grandes qualités humaines et scientifiques, et ta disponibilité chaque fois que nécessaire.

Je tiens également à remercier le professeur Philippe Vanhems qui m'a accueilli dans son service en 2009 lors de mon semestre inter-CHU et qui m'a toujours soutenu dans ce projet mais aussi dans celui du laboratoire d'hygiène hospitalière. Merci Philippe pour ta confiance. J'apprécie sincèrement de travailler à tes côtés. Ta sympathie, ta passion pour la recherche et ta motivation à nous faire publier, sont indéniables.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Professeur et doyen Jérôme Etienne. Vous avez su m'encourager à aller au bout de ce projet. J'ai énormément appris à vos côtés notamment l'art (car c'en est un) de la communication. Je suis admiratif de tout le travail et l'énergie que vous avez déployés pour l'amélioration des connaissances sur les légionelles. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage : ma tutrice, le Professeur Christine Lasset ainsi que le Professeur Patricia Doublet qui m'ont accompagné tout au long de la thèse.

Au cours de la thèse, j'ai navigué entre 3 sites : le laboratoire d'hygiène à HEH, le laboratoire de bactério au GHE et le laboratoire de bactério à Laënnec. Autant de rencontres enrichissantes !

Merci

- à tous les membres de l'unité d'Hygiène, mes chers voisins,
- à tous les membres du laboratoire : Michel, à qui je dois beaucoup, Pascale, Annie, Arlette, Aurélie, Nadia, Céline, Marie, Adeline, Marie-Emilie,
- aux chercheurs et chercheuses du 1^{er} étage,
- à tous les membres du CNR : Ghislaine, Christophe, Françoise, Monique, Maud, Anne-Gaëlle, Karine, Brigitte, Joëlle, Marielle, Jérémy, Dominique, Laetitia
- aux membres des labos de bactério du GHE et de Laënnec qui m'ont toujours accueilli chaleureusement, et particulièrement à Hélène, Yvonne, Olivier, Coralie et Yamina,
- à tous les membres des UHE des HCL

Enfin je remercie pour leur soutien et leurs encouragements tous mes amis, ma famille et mes proches.

Résumé en français

Les souches de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ST47 Lorraine sont actuellement responsables d'un nombre croissant de cas de légionelloses particulièrement dans le Nord de l'Europe. Cependant, elles ne sont retrouvées que très rarement dans l'environnement quand des investigations sont menées pour rechercher la source de cas de légionellose. Son environnement naturel reste donc méconnu.

Notre objectif était donc d'étudier le phénomène de non détectabilité de la souche ST47 dans l'environnement.

Nous avons observé que les traitements pré-analytiques (acidification, chauffage) pouvaient interférer avec les paramètres de culture pour certaines souches Lorraine environnementales, et que le milieu GVPC utilisé dans la norme NF T90-431 n'était pas recommandé pour la recherche des légionelles dans les prélèvements respiratoires, et donc potentiellement dans les prélèvements environnementaux.

Ainsi, la PCR spécifique ST47, développée en collaboration avec l'équipe de Tim Harrison (Londres, Royaume-Uni), peut constituer un outil de détection intéressant dans les différentes matrices environnementales pour identifier les réservoirs de la souche. Nous avons cherché à cibler ces réservoirs. Nous avons montré, d'une part, que les robinets pouvaient être des réservoirs potentiels de légionelles. D'autre part, les données clinico-épidémiologiques et géographiques des souches Lorraine ST47 ont montré que les cas survenaient essentiellement hors institution (hôpital, maison de retraite) et principalement dans le quart Nord-Est du pays.

L'amélioration des connaissances clinico-épidémiologiques et l'utilisation de la PCR spécifique ST47 devraient permettre, en s'affranchissant ou en améliorant les paramètres culturels, d'identifier les réservoirs environnementaux de cette souche.

Titre en anglais

Analysis of non detectability of the *L. pneumophila* Sequence Type 47 pulsotype Lorraine strain in environment

Résumé en anglais

The recently identified strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 belonging to Sequence Type (ST) 47 and pulsotype Lorraine are now responsible for an increasing number of Legionnaires' disease (LD) cases mainly in the North of Europe. The major paradox is that ST47 strains are extremely rarely detected in environmental samples when investigations to identify the source of ST47 associated LD cases are undertaken. Thus its environmental habitat is unknown. The aim of our work was to study the non-detectability of this strain in environmental samples.

Firstly, we have observed that pre-treatments (heat, acid) could interfere with recovery of an environmental ST47 Lorraine strain, and secondly, that GVPC medium imposed by the French standard NF T90-431, was not recommended for detection of *Legionella spp.* in clinical samples and potentially in environmental samples.

Thus, to detect and identify ST47 Lorraine strains from clinical and ultimately, environmental samples in order to find the potential source of infection, we developed a strain specific real-time PCR method, in collaboration with Tim Harrison's team (London, United Kingdom).

We have also sought to target these sources. Then, we have shown that *L. pneumophila* could be detected in aerosols of a tap water. Moreover, epidemiologic French data have demonstrated that most of the LD cases associated with ST 47 strains occurred mainly in North East and were mainly community-acquired.

Improved epidemiologic knowledge and the use of the strain specific real-time PCR should enable identification of environmental sources of ST47 Lorraine strain without culturing.

Mots clés en français

Environnement, non détectabilité, sources, PCR, ST47, souche Lorraine, *L. pneumophila*

Mots clés en anglais

Environment, non detectability, sources, PCR, ST47, Lorraine strain, *L. pneumophila*

Intitulé et adresse de l'unité ou du laboratoire

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

INSERM U1111 - CNRS UMR5308

Université Lyon 1, ENS de Lyon

Faculté de médecine Lyon Est - Claude Bernard

7 rue Guillaume Paradin, 69 372 Lyon Cedex 08

France

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	15
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1 Rappels sur <i>Legionella</i> et la légionellose	17
1.1 Le genre <i>Legionella</i>	17
1.1.1 Taxonomie.....	18
1.1.2 Caractéristiques génomiques	18
1.1.3 Habitat.....	21
1.1.4 Cycle réplicatif au sein des amibes libres et des protozoaires ciliés.....	22
1.1.5 Contamination chez l'homme.....	24
1.2 Principales caractéristiques clinico-épidémiologiques des légionelloses.....	25
1.2.1 Présentation clinique de la légionellose ou maladie des légionnaires	26
1.2.2 Mortalité des légionelloses.....	26
1.2.3 Système de surveillance de la légionellose en France.....	27
1.2.3.1 Le signalement (article R.3113-4 du code de la santé publique)	27
1.2.3.2 La notification (article R.3113-1 à 3 du code de la santé publique).....	27
1.2.3.3 Participation au réseau de surveillance européen	28
1.2.4 Définitions des cas de légionellose en France	28
1.2.4.1 Cas confirmé et cas probable.....	28
1.2.4.2 Cas nosocomial ou cas associé aux soins	29
1.2.4.3 Cas groupés.....	29
1.2.5 Facteurs de risque individuels	29
1.2.6 Incidence de la légionellose en France.....	31
2 Identification et détection des légionelles dans l'environnement	34
2.1 Méthodes d'identification et de détection	34
2.1.1 Culture.....	34
2.1.2 PCR.....	35
2.2 Typage moléculaire des souches.....	36
2.2.1 Méthode phénotypique	37
2.2.2 Méthodes génotypiques.....	38
2.2.2.1 Electrophorèse en champ pulsé	38
2.2.2.2 Sequence Based Typing	38
3 Réservoirs environnementaux des légionelles	39

3.1	Ecosystèmes naturels.....	39
3.1.1	Eaux douces.....	40
3.1.1.1	Les eaux de surface et eaux souterraines.....	40
3.1.1.2	Sources d'eau chaude / eaux thermales	40
3.1.1.3	Flaques d'eau / eaux de pluie.....	41
3.1.1.4	Eaux salées	41
3.1.1.5	Sols.....	41
3.2	Ecosystèmes artificiels.....	42
3.2.1	Tours aéro-réfrigérantes	42
3.2.2	Spa, Jacuzzi	43
3.2.3	Terreux, composts	43
3.2.4	Fontaines décoratives.....	44
3.2.5	Usines de retraitement de déchets	44
3.2.6	Brumisateurs / Humidificateurs d'air	44
3.2.7	Machines à glace.....	45
3.2.8	Climatisations	45
3.2.9	Fauteuils dentaires	46
4	Caractéristiques des souches ST47.....	52
4.1	Typage moléculaire	52
4.2	Réservoirs environnementaux	52
4.3	Génome.....	53
4.4	Place de la souche ST47 dans la légionellose	54
	TRAVAIL EXPERIMENTAL	55
1	Introduction.....	56
2	Effet des traitements pré-analytiques et du milieu de culture sur la cultivabilité de la souche Lorraine	57
2.1	Effet des traitements pré-analytiques.....	57
2.1.1	Matériels et méthode de la première étude	57
2.1.2	Résultats de la première étude	58
2.1.2.1	Conditions n°1 : eau stérile + milieu GVPC, tous inoculums.....	58
2.1.2.2	Conditions n°2 : Ringer + milieu GVPC, tout inoculums	59
2.1.2.3	Conditions n°3 : eau stérile + souches de référence, milieu BCYE ou GVPC, tous inoculum.....	60
2.1.3	Objectifs, matériels et méthode de la seconde étude.....	60
2.1.4	Résultats de la seconde étude.....	61
2.2	Effet du milieu GVPC.....	62

3	Mise au point d'un outil de détection spécifique de la souche Lorraine ST47 de <i>Legionella pneumophila</i>	67
4	Existence d'autres sources de contamination	78
5	Discussion, conclusion et perspectives	89
BIBLIOGRAPHIE.....		93
ANNEXES.....		109

Liste des figures

Figure 1. Couvertures du Time et de Newsweek – Août 1976 (Source : CDC)	17
Figure 2. Représentation du contenu génomique partagé et spécifique des souches analysées (42).....	21
Figure 3. Internalisation de <i>L. pneumophila</i> par <i>Acanthamoeba castellanii</i> par « coiling phagocytosis » après 30 minutes de co-incubation (58)	22
Figure 4. Cycle réplcatif des légionelles (59).....	23
Figure 5. Différentes étapes du cycle de réplication intracellulaire de <i>L. pneumophila</i> au sein de macrophages U937 (A, C, E) et d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (B, D, F). Les étapes de « coiling phagocytosis » (A, B), de formation du phagosome autour du réticulum endoplasmique rugueux (C, D) et de réplication intracellulaire dans le phagosome (E, F) sont représentées (59).	25
Figure 6. Taux d'incidence par sexe et par classe d'âge des cas de légionellose notifiés en France en 2013 (76).....	30
Figure 7. Nombre de cas de légionellose notifiés en France entre 1998 et 2014 (Source : InVS).....	31
Figure 8. Taux d'incidence de la légionellose en France entre 1998 et 2014 (Source : InVS)	32
Figure 9. Distribution géographique des cas de légionellose, taux d'incidence régional en 2013 en France métropolitaine (76).....	33
Figure 10. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose en France entre 1997 et 2014 (Source : InVS).....	33
Figure 11. Schéma d'interprétation du sous-groupage des <i>L. pneumophila</i> sg1 utilisant le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden plus l'anticorps monoclonal 3 de l' American Type Culture Collection (ATCC) (100).....	37
Figure 12. Les TAR sont des sources reconnues de légionellose et peuvent être à l'origine d'épidémies (67,140–144).	43
Figure 13. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°1 (* test paramétrique significatif, ** test non paramétrique significatif)	58
Figure 14. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°2 (* test paramétrique significatif, ** test non paramétrique significatif)	59
Figure 15. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°3	60

Figure 16. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions de la deuxième étude	61
--	----

Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces et sous-espèces du genre <i>Legionella</i>	19
Tableau 2. Caractéristiques génomiques de souches de <i>L. pneumophila</i> sg1 et de <i>L. longbeachae</i> , <i>L. fallonii</i> , <i>L. micadadei</i> et <i>L. hackeliae</i> (35,36,42)	20
Tableau 3. Détection des légionelles dans les eaux de surface, eaux souterraines et sources d'eau chaude.....	47
Tableau 4. Détection des légionelles dans les flaques d'eau, eaux de pluie et eaux salées	48
Tableau 5. Détection des légionelles dans les sols, les TAR et les spas.....	49
Tableau 6. Détection des légionelles dans les terreaux, les composts, les fontaines, les usines de traitement, les brumisateurs, les humidificateurs d'air et les machines à glace	50
Tableau 7. Détection des légionelles dans les systèmes de climatisation et les fauteuils dentaires	51
Tableau 8. Récapitulatif des investigations aux Pays-Bas et en France où une souche environnementale ST47 a été isolée	53
Tableau 9. Différence de cultivabilité des souches Lorraine et Paris selon les inocula dans les conditions n°1	59
Tableau 10. Composition en antibiotiques et antifongiques des milieux BMPA, MWY et GVPC.....	62
Tableau 11. Evaluation de la PCR ST47 sur des prélèvements respiratoires.....	68
Tableau 12 Comparaison de certaines caractéristiques clinico-épidémiologiques et géographiques entre les souches ST47 et les souches d'autres ST isolées en France entre 2008 et 2012	92

Liste des annexes

Annexe 1. Supplementary Table de la publication n°2 en cours.....	110
--	-----

Liste des abréviations

ACES	Acide N2-acétamido-amino-éthano-sulfonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARS	Agence régionale de santé
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BCYE	<i>Buffered charcoal yeast extract</i>
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CNRL	Centre national de référence des légionelles
CRP	Protéine C réactive
DO	Déclaration obligatoire
ECDC	<i>European center for disease prevention and control</i>
ECS	Eaux chaudes sanitaires
EDP	Protéines contenant des domaines eucaryotes
Eldsnets	<i>European Legionnaires disease surveillance network</i>
ELP	<i>Eukaryotic-like proteins</i>
G+C	Guanine + cytosine
GVH	Greffon contre l'hôte
GVPC	Glycine vancomycine polymyxine B cycloheximide
IF	Immunofluorescence
InVS	Institut de veille sanitaire
ISO	<i>International standard organization</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LQ	limite de quantification
Mabs	<i>Monoclonal antibodies</i>
Mb	Méga paires de base
MLST	<i>Multi locus sequence typing</i>
MWY	<i>Modified Wadowsky and Yee</i>
NF	Norme française
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potentiel hydrogène
SBT	<i>Sequence based typing</i>
Sg1	Sérogroupe 1
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
ST	<i>Sequence type</i>
TAR	Tour aéro-réfrigérante
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFC	Unité formant colonie
UG	Unité génome
VBNC	Viable mais non cultivable
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>

INTRODUCTION

La légionellose est une infection pulmonaire due à une bactérie intracellulaire à Gram négatif appartenant au genre *Legionella* spp. largement représentée dans les environnements hydriques. *Legionella pneumophila* est l'agent responsable de plus de 90% des cas et parmi les 16 sérogroupes, le séroroupe 1 (sg1) a la prévalence la plus élevée. Cette pneumonie survient après inhalation d'aérosols contaminés par des *Legionellae*. Les cas de légionellose sporadiques ou épidémiques sont associés à diverses sources : réseaux d'eau chaude sanitaire, spas, tours aéroréfrigérantes (TAR), fontaines décoratives (1).

Pour établir un lien éventuel entre les souches cliniques et environnementales de *L. pneumophila* sg1, différents systèmes de typage moléculaire sont utilisés. Ces outils moléculaires sont également utiles pour étudier la répartition spatio-temporelle de souches (2–6). La 1^{ère} méthode utilisée par la qualité de son pouvoir discriminant (supérieur à 98 %) est l'analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ou PFGE). Le Sequence Based Typing (SBT) est, quant à elle, la méthode de référence européenne pour le typage. Celui-ci peut être réalisé sur souche (7,8) après extraction de l'ADN ou directement sur le prélèvement respiratoire, on parlera dans ce cas de nested-SBT (9,10). De même que les souches de sg1 sont impliquées majoritairement en pathologie humaine, certains sequence type (ST) sont retrouvés plus fréquemment chez les patients. Ainsi, des données internationales de typage regroupant 3600 isolats et 36 pays, ont montré que 46% des cas (non liés entre eux i. e. non épidémiques) étaient associés à 6 ST uniquement : ST1, ST23, ST37, ST42, ST47 et ST62 (11). Les souches ST47 présentent également un même pulsotype dit Lorraine.

Les souches ST47 Lorraine sont actuellement responsables d'un nombre croissant de cas de légionelloses particulièrement dans le nord de l'Europe (2,4,12,13) mais cette souche a également été isolée au Canada (14). Cependant, elles ne sont retrouvées que très rarement dans l'environnement quand des investigations sont menées pour rechercher la source de cas de légionellose (15). Son environnement naturel reste donc méconnu.

L'objectif de notre travail a été d'identifier les causes éventuelles de la non-détectabilité de la souche ST47 dans l'environnement : sensibilité à certains paramètres de culture, existence d'autres sources de contamination, et de formuler un outil de détection spécifique plus performant que les méthodes actuellement utilisées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Rappels sur *Legionella* et la légionellose

Durant l'été 1976 à Philadelphie, une épidémie de pneumonie a impliqué 182 personnes dont 29 morts et a fait les titres de la presse américaine (Figure 1). Tous les cas répertoriés avaient fréquenté l'hôtel Bellevue-Stratford et étaient majoritairement des anciens combattants (ou membres de leur famille) présents au 58ème congrès de la légion de l'Etat de Pennsylvanie (15).



Figure 1. Couvertures du Time et de Newsweek – Août 1976 (Source : CDC)

En décembre 1976, la bactérie responsable a été mise en évidence par le microbiologiste Joseph McDade, spécialiste des rickettsies (16). En janvier 1977, le CDC (*centers for disease control and prevention*) annonçait la découverte d'une nouvelle bactérie *Legionella pneumophila* dont le nom faisait référence aux victimes de l'épidémie. Bien que le système de climatisation de l'hôtel où résidaient les congressistes ait été suspecté dans cette épidémie, ce n'est qu'en 1982 que la microbiologiste Janet E. Stout du Pittsburgh Veterans Affairs Medical Center a mis en évidence la bactérie dans les flaques d'eau, et par la suite dans les systèmes de distribution d'eau des immeubles (17,18).

1.1 Le genre *Legionella*

Le genre *Legionella* a été ainsi défini et correspond à des bacilles aérobies à Gram négatif (cette coloration restant très faible), intracellulaires facultatifs, non capsulés et non sporulants, mobiles par un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale.

1.1.1 Taxonomie

Après l'isolement de la bactérie responsable de la maladie des légionnaires, les analyses phénotypiques et génotypiques ont abouti à la création de l'ordre des Légionellales et la famille des *Legionellaceae*. Bien que certains auteurs aient ensuite proposé de diviser la famille en trois genres distincts (19), *Legionella*, *Fluoribacter* et *Tatlocki*, en raison de la difficulté d'interprétation des données de l'hybridation ADN-ADN, seul le genre *Legionella* a été maintenu. Sur la base des séquences de l'ARN (acide ribonucléique) ribosomal 16S, le genre *Legionella* est proche des genres *Coxiella* et *Wolbachia* également membres de la sous-classe γ -2 des protéobactéries de Woese (20). Il regroupe plus de 60 espèces et sous-espèces et plus de 70 sérogroupes (21) (Tableau 1). Les espèces nouvellement identifiées sont *L. impletisoli* et *L. yabuuchiae* en 2007 (22), *L. dresdenensis* en 2010 (23), *L. cardiaca*, *L. massiliensis*, *L. tunisiensis*, *L. nagasakiensis*, *L. steelei* en 2012 (24–27), et *L. norrlandica* en 2015 (28).

Une trentaine d'espèces de *Legionella* a été isolée en pathologie humaine. Parmi elles, *L. pneumophila* sg 1 est rapportée dans 85 à 90% des cas pour lesquels une souche a été isolée en Europe et aux Etats-Unis (29,30).

1.1.2 Caractéristiques génomiques

En 2004, les premières séquences génomiques complètes des souches Paris, Lens (31), et Philadelphia (32) de *L. pneumophila* sg1 ont été publiées. Depuis, d'autres souches, Corby (33), 130b (34), Alcoy (35), Lorraine et HL 0604 1035 (36) ont également été séquencées. Plus récemment, les génomes de souches d'autres sérogroupes (4, 6 et 12) ont été décrits (37–39). Parallèlement, depuis 2010, les génomes d'autres espèces telles que *L. longbeachae*, *L. oakridgensis*, *L. micdadei*, *L. hackeliae* et *L. fallonii* ont été analysés en détail (40–42).

Tableau 1. Espèces et sous-espèces du genre *Legionella*

Espèces décrites en pathologie humaine	Espèces uniquement décrites dans les environnements hydriques
<i>L. anisa</i>	<i>L. adelaidensis</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. beliardensis</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. brunensis</i>
<i>L. cardiaca</i>	<i>L. busanensis</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. cherrii</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. drancourtii</i>
<i>L. feeleeii</i>	<i>L. dresdenensis</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. drozanskii</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. jordanis</i>	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. lansingensis</i>	<i>L. fallonii</i>
<i>L. londiniensis</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. longbeachae</i>	<i>L. genomospecies</i>
<i>L. maceachernii</i>	<i>L. gratiana</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. gresilensis</i>
<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. impletisoli</i>
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. israelensis</i>
<i>L. pittsburghensis</i>	<i>L. lytica</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	<i>L. massiliensis</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. rubrilucens</i>	<i>L. norrlandica</i>
<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. pittsburghensis</i>
<i>L. steelei</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. waltersii</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. worsleiensis</i>	<i>L. shakespearei</i>
	<i>L. spiritensis</i>
	<i>L. steigerwaltii</i>
	<i>L. taurinensis</i>
	<i>L. tunisiensis</i>
	<i>L. yabuuchiae</i>

L'équipe de Carmen Buchrieser a comparé les séquences génomiques complètes de différentes espèces de *Legionella* (36,42). Ces génomes sont composés d'un seul chromosome circulaire et présentent entre 0 et 2 plasmides. Le génome des souches de *L. pneumophila* a une taille d'environ 3,5 Mb (millions de paires de base), de même que ceux de *L. hackeliae* et *L. micdadei*. Les génomes de *L. fallonii* et *L. longbeachae* sont plus grands puisqu'ils atteignent plus de 4 Mb. Le contenu en Guanine + Cytosine (G+C%) semble très homogène au sein du genre *Legionella* puisqu'il est d'environ 39%. Par ailleurs, l'ordre des gènes est relativement bien conservé néanmoins il subsiste des zones de plasticité (îlots de pathogénicité, gènes de mobilité). Le nombre de gènes varie de 3 000 à 3 700 selon les espèces (Tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques génomiques de souches de *L. pneumophila* sg1 et de *L. longbeachae*, *L. fallonii*, *L. micdadei* et *L. hackeliae* (35,36,42)

<i>L. pneumophila</i> sg1							
	Philadelphia	Paris	Lens	Corby	Alcoy	Lorraine	HL 0604 1035
Taille du chromosome (Mb)	3,4	3,5	3,4	3,6	3,5	3,5	3,5
G+C %	38	38	38	38	38	38	38
Nombre total de gènes	3 031	3 123	2 980	3 237	3 191	3 117	3 132
Nombre de séquences codantes	2 999	3 078	2 921	3 193	3 178	3 080	3 079
Plasmides	0	1	1	0	0	1	0

	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. fallonii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. hackeliae</i>
	NSW150	ATCC700992	ATCC33218	ATCC35250
Taille du chromosome (Kb)	4,1	4,2	3,3	3,4
G+C %	37	38	40	39
Nombre total de gènes	3 660	3 673	3 076	3 185
Nombre de séquences codantes	3 571	3 601	3 009	3 103
Plasmides	1	2	0	1

L'analyse comparée de 7 génomes de *L. pneumophila* avec ceux de *L. micdadei*, *L. hackeliae*, *L. fallonii* et *L. longbeachae* des génomes a révélé qu'il existe un core génome de 1 388 gènes orthologues (Figure 2A). Ce core génome est de 1 415 gènes orthologues si la souche Paris est choisie pour l'espèce *pneumophila* (Figure 2B). Au sein de cette espèce, l'analyse comparée de 6 génomes a montré un core génome de 2 434 gènes orthologues et

environ 10% de gènes spécifiques pour chaque souche. Une partie du génome de *L. pneumophila* est donc spécifique d'une souche.

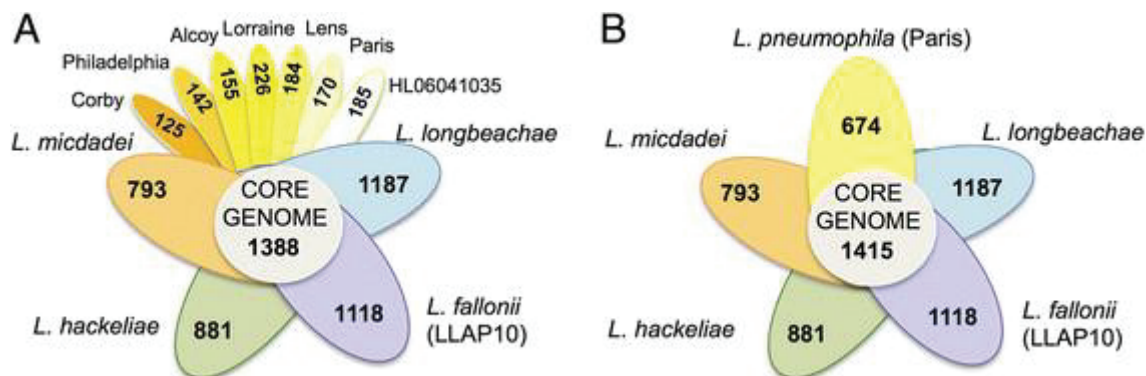


Figure 2. Représentation du contenu génomique partagé et spécifique des souches analysées (42)

Une autre caractéristique, mise en évidence par l'analyse du génome de *L. pneumophila*, est la présence en grand nombre de gènes codant une grande variété de protéines similaires à des protéines eucaryotes, appelées « eukaryotic-like proteins » (ELP), de même que des protéines contenant des domaines eucaryotes (EDP). Les ELP et EDP semblent impliquées dans le détournement des fonctions de la cellule hôte à l'avantage des légionelles (43–45).

1.1.3 Habitat

Les légionelles colonisent de façon ubiquitaire de très nombreux milieux hydriques naturels: eaux douces de surface (46), eaux thermales (47), sols humides (48), etc. La bactérie peut également coloniser des sites hydriques artificiels lorsque les conditions de son développement sont réunies et peut ainsi proliférer dans différentes installations à risque du fait de la production potentielle d'aérosols telles que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS), les tours aéroréfrigérantes (TAR) et d'autres installations génératrices d'aérosols. Nous détaillerons plus loin ces différents réservoirs et la détection des légionelles dans ceux-ci.

L'un des paramètres qui influe fortement sur le développement des légionelles dans l'eau est la température. Leur croissance est effective entre 20 et 50°C, avec une multiplication préférentielle entre 25 et 45°C et un optimum à 35°C (49). Au-delà de 50°C, leur croissance est limitée. Elles ne prolifèrent pas et elles sont détruites au-delà de 60°. Quant au pH, bien que la bactérie tolère une large gamme de pH (5,5 – 8,5), son pH optimal de croissance est

de 6,9 (50). Par ailleurs, d'autres facteurs favorisent son développement dans les matrices hydriques artificielles : les bras morts et les boucles entraînant la stagnation de l'eau, une eau dure, la présence de tartre, la corrosion mais aussi la présence de résidus métalliques tels que le fer et le zinc, et la présence d'amibes libres (49,51–53).

1.1.4 Cycle réplcatif au sein des amibes libres et des protozoaires ciliés

Plus d'une vingtaine d'espèces d'amibes libres et de protozoaires ciliés permettent la survie et la multiplication de *Legionella*. Les genres amibiens *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria* sont les plus fréquemment associés aux légionelles contaminant les réseaux d'eau, et particulièrement à *L. pneumophila* (54–56). Il s'agit d'un phénomène d'endoparasitisme décrit initialement par Robowtham en 1980 (57). Les légionelles, pour survivre, pénètrent dans ces micro-organismes eucaryotes soit par encerclement de couches successives d'un seul pseudopode, phénomène appelé « coiling phagocytosis » (Figure 3), soit par phagocytose classique à 2 pseudopodes.

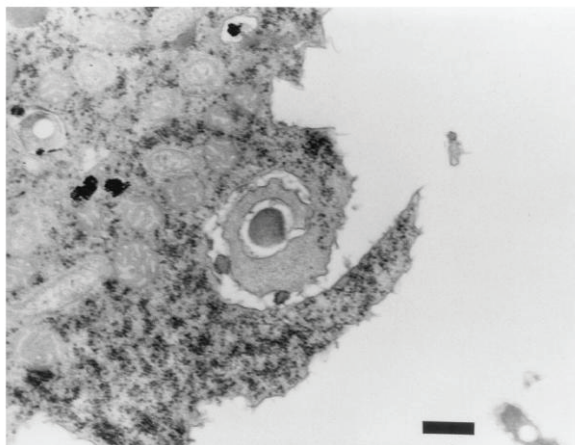


Figure 3. Internalisation de *L. pneumophila* par *Acanthamoeba castellanii* par « coiling phagocytosis » après 30 minutes de co-incubation (58)

Une fois internalisées, elles sont ensuite capables de détourner les systèmes de destruction habituellement mis en place par ces hôtes pour digérer les bactéries, grâce à leur principal système de virulence, le système de sécrétion de type IV ou Dot/Icm (*defective for organelle trafficking / intracellular multiplication*), puis se multiplient dans des vacuoles. Après 36 à 48

heures d'infection, la vacuole de phagocytose emplit la quasi-totalité de la cellule hôte et contient un nombre important de bactéries qui vont être libérées dans l'environnement sous forme d'une vésicule remplie de légionelles, ou sous forme libre par lyse de l'amibe. Les légionelles vont ainsi pouvoir de nouveau coloniser des biofilms, infecter d'autres amibes ou contaminer l'homme (Figure 4).

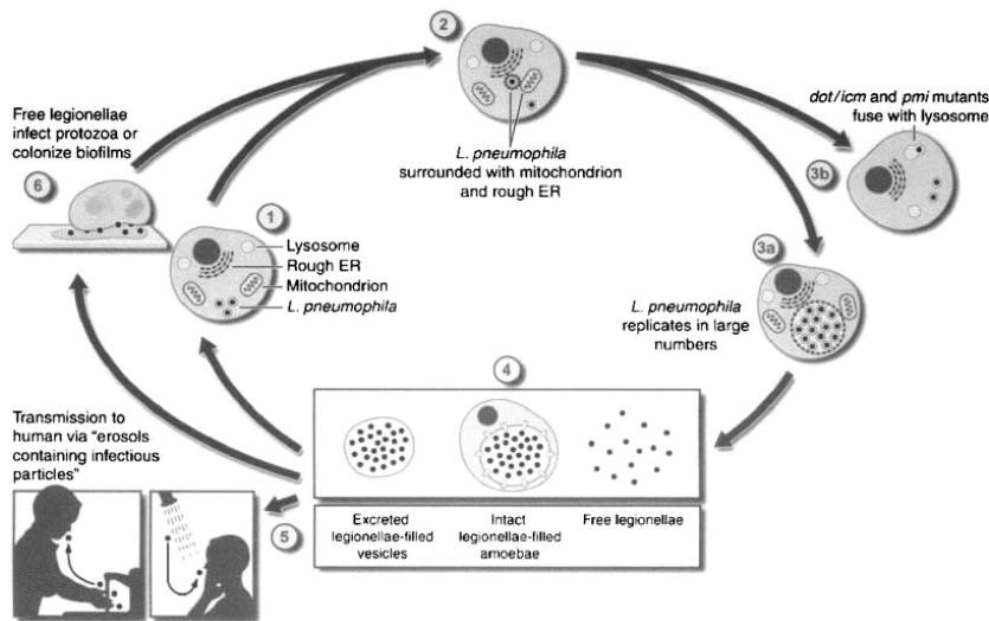


Figure 4. Cycle réplcatif des légionelles (59)

Au cours de ce cycle de multiplication intra-amibienne, les légionelles vont alterner entre une forme réplcative en début de cycle, et une forme transmissive, où les légionelles sont libérées sous forme de vésicules infectieuses et pourraient donc représenter la forme vectrice de l'infection à légionelles (60). Par ailleurs, les légionelles issues d'une multiplication intracellulaire ont été décrites comme plus virulentes pour la réinfection de cellules hôtes en comparaison à des bactéries cultivées sur milieux gélosés. Ainsi, étant leur hôte naturel, les amibes libres confèrent une excellente protection aux légionelles et leur permettent de résister davantage à des conditions environnementales difficiles telles que : températures extrêmes, dessiccation, biocides, désinfectants. Ceci constitue ainsi un moyen de (re)colonisation rapide des réseaux d'eau (54). De plus, les amibes permettraient la reviviscence de souches de légionelles toujours viables mais non cultivables (état dit VBNC), comme l'ont montré les travaux de Steinert *et al.* et Dusserre *et al.* (61,62).

1.1.5 Contamination chez l'homme

Alors que les protozoaires constituent les hôtes naturels pour les légionelles, l'infection des cellules phagocytaires humaines demeure opportuniste. Néanmoins, le mécanisme d'infection des cellules phagocytaires humaines, et notamment des macrophages pulmonaires, apparaît comme tout à fait superposable à celui des amibes (Figure 5).

La contamination des alvéoles pulmonaires et l'infection des macrophages alvéolaires et des pneumocytes par les bactéries ne sont complètement démontrées que par l'inhalation d'aérosols contaminés.

La présence de légionelles dans l'eau n'est pas une condition suffisante pour provoquer la maladie.

Les trois facteurs suivants doivent au moins être réunis :

- contamination de l'eau par des *Legionella* pathogènes (aucune relation dose-effet n'a été quantifiée),
- aérosolisation sous forme de gouttelettes de taille inférieure à 5 µm aérosols contaminés par *Legionella*,
- exposition de personnes et en particulier de personnes réceptives à l'infection (inhalation de micro-gouttelettes d'eau contaminée dans les poumons) dans l'environnement d'une installation contaminée.

Cependant, la possibilité d'une colonisation oropharyngée, notamment chez les sujets immunodéprimés, est parfois discutée (63,64).

Enfin, aucun cas de transmission interhumaine n'a été rapporté ce qui ne justifie aucun isolement respiratoire pour les patients infectés.

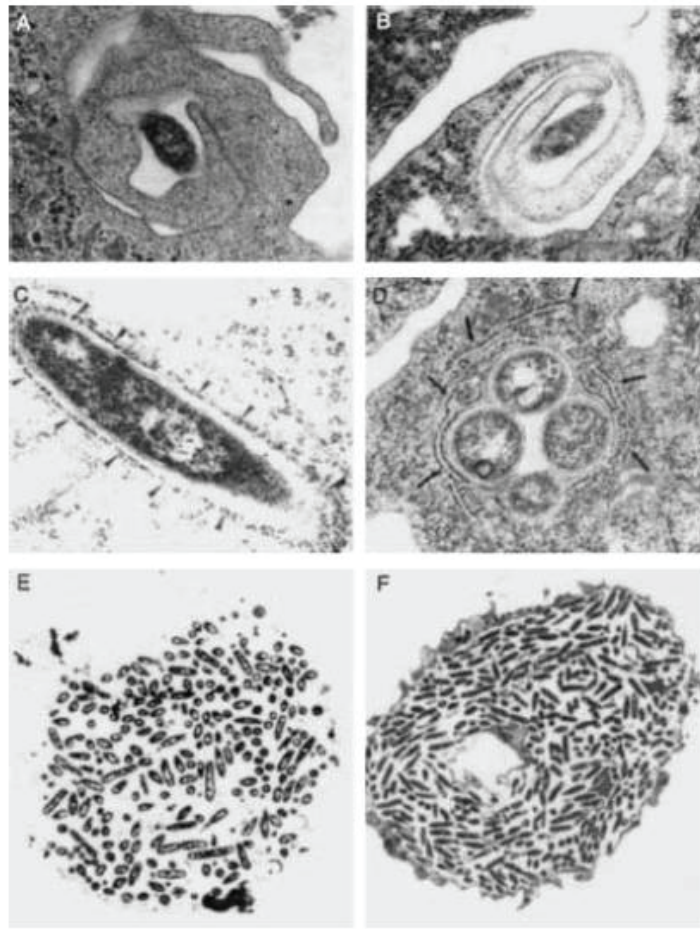


Figure 5. Différentes étapes du cycle de réplication intracellulaire de *L. pneumophila* au sein de macrophages U937 (A, C, E) et d'*Acanthamoeba polyphaga* (B, D, F). Les étapes de « coiling phagocytosis » (A, B), de formation du phagosome autour du réticulum endoplasmique rugueux (C, D) et de réplication intracellulaire dans le phagosome (E, F) sont représentées (59).

1.2 Principales caractéristiques clinico-épidémiologiques des légionelloses

Le terme légionellose regroupe trois présentations cliniques distinctes : la maladie des légionnaires, les formes extra-pulmonaires et la fièvre de Pontiac. En pratique, le terme « légionellose » est réservé à la maladie des légionnaires. Nous nous intéresserons qu'à la légionellose *stricto sensu*.

1.2.1 Présentation clinique de la légionellose ou maladie des légionnaires

Le diagnostic de légionellose repose sur l'existence d'une pneumonie de gravité variable cliniquement et radiologiquement confirmée. L'incubation de la maladie est habituellement comprise entre 2 et 10 jours (65), et cet intervalle est officiellement reconnu au niveau européen et français. Cependant, aux Etats-Unis, le CDC a étendu à 14 jours la durée d'incubation suite à l'épidémie du Pittsburgh VA Hospital (66). Des incubations plus longues allant de 16 à 24 jours ont également été rapportées dans la littérature (12,67,68). Le tableau clinique s'installe généralement de façon progressive en 2 à 3 jours. Comparé à une pneumonie à pneumocoque, il associe une fièvre élevée ($>39^{\circ}\text{C}$) ainsi que l'échec d'un traitement probabiliste par β -lactamines. Ces deux paramètres ont été retrouvés comme associés de manière significative à une légionellose (69,70). De plus, des troubles neurologiques (confusion) signant une atteinte encéphalitique et des signes digestifs à type de diarrhée, sont régulièrement observés au cours des légionelloses (69–72).

Les examens d'imagerie pulmonaire montrent une atteinte mono ou bilatérale, généralement non systématisée, asymétrique, alvéolaire ou alvéolo-interstitielle. La radiographie ne peut distinguer les pneumonies à *Legionella* des pneumonies à étiologie bactérienne autre.

La légionellose peut se compliquer d'une insuffisance respiratoire, d'une insuffisance rénale aiguë et d'une rhabdomyolyse. Enfin, la formation d'abcès pulmonaires est une complication rare et retrouvée quasi exclusivement chez des patients immunodéprimés (cancer, hémopathie, traitement par corticoïdes, patient greffé) ou présentant une pathologie auto-immune (73–75).

1.2.2 Mortalité des légionelloses

Le taux de mortalité rapporté par la surveillance des cas en France était de 11% en 2012 (données InVS) et de 12,2% en 2013 (76). Ce taux, relativement stable depuis une dizaine d'année, reste élevé malgré une prise en charge améliorée par le développement de tests urinaires permettant un diagnostic rapide (77). On retrouve un taux similaire (12,8%) dans une publication américaine rapportant la surveillance des cas à New York entre 2002 et 2011 (78). Cependant, le taux observé pour les cas nosocomiaux était très supérieur à celui relevé pour les cas communautaires, respectivement 35,3% et 10,2%. Cette différence peut s'expliquer par la survenue de légionellose chez des patients immunodéprimés. La littérature rapporte chez ces patients une mortalité de plus de 25% (79,80). De plus les cas nosocomiaux sont souvent plus sévères et peuvent nécessiter une hospitalisation en

réanimation, où dans ce contexte le taux de mortalité peut atteindre 33% (81). Il s'agit en effet d'un facteur de mauvais pronostic. Une étude française portant sur 540 cas de légionellose communautaire montrait, en analyse multivariée, que le séjour en réanimation était un des 6 facteurs associés à la mortalité, de même que l'âge, le sexe féminin, une corticothérapie, l'apparition d'une insuffisance rénale et une CRP (protéine C réactive) > 500 mg/L.

1.2.3 Système de surveillance de la légionellose en France

La déclaration obligatoire (DO) de la légionellose a été instituée en 1987. Ce système est coordonné et centralisé au niveau national par l'Institut de veille sanitaire (InVS). En 1997, le système de surveillance a été renforcé et le diagnostic par détection des antigènes solubles urinaires a été ajouté aux critères de déclaration. En 2003, le système de la DO a été actualisé avec la mise en place du signalement et de la notification des maladies à DO. En 2011, une nouvelle fiche de DO a été diffusée avec introduction du diagnostic par PCR. Cette fiche est disponible sur le site de l'InVS ainsi que les modalités de déclaration (Figure 6).

1.2.3.1 Le signalement (article R.3113-4 du code de la santé publique)

Les médecins et les biologistes qui diagnostiquent un cas de légionellose doivent le signaler sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie, courriel) au médecin de l'Agence régionale de santé (ARS) de leur lieu d'exercice pour initier l'enquête le cas échéant en fonction des premiers éléments disponibles.

1.2.3.2 La notification (article R.3113-1 à 3 du code de la santé publique)

Le signalement est suivi d'une notification sur une fiche spécifique (DO) et permet à l'ARS de réaliser une enquête afin d'identifier les expositions à risque, de rechercher d'autres cas liés à ces expositions et de prendre, le cas échéant, les mesures environnementales de contrôle appropriées. L'ARS transmet les fiches validées à l'InVS.

Dans le cas particulier où le diagnostic de légionellose est réalisé dans une région différente de celle du domicile du patient (légionellose survenue au cours d'un déplacement), l'ARS destinataire du signalement est en charge des investigations et transmet la fiche de notification à l'ARS de la région du domicile du patient. S'il s'agit d'un patient domicilié hors

de France, les informations seront transmises aux autorités du pays de domicile du patient via l'InVS.

Au niveau national, le système de surveillance par la DO a pour objectif de connaître la fréquence, les tendances et les principales caractéristiques épidémiologiques de cette maladie et d'identifier des cas groupés afin d'orienter les mesures de prévention et de contrôle.

1.2.3.3 Participation au réseau de surveillance européen

La France participe depuis 1992 au réseau de surveillance européen des cas liés au voyage Eldsnet (European Legionnaires Disease Surveillance Network) basé à l'ECDC (European Center for Disease Prevention and control) à Stockholm. Le correspondant de ce réseau en France est l'InVS. Tout cas de légionellose ayant voyagé pendant la période des 10 jours avant la date de début des signes est notifié à ce réseau en mentionnant le(s) nom(s) de(s) l'établissement(s) fréquenté(s) et les dates de séjour. Ceci s'applique à tous les cas, que le voyage soit interne ou externe au pays concerné. Les autorités nationales du pays sont alors informées. Pour les cas isolés, la réglementation en vigueur dans le pays s'applique. Aucune transmission d'information sur les investigations n'est requise. Pour les notifications de cas groupés la procédure de «Cluster Eldsnet» est appliquée.

Si ces établissements sont dans des pays hors Union européenne, les autorités nationales du pays sont informées via le réseau de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

1.2.4 Définitions des cas de légionellose en France

1.2.4.1 Cas confirmé et cas probable

Toute personne présentant une pneumopathie accompagnée d'au moins un des signes biologiques suivants:

Cas confirmé :

- isolement de *Legionella spp.* dans un prélèvement clinique,
- augmentation du titre d'anticorps (x4) avec un 2ème titre minimum de 128,
- présence d'antigènes solubles urinaires.

Cas probable :

- titre(s) d'anticorps ≥ 256 ,
- PCR positive

1.2.4.2 Cas nosocomial ou cas associé aux soins

Un cas de légionellose est défini comme cas nosocomial certain lorsque le patient a séjourné dans un établissement de santé de façon continue pendant la totalité de la période supposée d'exposition (période de 10 jours).

Si le séjour dans l'établissement de santé ne couvre pas la totalité de la période supposée d'exposition, le cas est considéré comme un cas nosocomial probable.

Si le cas de légionellose peut être lié à des soins pratiqués hors établissement de santé, le cas sera identifié comme possiblement «associé aux soins».

1.2.4.3 Cas groupés

Au moins deux cas, survenus dans un intervalle de temps et d'espace géographique susceptible d'impliquer une source commune de contamination.

Ces notions de temps et d'espace sont à discuter et à déterminer en fonction de chaque situation.

- Temps : jour, semaine, mois: il est recommandé de ne pas étendre la recherche de cas au-delà des deux ans précédant le cas signalé.

- Espace géographique

- établissements recevant du public : hôtel, camping, établissement thermal, établissements d'hébergement pour personnes âgées, spas, etc,

- zone géographique : quartier, commune, agglomération, etc.

1.2.5 Facteurs de risque individuels

Certains facteurs de risque individuels, permanents ou temporaires, peuvent induire une plus grande sensibilité au risque d'infection (69,72,77,82) :

- l'âge supérieur à 50 ans, l'incidence augmentant avec l'âge (Figure 7)

L'âge médian retrouvé dans la plupart des études se situe autour de 60 ans. En France, entre 1998 et 2008, l'âge médian était de 61 ans avec un intervalle de 0 à 103 ans (77), alors qu'en 2013 l'âge médian était de 65 ans avec un intervalle de 15 à 98 ans (76) ; malgré des intervalles incluant des patients de moins de 15 ans, il est à noter que les cas de légionellose demeurent rares chez les sujets jeunes et exceptionnels en pédiatrie (77,83–85),

- le sexe masculin (75% des cas),
- le tabagisme (45% des cas),
- le diabète (15% des cas),
- les pathologies chroniques cardiaques et/ou pulmonaires, l'insuffisance rénale,
- les traitements par anti-TNF (86).

Selon les études, l'alcoolisme n'est pas toujours retrouvé comme un facteur de risque.

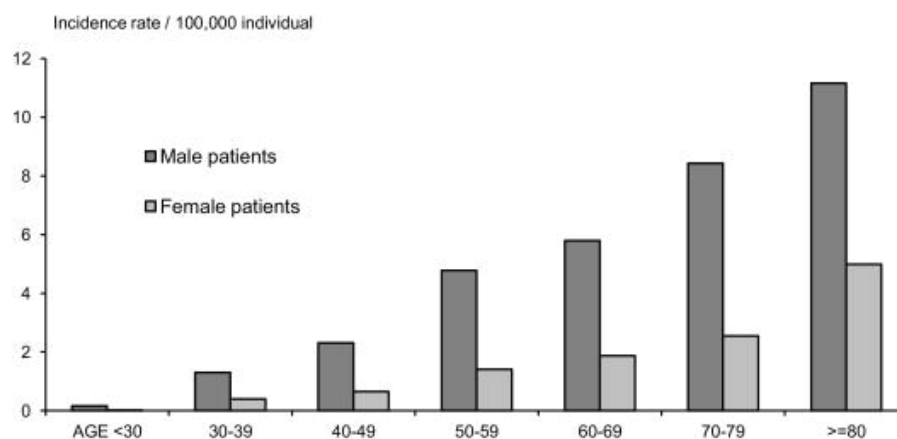


Figure 6. Taux d'incidence par sexe et par classe d'âge des cas de légionellose notifiés en France en 2013 (76).

Les personnes à haut risque («particulièrement vulnérables» au sens de l'arrêté du 1^{er} février 2010) sont les personnes ayant un système immunitaire fortement diminué du fait:

- d'une pathologie, notamment les personnes atteintes d'hémopathie maligne, et les patients présentant une maladie du greffon contre l'hôte (GVH), les cancers ;
- d'un traitement immunosuppresseur,
- d'une transplantation ou d'une greffe d'organe,
- d'un traitement de corticothérapie prolongée (pour un adulte: ≥ 10 mg d'équivalent-prednisone par jour, depuis plus de 2 semaines) ou récente et à haute dose (c'est à dire supérieure à 5 mg/kg de prednisone pendant plus de 5 jours).

Les données de surveillance de l'InVS montrent qu'environ 70 % des cas présentent au moins 1 des facteurs de risque individuels précités. Des cas parfois sévères de légionellose sont donc diagnostiqués chez des sujets ne présentant aucun facteur de risque. Ainsi, la susceptibilité de l'hôte à l'infection par les légionelles pourrait être liée à un polymorphisme génétique de récepteurs, les toll-like receptors (TLR), chargés de reconnaître les agents

pathogènes pour déclencher une réponse immunitaire et les éliminer. En effet, plusieurs auteurs ont montré que des polymorphismes des TLR2, TLR4 et TLR5 pouvaient influencer la susceptibilité de l'hôte au développement intracellulaire des *Legionella* (87–89).

1.2.6 Incidence de la légionellose en France

Depuis 2002, le nombre des cas déclarés de légionellose est compris entre 1000 et 1500 / an et le taux d'incidence se situe autour de 2 cas pour 100 000 habitants (1,70 – 2,46) (Figures 8 et 9). Cependant, l'incidence augmente fortement avec l'âge, ainsi, l'incidence des cas de plus de 80 ans est supérieure à 7/100 000 habitants. (Figure 7)

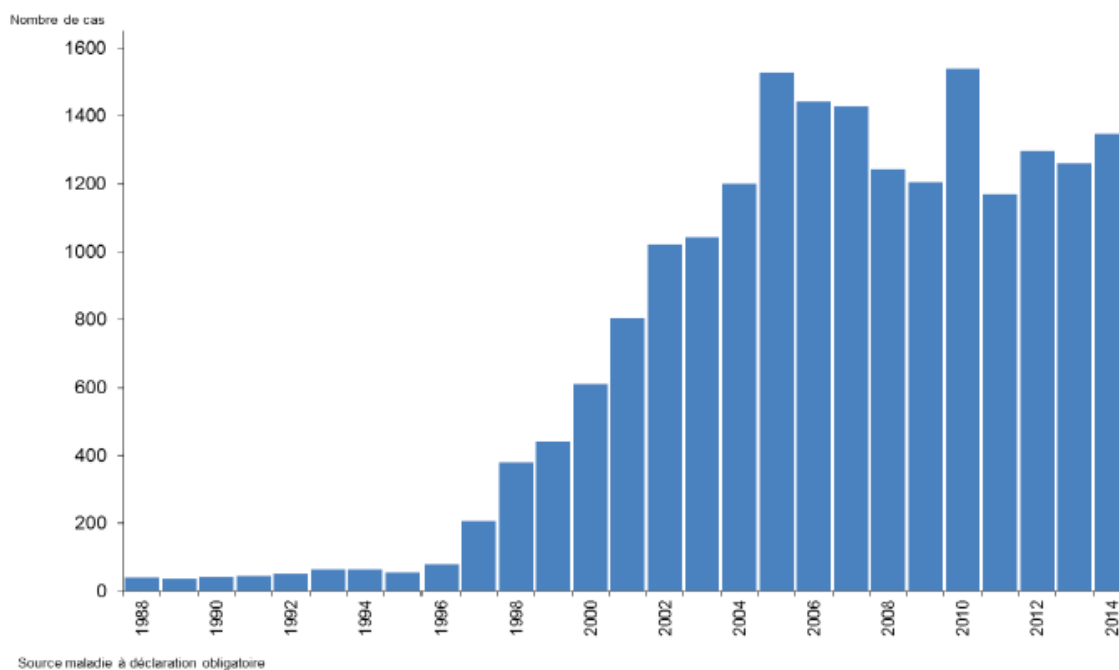


Figure 7. Nombre de cas de légionellose notifiés en France entre 1998 et 2014 (Source : InVS)

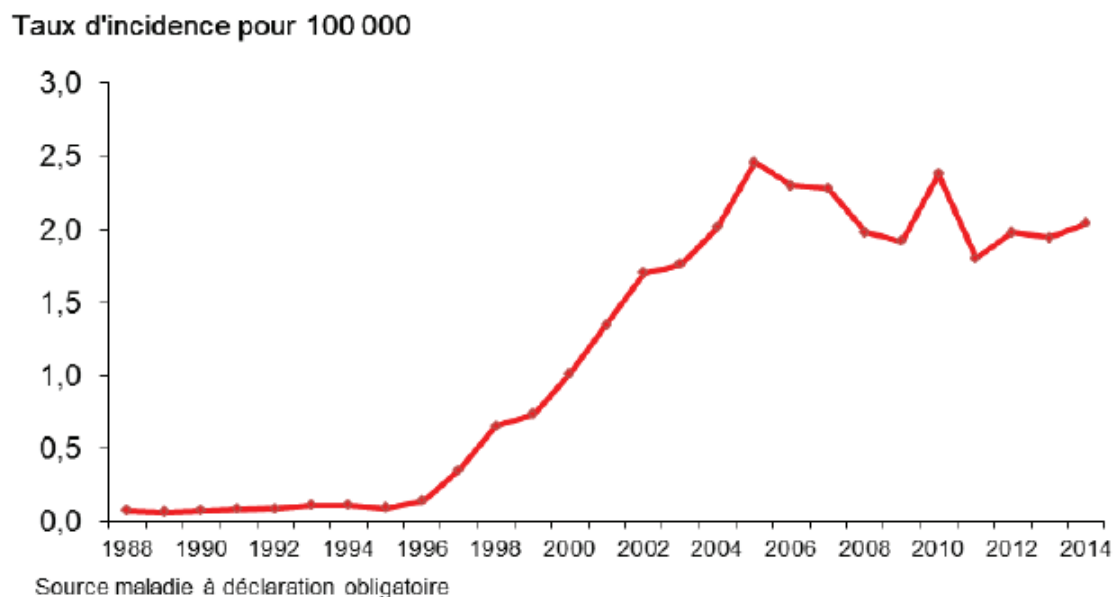


Figure 8. Taux d'incidence de la légionellose en France entre 1998 et 2014 (Source : InvS)

Ce taux est tout à fait comparable à d'autres pays européens tels que le Danemark, l'Espagne, l'Italie, les Pays-Bas mais plus que le taux moyen européen qui était de 1,2 cas pour 100 000 habitants. Cependant, l'incidence augmente. De plus, on observe en France un gradient Ouest-Est de la répartition des cas. En 2013 et 2014, les taux d'incidence observés en Franche-Comté ou en Alsace étaient jusqu'à 6 à 10 fois plus élevés qu'en Bretagne (Figure 10)

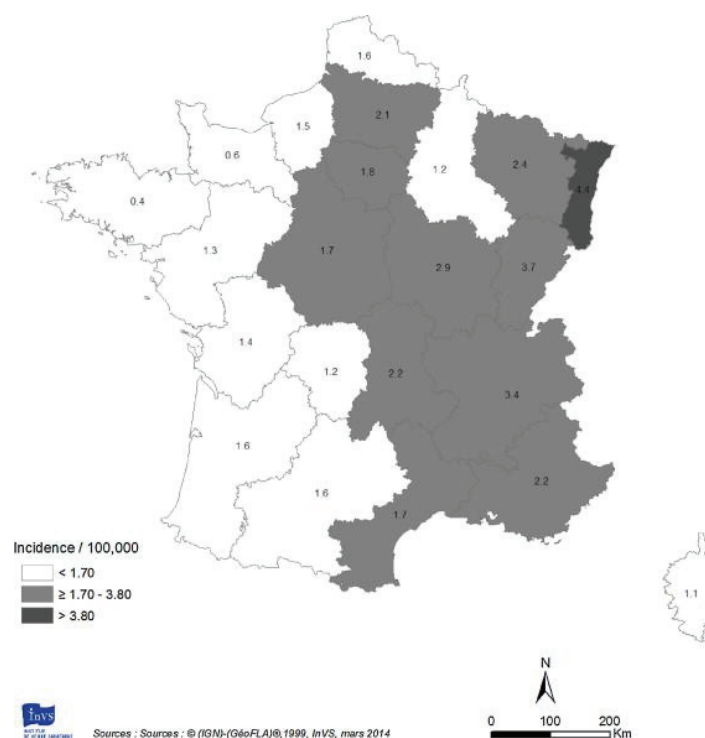


Figure 9. Distribution géographique des cas de légionellose, taux d'incidence régional en 2013 en France métropolitaine (76)

Enfin, une souche était isolée par culture dans 323 cas en 2013, représentant 25,6 % des cas. Ce taux, qui était de 23,7 % en 2012, est en augmentation et supérieur à 22% depuis 2011 et correspond à une sensibilisation des cliniciens à l'amélioration des caractéristiques clinico-épidémiologiques des cas de légionelloses (Figure 11).

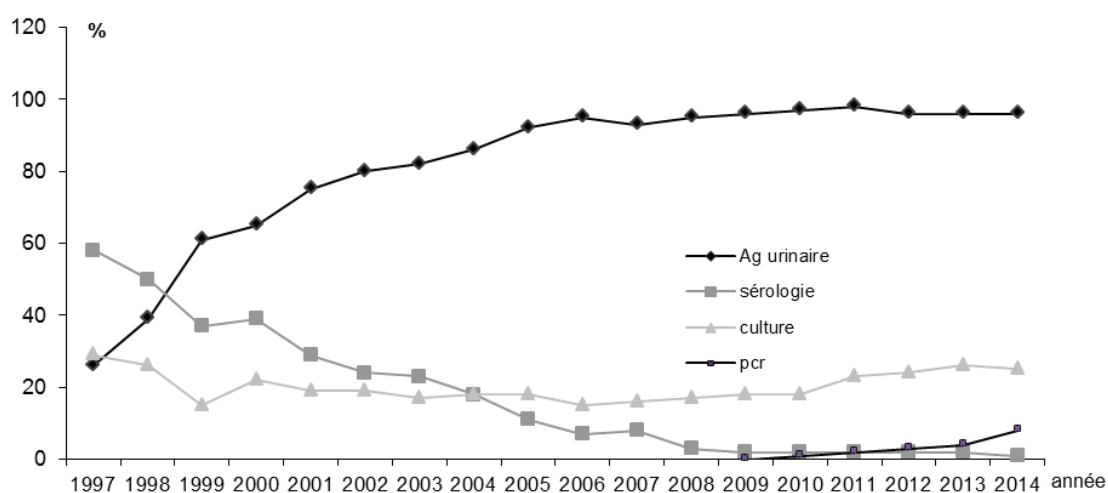


Figure 10. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose en France entre 1997 et 2014 (Source : InVS)

Ainsi en 2013, la souche clinique a pu être comparée à une souche environnementale pour 51 cas. Parmi ces cas, les profils génomiques des souches cliniques et environnementales étaient identiques pour près de 60% des cas (n=30). Les cas étaient principalement communautaires avec une source identifiée dans l'eau chaude sanitaire de la résidence du cas (76).

2 Identification et détection des légionelles dans l'environnement

2.1 Méthodes d'identification et de détection

Le contrôle régulier de la concentration en légionelles des installations à risque est recommandé dans de nombreux pays européens (90,91). En France, la surveillance environnementale de *Legionella spp.* ou de *L. pneumophila* est encadrée par la réglementation. Elle est obligatoire :

- dans les eaux minérales destinées à des usages thérapeutiques dans les établissements thermaux (arrêté du 19 juin 2000),
- dans les TAR, une fois par mois ou tous les 2 mois pendant la période de fonctionnement de l'installation (arrêté du 13 décembre 2004),
- dans les réseaux d'eau chaude sanitaire des établissements de santé, les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées, les autres établissements sociaux et médico-sociaux, les hôtels, les résidences de tourisme, les campings et les établissements pénitentiaires une fois par an aux points d'usage représentatifs (arrêté du 1^{er} février 2010).

Cette réglementation impose l'utilisation de la méthode par culture, telle que décrite dans la norme NF T90-431 dans sa version de novembre 2014. La technique de PCR *Legionella* quantitative en temps réel est normalisée NF T90-471, et peut être utilisée comme technique complémentaire de suivi d'installations.

2.1.1 Culture

La recherche et le dénombrement de *Legionella spp.* et de *L. pneumophila* dans l'eau tels que décrits dans la norme NF T90-431 (novembre 2014) se font à partir d'un prélèvement d'eau qui estensemencé sur milieu sélectif (milieu glycine, vancomycine, polymyxine B,

cycloheximide ou GVPC) après une étape de concentration et de décontamination. La norme distingue les eaux dites "propres" des eaux dites "sales".

Le milieu GVPC a pour base le milieu BCYE (*buffered charcoal yeast extract*), qui contient du charbon activé, et est supplémenté par de l'extrait de levure, de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer (89). Le charbon capture les peroxydes d'hydrogène et les radicaux libres toxiques générés par l'autoclavage, et prévient la photo-oxydation de l'extrait de levure et de la L-cystéine (90). Ce milieu supplémenté avec 0,1% d'alpha-cétoglutarate (BCYE α) et tamponné à 6,9 (pH optimal pour la croissance de *Legionella*) par du tampon ACES (acide N2-acétamido-amino-éthano-sulfonique) constitue désormais le milieu de choix pour les légionelles. Le milieu GVPC est donc quasi identique à la gélose BCYE avec cystéine. Néanmoins, il est supplémenté de glycine, vancomycine, polymyxine B (91) et cycloheximide (92).

Les eaux propres sont définies comme les eaux chaudes sanitaires, destinées à la consommation humaine, les eaux thermales, les eaux souterraines, les eaux de piscine et assimilées (spa). Les eaux sales correspondent aux eaux industrielles, aux eaux de surface, aux eaux naturelles et aux eaux des TAR. Pour les eaux propres, la norme reprend le principe de la norme ISO 11731-2. Après filtration de 100 mL de la matrice liquide à analyser, le filtre, maintenu en place sur le dispositif de filtration, est traité avec un tampon acide (pH=2,2), pour réduire la croissance des bactéries autres que *Legionella*. Le filtre est ensuite transféré sur un milieu de culture sélectif (milieu GVPC) et incubé à 36 °C pendant au moins 10 jours. Les géloses sont examinées au moins à trois reprises à partir de 3 à 4 jours de culture, jusqu'à la fin de la période d'incubation. Ces examens permettent le repérage des colonies potentiellement positives. Les colonies de *Legionella* ont le plus souvent un aspect caractéristique à la loupe binoculaire dit en verre fritté. Un test d'agglutination au latex ou par immunofluorescence directe est pratiqué afin d'identifier l'espèce *L. pneumophila*. Ces tests permettent également d'identifier le sérotype 1 de *L. pneumophila* bien que cela ne figure pas dans les normes. La limite de détection, en l'absence de flore interférente est de 10 UFC/L.

2.1.2 PCR

La méthode de dénombrement de *Legionella*, dans l'eau, par PCR en temps réel (q-PCR ou Real-time PCR), fait l'objet de la norme NF T90-471 "Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *L. pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)" (avril 2010).

Actuellement, il n'y a pas d'équivalence officiellement reconnue entre les méthodes par culture (NF T90-431) et par q-PCR (NF T90-471), c'est-à-dire entre les résultats exprimés en UG/L (Unité Génome) et ceux obtenus par la culture exprimés en UFC/L.

La *polymerase chain reaction* (PCR) est une méthode de biologie moléculaire basée sur l'amplification génique *in vitro*. Elle permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité initiale, par l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase et d'amorces oligonucléotidiques. La sélectivité de la technique vient du fait que les amorces nucléotidiques utilisées sont spécifiques du gène à amplifier. Ces dernières sont constituées d'oligonucléotides de synthèse de taille déterminée (20 à 25 nucléotides), permettant de délimiter la séquence à amplifier (92,93).

La q-PCR est une évolution de la PCR classique qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à une sonde fluorescente ou un agent fluorescent intercalant de l'ADN (94,95). Elle permet ainsi de faire des mesures quantitatives (q-PCR) en comparant les niveaux de fluorescence à ceux d'un standard externe composé de solutions de concentration calibrée en UG de *Legionella pneumophila* amplifiées (92,93).

La norme NF T 90-471 laisse le choix des amorces, dans la mesure où elles sont spécifiques de *Legionella*. Certaines amorces sont déjà couramment utilisées pour le dénombrement de *Legionella* par q-PCR. Par exemple, une amorce spécifique du genre *Legionella* qui permet l'amplification d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S ou une amorce spécifique de l'espèce *L. pneumophila* qui permet l'amplification d'un fragment du gène *mip* (macrophage infectivity potentiator), un gène codant un potentiateur bactérien à provoquer une infection intracellulaire de protozoaires ou de macrophages humains (93). D'autres amorces sont également utilisées, comme des fragments des gènes codant l'ARNr 5S (96) et l'ARNr 23S (97).

La dernière version de la norme révisée en 2010 préconise un étalonnage à chaque changement de lot de réactifs, par le raccordement de la solution de calibration de travail à un étalon primaire. Elle définit ainsi l'utilisation d'un étalon primaire certifié servant à améliorer la reproductibilité des résultats et leur comparaison entre les différents laboratoires. Cet étalon a été mis au point et est distribué depuis octobre 2009 par le CNRL.

2.2 Typage moléculaire des souches

De nombreuses méthodes de typage moléculaire des souches de *L. pneumophila* sg1 ont été développées mais elles ne présentent pas toutes les mêmes caractéristiques. En effet, certains critères tels que la reproductibilité et le pouvoir discriminant, qui peut être mesuré selon la formule de Hunter et Gaston (98), sont variables en fonction de la méthode utilisée.

2.2.1 Méthode phénotypique

Le typage phénotypique est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mabs) selon le panel de Dresden dirigés contre le LPS (lipopolysaccharide) par une technique d'immunofluorescence (99). Ce panel comprend 4 anticorps auxquels on rajoute le Mab 3 de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il permet en fonction de la positivité de l'agglutination avec l'anticorps de différencier 9 sous-groupes répartis en 2 catégories selon leur réactivité avec l'anticorps monoclonal 3/1 (Figure 12). Ainsi les souches des sous-groupes Knoxville, Philadelphia, Benidorm et France/Allentown sont Mab 3/1 + (100). Elles sont plus impliquées dans les cas cliniques, communautaires et liés au voyage. Les souches Mab 3/1 - (sous-groupes Olda, Oxford, Bellingham, Heysham et Camperdown) sont, quant à elles plus fréquemment retrouvées dans l'environnement (2). On peut rappeler qu'un autre panel avait été décrit initialement par Joly *et al.* (101). Au total, il apparaît que typage est une première étape de différenciation des souches de *L. pneumophila* identifiées en pathologie humaine mais a un pouvoir discriminant nettement inférieur aux techniques moléculaires décrites ci-après puisque seuls 9 sous-groupes sont identifiés par les anticorps monoclonaux. Son intérêt réside dans sa complémentarité avec les méthodes génotypiques. Ainsi, le pouvoir discriminant de la technique de SBT utilisée isolément est supérieur à 94% et atteint plus de 98% lorsqu'elle est combinée au sérotypage par Mabs (7).

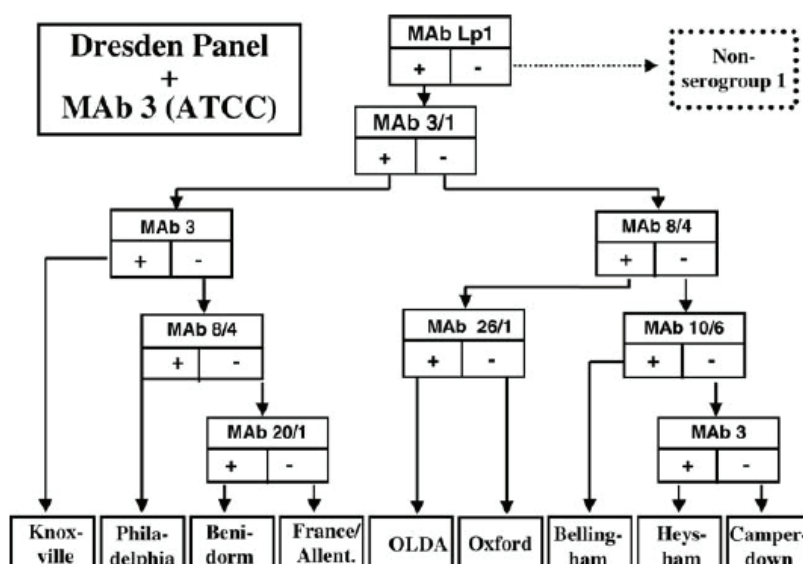


Figure 11. Schéma d'interprétation du sous-groupage des *L. pneumophila* sg1 utilisant le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden plus l'anticorps monoclonal 3 de l' American Type Culture Collection (ATCC) (100)

2.2.2 Méthodes génotypiques

2.2.2.1 Electrophorèse en champ pulsé

Le typage des légionelles par analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par PFGE est une technique introduite au laboratoire au début des années 90 (102). Elle a été largement implantée au niveau international ainsi qu'au CNRL car elle avait un fort pouvoir discriminant et surtout permettait la constitution de bases de données informatisées (103–105). Grâce à l'utilisation de logiciels dédiés à l'épidémiologie, il a été possible de comparer dans une même base de données tous les profils de restriction des légionelles et d'identifier des profils identiques ou similaires quelle que soit la date d'isolement. Rapidement, cette technique consiste à digérer l'ADN chromosomique par l'enzyme de restriction. Le chromosome bactérien est ainsi coupé par l'enzyme à des sites de clivage donnant des grands fragments de 10 à 800 kb. L'électrophorèse en champ pulsé est alors utilisée pour les séparer et le profil obtenu est appelé pulsotype. Le meilleur pouvoir discriminant est obtenu avec l'enzyme *SfiI* (106) mais l'enzyme *NotI* peut également être utilisée (107).

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. Cependant une technique plus rapide en 2 jours a été décrite (108). 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 98%, supérieur à la technique SBT décrite ci-dessous). De plus, cette technique permet de constituer une base de données. Au CNRL de Lyon cette technique a été largement utilisée. Ainsi, en 2012 la base de données contenait plus de 9 000 profils de *L. pneumophila* d'origine clinique et environnementale dont plus de 4 000 profils de *L. pneumophila* sg1 d'origine clinique.

2.2.2.2 Sequence Based Typing

Au milieu des années 1990, sont apparues les techniques de typage moléculaire de souche de légionelles basées sur les séquences nucléotidiques de gènes. Cette technique a généralement été appelée MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), sa définition correspondant au séquençage de 7 gènes de ménage. Pour les légionelles, 7 gènes consensus ont été choisis après une étude multicentrique mais comprenait uniquement 2 gènes de ménage (ou du métabolisme de base) *asd* (« aspartate-β-semialdéhyde dehydrogenase »), *neuA*

(Nacylneuraminate 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). Comme il ne s'agissait pas strictement à une technique correspondant au MLST, une terminologie plus large a été retenue. Le SBT est la méthode de référence européenne (7,8), cette méthode présente un pouvoir discriminant d'environ 96 – 97 %. Une base de données informatisée correspondant à la séquence de chacun des allèles a été créée <http://www.ewgli.org/>. 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 d'EWGLI.

Pour les prélèvements respiratoires pour lesquels une souche n'a pas été isolée, une PCR nichée de chacun des 7 gènes (*Nested-PCR-based SBT*) encore appelée nested-SBT, a également été développée et permet d'obtenir des profils alléliques complets et un ST directement à partir d'un prélèvement clinique (9).

3 Réervoirs environnementaux des légionelles

Les légionelles sont naturellement présentes dans les environnements hydriques. Dans les eaux froides, elles sont retrouvées à de faibles concentrations (celles-ci étant inférieures au seuil de contamination considéré comme dangereux pour contaminer l'homme ($<10^3$ UFC/L)). Les légionelles ayant comme caractéristique d'être une des rares bactéries pathogènes pour l'homme capable de se multiplier dans les eaux chaudes (optimum 35-37°C), leur concentration va être augmentée dans les eaux chaudes naturelles ou chauffées artificiellement par l'homme. De plus dans l'ensemble de ces environnements hydriques, c'est une très grande diversité d'espèces de légionelles qui sont habituellement isolées (21,27), mais seule *L. pneumophila* reste la plus pathogène pour l'homme.

3.1 Ecosystèmes naturels

Les écosystèmes naturels où se développent les légionelles sont les fleuves, rivières, nappes phréatiques, étangs, sources thermales ou les sols humides.

3.1.1 Eaux douces

Elles sont détectées respectivement dans plus de 40% des environnements d'eau douce par culture et plus de 80% des cas par PCR (109). Ces écosystèmes naturels sont cependant rarement identifiés comme source d'infection humaine, car les conditions pour une croissance considérable des légionelles y sont peu favorables hormis pour les sources d'eau chaude.

3.1.1.1 Les eaux de surface et eaux souterraines

De très nombreuses publications montrent que les légionelles sont présentes dans les eaux de surface. Au début des années 80, Carl Fliermans a prélevé plus d'une soixantaine de lacs et rivières aux Etats Unis et a isolé des *L. pneumophila* de différents sérogroupes au sein d'écosystèmes présentant des caractéristiques de pH, de température et d'oxygénation très variables (46). On retrouve cette grande diversité à l'échelle mondiale puisque des légionelles sont isolées aussi bien de rivières en Amazonie que de lacs en Antarctique (110,111). Enfin, mais souvent à des concentrations plus faibles qu'en surface, les légionelles sont également présentes dans les eaux souterraines (26,112–117) (Tableau 3).

3.1.1.2 Sources d'eau chaude / eaux thermales

Dans ces écosystèmes, *L. pneumophila* sg1 est très souvent retrouvée, parfois à des concentrations supérieures à 10 000 UFC/L (118). Ces sources d'exposition sont donc à risque de légionellose, principalement lorsque la température de production est comprise entre 35 et 40°C. Neuf études rapportent des cas de légionellose liés à l'exposition aux eaux thermales (Tableau 3). La majorité d'entre eux a eu lieu au Japon (47,119–123) où les sources d'eau chaudes appelées « onsen » sont très répandues. Pour ces six cas, un lien de clonalité a été établi entre souches cliniques et souches environnementales par PFGE. Les 3 autres cas ont eu lieu dans des structures thermales européennes donc plus artificielles. Les 2 publications françaises rapportent 7 cas (5 cas en 1986, 1 cas en 1994 et 1 cas en 1997) dans une même station thermale (124,125). Une publication helvète rapporte la survenue d'un cas (126), pour lesquels les sources d'exposition n'ont pu être formellement incriminées. Parmi ces 9 études, *L. pneumophila* sg1 était retrouvé chez les patients pour 4 d'entre elles (120,123,125,126).

3.1.1.3 Flaques d'eau / eaux de pluie

Les flaques d'eau et les eaux de pluie peuvent constituer un réservoir de *Legionella*. Deux études hollandaises (Schalk (127) et van Heijnsbergen (48)) ont montré la présence de *Legionella spp.* dont *L. pneumophila* par coculture amibienne, la culture sur milieu GVPC restant négative. Cependant le pourcentage de prélèvements positifs à *Legionella spp.* différaient dans les 2 études puisqu'il était de 31% et 3,9% respectivement. Dans les 2 études, certaines souches de *L. pneumophila* retrouvées ont déjà été isolées chez des patients. Par ailleurs, bien que les prélèvements aient été effectués aux Pays-Bas à peu près à la même saison (printemps, fin d'été), ils étaient réalisés après des précipitations de forte intensité dans l'étude de Schalk *et al.*, l'effet du ruissellement et donc l'apport de terre a pu surestimer la présence de légionelles dans ces prélèvements. Sakamoto *et al.* (128) ont également identifié les flaques d'eau en bordure de routes comme de potentielles sources de contamination puisqu'ils y retrouvaient des *L. pneumophila* par culture dans 35% des cas uniquement en saison chaude (128). Cependant, cet effet température que l'on ne retrouve pas dans la publication de Kanatani *et al.* (129), puisque des échantillons de flaques d'eau prélevées tout au long de l'année à des températures (-0,6°C à 32,2°C) en 6 points fixes étaient positifs à *L. pneumophila* en culture (Tableau 4).

Quant aux eaux de pluie, elles peuvent être collectées directement dans des flacons stériles. Ainsi, Sakamoto *et al.* ont détecté la présence de *Legionella spp.* uniquement par PCR dans 1 échantillon sur 10 (128). D'autres publications rapportent la présence de *Legionella* dans les eaux de pluie, mais celles-ci étaient recueillies dans des gouttières ou containers de recueil et les légionelles pouvaient avoir été apportées par ruissellement (130,131) (Tableau 4).

3.1.1.4 Eaux salées

Habituellement *Legionella* n'est pas retrouvée dans le milieu marin. Cependant, des légionelles ont été détectées dans l'eau de mer dans des situations de mélange avec de l'eau douce : abouchement des eaux usées (132,133), estuaire (110), mais aussi dans des amibes halophiles (25,134) (Tableau 4).

3.1.1.5 Sols

Le sol constitue également un réservoir naturel pour de nombreuses espèces comme l'e montrent ces publications du Japon, de la Thaïlande et des Etats-Unis (6,22,135,136) (Tableau 5). Nous n'avons, en effet, pas retrouvé d'études portant sur l'analyse des sols en

Europe. De plus, d'autres publications montrent que la terre est une source potentielle d'infection (137–139). Ainsi, le cas rapporté par Wallis *et al.* présente le plus fort niveau de preuves. En effet, les pulsotypes (non connus au sein du laboratoire ayant effectué l'analyse) de la souche clinique et de la souche retrouvée dans la terre de la serre, où le jardinier travaillait, étaient identiques (137).

3.2 Ecosystèmes artificiels

A partir du milieu naturel, la bactérie peut coloniser des sites hydriques artificiels lorsque les conditions de son développement sont réunies et peut ainsi proliférer dans différentes installations à risque telles que les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS), les tours aéroréfrigérantes (TAR) et d'autres installations (bains à remous, brumisateurs, humidificateurs, appareils à oxygénothérapie et apnée du sommeil, fontaines décoratives) du fait de la production potentielle d'aérosols.

3.2.1 Tours aéro-réfrigérantes

De nombreuses publications rapportent l'implication des TAR dans des épidémies. Les concentrations en légionelles peuvent atteindre 10^{10} UFC/L (140). Cependant les cas sporadiques peuvent également être attribués à ces installations. Ainsi une étude rétrospective anglaise montrait que près de 20 % des cas sporadiques survenus en Angleterre et au Pays de Galles entre 1996 et 2006 avait très probablement une TAR comme source d'infection (Tableau 5).

Ce risque est lié au type de TAR. Une TAR humide est un échangeur de chaleur "air/eau", dans lequel l'eau à refroidir est en contact direct avec l'air ambiant. L'eau chaude est pulvérisée en partie haute de la TAR et ruisselle sur le corps d'échange. L'air traverse le système de ruissellement et est rejeté dans l'atmosphère. Le refroidissement s'effectue principalement par évaporation de l'eau. Un des modes de contamination avéré est la dissémination dans l'atmosphère de légionelles par ces systèmes de refroidissement à voie humide. On distingue les tours à circuit ouvert et à circuit fermé. Les tours à circuit ouvert sont plus à risque de dissémination de légionelles. Par contre, dans le cas d'installations à circuit fermé, le volume d'eau du circuit en contact avec l'air est plus faible. Les conditions favorables au développement des légionelles dans le circuit sont minorées par la limitation des surfaces de canalisation où serait susceptible de se former du biofilm, mais le risque de prolifération des légionelles reste néanmoins présent.



Figure 12. Les TAR sont des sources reconnues de légionellose et peuvent être à l'origine d'épidémies (67,140–144).

3.2.2 Spa, Jacuzzi

Tout comme les TAR, les spas et jacuzzi, qu'ils soient publics (145–148) ou privés (149), sont des sources potentielles bien connues de légionellose. Dans une étude avec un modèle d'aérosolisation pulmonaire et en utilisant des cochons d'Inde, il a été démontré que, pour une exposition de 15 minutes à un bain bouillonnant, le risque d'infection variait de 3% si la concentration en *Legionella pneumophila* était de 10 UFC/L, à 95% avec une concentration de 1 000 UFC/L (150). Ces résultats ne tenaient bien évidemment pas compte ni de la virulence de la souche ni des facteurs d'hôte (Tableau 5).

3.2.3 Terreaux, composts

Bien que n'étant pas un écosystème essentiellement hydrique, le compost et le terreau sont néanmoins des réservoirs possibles de légionelles notamment de *L. longbeachae*, comme en Australie, Nouvelle Zélande ou au Japon (151–153). Des techniques de culture de ces matrices ont été décrites et les plus fortes concentrations retrouvées dans la littérature étaient de $2,8 \cdot 10^6$ UFC/g pour *L. pneumophila* sg 2-15, de 10^5 UFC/g pour *L. pneumophila* sg1, de $7 \cdot 10^8$ UFC/g pour *L. bozemanni* (154) et $2 \cdot 10^4$ UFC/g pour *L. longbeachae* (155) dans du compost. Dans les terreaux, la concentration maximale observée était $2,8 \cdot 10^4$ UFC/g pour *L. pneumophila* sg1 et $2,7 \cdot 10^5$ UFC/g pour *Legionella spp.* (156) (Tableau 6).

3.2.4 Fontaines décoratives

Les fontaines décoratives peuvent être une source non négligeable de légionelles. Du fait de leur implantation dans des endroits très fréquentés (hôtels, centres commerciaux, etc...), le nombre de cas de légionellose associés à une fontaine peut être important comme dans l'article de O'Loughlin *et al.* où 18 cas étaient dénombrés (157). Des concentrations importantes en *L. pneumophila* sg1 ont été rapportées dans deux publications (157,158). Les concentrations observées dans l'eau des fontaines étaient respectivement de 3.10^6 UFC/L et 4.10^5 UFC/L et. Par ailleurs, les souches environnementales retrouvées étaient identiques en PFGE (158) ou présentaient le même profil allélique en SBT (157) que les souches cliniques (Tableau 6).

3.2.5 Usines de retraitement de déchets

Ces installations sont des réservoirs avérés de légionelles. En Norvège, deux épidémies de légionellose survenues en 2005 et 2008, ont impliqués des usines de retraitement (159,160). Dans l'épidémie de 2005, 56 cas de légionellose étaient observés et le purificateur d'air de la station apparaissait comme étant l'élément responsable de la diffusion d'un aérosol contaminant sur plus de 10 km, à la manière d'une TAR. En 2008, toujours dans cette même région fortement industrialisée, une épidémie de 5 cas incriminant une usine de retraitement a été rapportée. De nouveau, les purificateurs d'air ont montré la présence de légionelles. Cependant, la concentration la plus importante était retrouvée dans le bassin d'aération, soit environ 10^{10} UFC / L (Tableau 6).

3.2.6 Brumisateurs / Humidificateurs d'air

Les appareils de brumisation peuvent diffuser un aérosol contaminant. Deux investigations d'épidémie de légionellose touchant 33 patients en Floride (161) et 12 patients en Catalogne (162) ont montré que des brumisateurs de supermarché étaient la source de contamination. En effet, l'eau du réservoir montrait une contamination de 10^7 UFC/L *L. pneumophila* sg1. De même, les humidificateurs d'air sont également à risque. Ainsi, un humidificateur placé dans un service de néonatalogie est à l'origine d'une épidémie de 9 cas chez des nouveau-nés à terme (163). Deux souches avaient été retrouvées en forte concentration dans l'appareil : $2,9.10^8$ UFC/L dont majoritairement *L. pneumophila* sg3 ST93 dans la partie

inférieure de l'appareil, et $5,5.10^7$ UFC/L dont majoritairement *L. pneumophila* sg1 ST1 dans le réservoir. Une autre publication rapporte la présence de plus de 30 000 UFC/ L de *L. pneumophila* sg1 dans l'eau résiduelle d'un humidificateur (164). Cette recherche était liée à la survenue d'un cas sporadique de légionellose chez un nouveau-né de 6 mois.

Ces 2 articles sont relativement récents (2013 et 2012). Mais déjà dans les années 80, les humidificateurs d'air ont été décrits comme un réservoir possible de légionelles (165,166) (Tableau 6).

3.2.7 Machines à glace

En 1985, Stout *et al.* ont montré la présence de *L. pneumophila* dans le réservoir d'eau froide de 8 machines à glace sur les 14 machines d'un hôpital (167). Les concentrations variaient au cours de l'année et selon les appareils, puisque les auteurs rapportaient un dénombrement de 1 à 300 UFC par boîte. A l'époque aucun lien épidémiologique n'avait été établi avec un cas. Cependant, des publications ont montré que ces machines pouvaient être une source avérée de légionellose, comme par exemple dans 2 cas sur 3 chez des patients greffés cœur-poumons (168). L'eau du réservoir de la machine présentait une forte concentration en *L. pneumophila* sg1 (10 000 UFC/L). Dans une autre publication aux Etats-Unis, on retrouvait même une quantité non dénombrable de *L. pneumophila* sg6 dans le réservoir et 4,3 UFC/mL de ce même sérotype dans le glaçon (169). La souche environnementale était identique à la souche clinique du cas associé. Dans ces 2 cas, les auteurs évoquent 2 hypothèses de transmission : soit par micro-aspiration soit par inhalation d'un aérosol contaminé. Enfin, les machines à glace ont aussi été impliquées dans une pseudo-épidémie à *L. pneumophila* sg8 par contamination de seringues dans une unité de bronchoscopie (170) (Tableau 6).

3.2.8 Climatisations

En 1976, lors de l'épidémie de Philadelphie à l'origine de la découverte de *L. pneumophila*, le système de climatisation de l'hôtel avait été identifié comme la source d'infection. Dès lors, et durant les années 80, un certain nombre de publications ont montré que ces installations étaient des réservoirs avérés de légionelles pouvant conduire à de nouvelles épidémies (171–174). La concentration en *L. pneumophila* sg1 la plus élevée retrouvée dans la littérature était de 9.10^6 UFC /L (174). Par ailleurs, en 1981 un modèle d'infection pulmonaire

sur cochon d'Inde a été décrit pour valider le mode de transmission par aérosols à partir de climatiseurs contaminés (175). Enfin, Pinar *et al.* et Sakamoto *et al.* se sont intéressés à la possibilité de contamination à partir des systèmes de climatisations de voitures (176,177). Dans la première étude, la présence de *L. pneumophila* sg1 a été détectée par PCR dans l'eau du climatiseur. Celui-ci présentait une fuite et le conducteur qui est resté longtemps dans l'habitacle, a développé une légionellose. Dans la deuxième étude, des *Legionella spp.* étaient détectés par PCR sur écouvillon dans le système de climatisation de voitures destinées à la casse. Parallèlement, les conducteurs de voiture présentaient un titre d'anticorps plus élevés que le groupe témoin (Tableau 7).

3.2.9 Fauteuils dentaires

Les fauteuils dentaires sont à risque de légionellose. Ricci *et al.* ont décrit un cas mortel chez une femme de 82 ans dont la seule source potentielle d'exposition était des soins dentaires (178). L'investigation environnementale rapportait la présence importante de *L. pneumophila* sg1 : $1,5 \cdot 10^3$ UFC/L dans l'eau du robinet alimentant le fauteuil, $4 \cdot 10^3$ UFC/L dans le réseau du fauteuil, et $6,2 \cdot 10^4$ UFC/L dans la turbine à haute vitesse. En effet si le réseau d'eau interne du fauteuil est colonisé par des légionelles, l'aérosol généré au niveau des pièces à main peut être contaminant. De nombreuses études ont recherché la présence de légionelles dans l'eau d'alimentation et le circuit des fauteuils, et ont évalué les variations avant et après activité. Une première étude multicentrique en Italie a montré que 30 % des points d'eau des cabinets dentaires et 16% des fauteuils étaient contaminés par des légionelles (179). La concentration en *Legionella spp.* variait de $1 \cdot 10^6$ UFC/L avant activité à $8 \cdot 10^5$ UFC/L après activité pour les fauteuils, mais restait stable pour les robinets avec une concentration maximale observée de $9 \cdot 10^6$ UFC/L *Legionella spp.*. Une étude sud-africaine multicentrique montrait également une variation de la contamination des unités dentaires au cours du temps puisque parmi les 99 unités analysées, 14 unités étaient contaminées le matin et 13 l'après-midi (180). La concentration maximale retrouvée était de $2,9 \cdot 10^6$ UFC/L de *L. pneumophila* sg1. Une 3^{ème} étude multicentrique européenne a, quant à elle, montré que les fauteuils dentaires étaient contaminés principalement au niveau de leur circuit interne et dans le biofilm présent dans le circuit (181). Des *Legionella spp.* étaient détectées pour 4% des fauteuils et 1% des fauteuils présentaient une culture positive à *L. pneumophila*. Les contaminations étaient essentiellement retrouvées en Grèce et au Danemark (Tableau 7).

Tableau 3. Détection des légionelles dans les eaux de surface, eaux souterraines et sources d'eau chaude

Type	Lieu	Référence	Année de publication	Concentration	Type	Culture	PCR
Eaux de surface	67 lacs américains	Fliermans (46)	1981	-	<i>L. pneumophila</i> sg1-4	Sur cobaye	Non réalisée
	Rivière Brésil	Carvalho (110)	2007	-	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp.	Négative	Positive
	Lac Antarctique	Carvalho (111)	2008	1 colonie	<i>L. pneumophila</i>	Positive	Positive
Eaux souterraines	Canada	Riffard (112)	2001	-	<i>Legionella</i> spp.	Positive	Positive
	Etats-Unis, Canada	Brooks (113)	2004	Max: 8.10 ² UFC/L (<i>L. pneumophila</i>) 4.6.10 ³ UFC/L (<i>Legionella</i> spp.)	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp.	Positive	Positive
	Pays-Bas	Wullings (114)	2011	<LQ (limite de quantification)	<i>Legionella</i> spp.	Negative	Positive
	Pays-Bas	Wullings (115)	2006	10 ² cellule/L	<i>Legionella</i> spp.	Negative	Positive
	Pologne	Stojek (116)	2011	2.10 ³ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Non réalisée
	Pologne	Stojek (117)	2012	ND	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Positive
	Japon	Yang (26)	2012	ND	<i>L. nagasakiensis</i>	Negative	Positive
	France	Bornstein (124)	1989	10 ³ -10 ⁵ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Non réalisée
Sources d'eau chaude	Suisse	Gaia (126)	1994	Souche	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Japon	Miyamoto (47)	1997	30 UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg3	Positive	Non réalisée
	France	Molmeret (125)	2001	Souches	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Japon	Tominaga (123)	2001	10 ³ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Japon	Ito (119)	2002	3.10 ³ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg6	Positive	Non réalisée
	Japon	Nozue (122)	2005	2.6.10 ³ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg3	Positive	Non réalisée
	Japon	Matsui (121)	2010	400 – 600 UFC/L	<i>L. pneumophila</i> <i>L. rubrilucens</i>	Positive	Non réalisée
	Japon	Kurosawa (120)	2010	ND	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Italie	Martinelli (118)	2001	10 ⁴ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée

Tableau 4. Détection des légionelles dans les flaques d'eau, eaux de pluie et eaux salées

Type	Lieu	Référence	Année de publication	Concentration	Type	Culture	PCR
Flaques d'eau	Pays Bas	Schalk (127)	2012	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Co-culture	Non réalisée
					<i>L.pneumophila</i> sg8	amibienne	
					<i>Legionella</i> spp.		
	Pays Bas	Van Heijnsbergen (48)	2014	-	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Co-culture amibienne	Non réalisée
	Japon	Sakamoto (128)	2009	-	<i>L.pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Positive (<i>Legionella</i> spp)
	Japon	Kanatani (129)	2013	$10^3 - 10^5$ UFC/L selon saison	<i>L.pneumophila</i> sg1 <i>Legionella</i> spp	Positive	Positive
	Japon	Sakamoto (128)	2009	Max $>10^4$ UFC/L	<i>L.pneumophila</i>	Positive	Non réalisée
	Pays Bas	Schets (130)	2010	-	<i>Legionella</i> spp	Positive	Non réalisée
	Nouvelle-Zélande (containers eaux de pluie)	Simmons (131)	2008	Max 3.10^5 UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Etats Unis	Palmer (132)	1993	-	<i>Legionella</i> spp.	-	Positive
	Porto Rico	Ortiz-Roque (133)	1987	IF (immunofluorescence)	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	-	-
	Estuaire Brésil	Carvalho (110)	2007	-	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Positive
	Lac salé Tunisie	Campocasso (25)	2012	-	<i>L. tunisiensis</i>	Co-culture amibienne	Positive
	Estuaire Unis	Etats Gast (134)	2011	-	<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp		Positive dans amibe

Tableau 5. Détection des légionelles dans les sols, les TAR et les spas

Type	Lieu	Référence	Année de publication	Concentration	Type	Culture	PCR
Sols	Japon	Amemura (6)	2010	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Japon	Kuroki (22)	2007	-	<i>Legionella</i> spp.	Positive Co-culture ambienne	Positive
	Etats Unis	Newsome (135)	1998	-	<i>Legionella</i> spp.	Co-culture ambienne	Positive
	Thaïlande	Travis (136)	2012	-	<i>L.pneumophila</i> sg1 <i>L. pneumophila</i> <i>Legionella</i> spp	Positive	Positive
	Australie	Wallis (137)	2005	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Positive
	Etats Unis	Parry (138)	1985	-	<i>L. bozemanni</i>	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Haley (139)	1979	-			
	Suède	Ullerød (141)	2012	1.2.10 ³ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Espagne	Ferré (142)	2009	10 ⁴ - 10 ⁵ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Canada	Gilmour (143)	2007	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	France	Nguyen (140)	2006	10 ⁶ - 10 ¹⁰ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Australie	Greig (67)	2004	10 ³ – 10 ⁴ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1 <i>L.pneumophila</i> sg3, 5, 6, 9 <i>Legionella</i> spp	Positive	Non réalisée
	Royaume-Uni	Kirrage (144)	2007	>10 ⁶ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Royaume-Uni	Ricketts (182)	2012	-	-	-	-
Spas, jacuzzis	Royaume-Uni	Coetzee (145)	2012	-	<i>L. pneumophila</i> ST1268	Négative	Positive (écouvillon)
	Allemagne	Beyrer (146)	2007	520 UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Benkel (147)	2000	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	France	Campese (148)	2010	1,5 10 ³ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Pays-Bas	Euser (149)	2010	-	<i>L. pneumophila</i> sg1 ST47	Positive (écouvillon)	Non réalisée

Tableau 6. Détection des légionelles dans les terreaux, les composts, les fontaines, les usines de traitement, les brumisateurs, les humidificateurs d'air et les machines à glace

Type	Lieu	Référence	Année de publication	Concentration	Type	Culture	PCR
Terreaux, composts	Suisse	Casati (154)	2010	2.8.10 ⁵ UFC/g	<i>L. pneumophila</i> sg2-15	Positive	Non réalisée
				10 ⁵ UFC/g	<i>L. pneumophila</i> sg1		
				7.10 ⁸ UFC/ g	<i>L. bozemanni</i>		
	Australie	Steele (151)	1990	2.10 ⁴ UFC /g	<i>L. longbeachae</i>	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i>		
					<i>Legionella spp</i>		
Fontaines décoratives	Etats-Unis	Hlady (158)	1993	4.10 ⁵ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
Usines de traitement des déchets	Norvège	Borgen (160)	2008	10 ¹⁰ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
Brumisateurs	Etats-Unis	Mahoney (161)	1992	10 ⁴ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
Humidificateurs d'air	Chypre	Yiallourous (163)	2012	2.9.10 ⁵ UFC/L 5.5.10 ⁷ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg3 ST93	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i> sg1 ST1		
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
	Israël	Moran-Gilad (164)	2013	3.10 ⁴ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Canada	Joly (165)	1986	-	<i>L. dumoffi</i>	Positive	Non réalisée
	Pays-Bas	Kaan (166)	1985	-	<i>L. pneumophila</i> sg10	Positive	Non réalisée
Machines à glace	Etats-Unis	Stout (167)	1985	1 – 300 UFC par boîte	<i>L. pneumophila</i>	Positive	Non réalisée
					<i>L. pneumophila</i> sg1		
					<i>L. pneumophila</i> sg6		
	Danemark	Bangsbo (168)	1995	10 ⁴ UFC/L	<i>L. pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Graman (169)	1997	UFC non dénombrables 4.3 UFC/mL (glaçon)	<i>L. pneumophila</i> sg6	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Schuetz (170)	2009	-	<i>L. pneumophila</i> sg8	Positive	Non réalisée

Tableau 7. Détection des légionelles dans les systèmes de climatisation et les fauteuils dentaires

Type	Lieu	Référence	Année de publication	Concentration	Type	Culture	PCR
Climatisations	Etats-Unis	Broome (171)	1979	-	-	-	-
	Etats-Unis	Cordes (172)	1980	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Royaume-Uni	O'Mahony (173)	1990	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Breiman (174)	1990	9.10 ⁶ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Etats-Unis	Kaufmann	1981	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Espagne	Pinar	2002	-	<i>L.pneumophila</i> sg1	Négative	Positive
	Japon	Sakamoto	2009	-	<i>Legionella</i> spp.	Négative	Positive (écouvillon)
	Italie	Ricci	2012	1.5.10 ³ CFU/L (eau alimentant le fauteuil) 4.10 ³ CFU/L (circuit fauteuil) 6.2.10 ⁴ CFU/L (turbine à haute vitesse)	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
Fauteuils dentaires	Italie	Pasquarella	2012	9.10 ⁶ UFC/L	<i>Legionella</i> spp.	Positive	Non réalisée
	Afrique du Sud	Singh	2005	2.9.10 ⁶ UFC/L	<i>L.pneumophila</i> sg1	Positive	Non réalisée
	Royaume-Uni	Walker	2004	-	<i>Legionella</i> spp.	Positive	Non réalisée
					<i>L.pneumophila</i> sg1		

4 Caractéristiques des souches ST47

4.1 Typage moléculaire

Historiquement, au CNRL les souches ont tout d'abord été typées par PFGE. Entre 1995 et 2006, près de 1800 souches ont été typées et ont permis de détecter 3 catégories de souches :

- les souches sporadiques où une infection correspond à une souche de profil unique,
- les souches épidémiques où plusieurs infections reliées correspondent à 1 souche de profil unique dit épidémique,
- les souches endémiques où plusieurs infections non reliées correspondent à 1 souche de profil unique dit endémique.

Ainsi, parmi les souches endémiques, le pulsotype Lorraine regroupant 80 isolats a été identifié. D'un point de vue phénotypique, les souches Lorraine appartenaient au sous-groupe France-Allentown sauf pour 2 souches qui appartenaient au sous-groupe Benidorm.

Enfin, d'un point de vue génotypique le ST47 de profil allélique 5,10,22,15,6,2,6, a été retrouvé pour l'ensemble des souches Lorraine sauf, pour 2 souches qui présentaient une différence d'allèle sur les gènes *pilE* et *proA* et étaient identifiées ST109 avec le profil allélique suivant 5,1,22,15,6,10,6 (13).

Au final, le type majoritaire est *L. pneumophila* sg1 sous groupe France-Allentown, pulsotype Lorraine, ST47. Dans la suite de notre travail, nous la nommerons indifféremment souche Lorraine ou souche ST47 (sauf exceptions).

4.2 Réservoirs environnementaux

L'environnement naturel des souches ST47 reste méconnu. Entre 1995 et 2006 plus de 4 000 souches de *Legionella* provenant de prélèvements d'eau ont été typées au CNRL par PFGE, la souche Paris était retrouvée plus de 500 fois et la souche Lorraine uniquement 3 fois (13). Ainsi, la souche ST47 n'a été isolée que dans des eaux chaudes sanitaires, une TAR et l'eau d'une station de lavage. Des données européennes (36 pays, 3200 isolats) ont également montré que parmi les souches environnementales, la souche ST47 n'était retrouvée que dans 0,4% des prélèvements d'environnement alors qu'elle représentait 13,6% des prélèvements cliniques (11). Aux Pays-Bas, où la souche représente 41% des

isolats cliniques (183), elle n'a été identifiée dans l'environnement qu'à 3 occasions (184). Toutes impliquaient des jacuzzis de jardin. Du fait de ce point commun, une des hypothèses évoquées par Euser *et al.* était que la bactérie pouvait avoir colonisé le jacuzzi à partir d'un réservoir primaire extérieur, probablement la terre. Le vecteur de transmission pouvait être le vent ou les pieds des utilisateurs du bain bouillonnant. Des prélèvements de terre aux alentours des jacuzzis des cas de 2013 et 2006 ont été effectués. Un prélèvement de terre a été retrouvé positif à *L. pneumophila* sg1 ST47 en co-culture amibienne. La terre est donc un des réservoirs possibles de la souche ST47 (Tableau 8).

Tableau 8. Récapitulatif des investigations aux Pays-Bas et en France où une souche environnementale ST47 a été isolée

Pays	Année	Nombre de cas de légionellose	Source environnementale	Souche clinique
Pays-Bas	2013	2	Jacuzzi de jardin	Non
Pays-Bas	2009	1	Jacuzzi de jardin	Non
France	2007	1	Eau chaude sanitaire	1 souche ST47
Pays-Bas	2006	1	Jacuzzi de jardin	1 souche ST47
France	2006	12 cas groupés	TAR	1 souche ST47
France	2004	1	Station de lavage	1 souche ST47

4.3 Génome

Le génome de la souche Lorraine a une taille de 3,46 Mb et est composé d'un grand chromosome circulaire unique comprenant 3 117 gènes dont 3 080 séquences codantes ainsi que d'un plasmide. L'analyse comparée de 6 génomes de *L. pneumophila* a montré qu'il existait 183 gènes spécifiques pour la souche Lorraine (36).

Par ailleurs, au sein de cette souche, le contenu génomique semble extrêmement bien conservé. En effet, Underwood *et al.* ont observé que 3 souches Lorraine, isolées entre 2003 et 2006 en France et au Royaume-Uni séquencées intégralement par WGS (*whole genome sequencing*) ne présentaient que 4 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) de différence alors que les génomes de 2 souches Paris montraient 280 SNPs de différence (185).

4.4 Place de la souche ST47 dans la légionellose

Les dernières données épidémiologiques françaises publiées ont montré que les 3 souches endémiques principales (ST1, ST23 et ST47) représentaient près de 40% des cas de légionellose pour lesquels une souche avait été isolée (76). En Europe, la souche ST47 est très fréquemment retrouvée en Belgique (27,9% des souches isolées entre 2000 et 2010), au Royaume-Uni (25,7% des souches isolées entre 2000 et 2008), et aux Pays-Bas comme évoqué précédemment (2,4,183). Elle a également été identifiée au Canada pour un cas (14).

En France, les souches ST47 sont responsables principalement de cas isolés. Néanmoins deux épidémies ont déjà été décrites. Lors de la première, survenue à Lyon en 2005, 34 patients ont été infectés mais seulement 3 souches ont été isolées. La seconde épidémie a eu lieu en 2006 en région parisienne. Parmi les 12 patients dont le diagnostic a été réalisé par antigène urinaire, une seule souche ST47 a été isolée d'un prélèvement respiratoire (13).

Enfin, une étude s'est intéressée aux facteurs de risques associés aux cas communautaires infectés par la souche Lorraine comparés aux cas infectés par des souches sporadiques. Les cas d'infections liés à la souche Lorraine était significativement plus associés avec le tabagisme (Odds Ratio ajusté : 1,82; intervalle de confiance à 95% : 1.14–2.91) et la mortalité observée (9,9%) était moins élevée que dans le groupe contrôle (25,5%).

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1 Introduction

Le typage moléculaire des souches de *Legionella pneumophila* sg1 a fait apparaître des souches endémiques représentant des complexes clonaux majoritaires (76). Parmi eux, les souches Lorraine ST47 sont très rarement isolées de l'environnement du patient. Notre objectif était donc d'élucider le phénomène de non détectabilité de la souche ST47 dans l'environnement.

Nous décrivons, tout d'abord, l'étude de l'effet des traitements pré-analytiques sur la cultivabilité de la souche Lorraine ST47 tels que l'acidification et le chauffage, lors de sa détection dans des échantillons d'eau. Nous montrerons également que le milieu GVPC n'est pas un milieu performant pour la détection des légionelles dans les prélèvements cliniques et que son utilisation pour les prélèvements environnementaux peut être discutée.

Nous présenterons également le développement d'un outil de détection spécifique de la souche Lorraine ST47 dans les prélèvements cliniques et environnementaux, de la mise au point à l'évaluation de ses performances.

Parallèlement au travail centré sur la problématique de la souche ST47, nous avons recherché l'existence d'autres sources de contamination possibles par les légionelles. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la contamination de l'eau du robinet par *L. pneumophila*. Cette source de contamination était évoquée dans quelques articles rapportant des cas cliniques comme étant la seule source possible de contamination (176,177). En conjuguant des approches de bactériologie conventionnelle et de biologie moléculaire, nous avons pu rassembler un faisceau d'arguments biologiques en faveur de la présence de *L. pneumophila* dans des aérosols de robinet. Enfin, nous avons tenté de restreindre le champ d'investigation des sources potentielles pour la souche ST47. Nous n'avons pas retenu la stratégie de criblage qui est chronophage. Ainsi, nous avons analysé les différences de caractéristique épidémiologiques entre les clones dominants (ST1, ST23 et ST47) en France entre 2008 et 2012 notamment en termes de facteurs de risque d'exposition. Du point de vue clinique, nous avons montré que les souches ST47 étaient associées à des cas quasi exclusivement communautaires.

2 Effet des traitements pré-analytiques et du milieu de culture sur la cultivabilité de la souche Lorraine

Dans la version de 2003 de la norme NF T90-431, la recherche et le dénombrement par culture des *Legionella spp.* dans l'eau se font à partir d'un prélèvement d'eau d'un litre qui est ensemencé sur un milieu sélectif après une étape de concentration par filtration sur membrane, et une décontamination par chauffage 30 minutes à 50°C et acidification à pH=2,2. Cette norme a évolué en novembre 2014. Ainsi, l'étape de concentration et le pré-traitement par chauffage ont été supprimés au profit d'une filtration directe d'un volume de 100 mL sur membrane de nitrocellulose, suivi d'une acidification de la membrane. Par contre, le milieu sélectif GVPC est le milieu imposé par la norme dans ses deux dernières versions. Reinthaler *et al.* et Wellinghausen *et al.* ont constaté que ce milieu était le plus favorable à la croissance des *Legionella spp.* et le plus efficace pour éliminer la flore interférente (93,186). D'autres études ne vont pas forcément dans ce sens et on montré la supériorité d'autres milieux (187,188).

Concernant la non-détectabilité de la souche Lorraine dans l'environnement, nous pouvons donc formuler l'hypothèse que les traitements pré-analytiques et/ou le milieu de culture utilisé participent à cette absence de détection.

2.1 Effet des traitements pré-analytiques

Nous avons réalisé 2 études pour évaluer l'effet des traitements pré-analytiques sur la cultivabilité de la souche Lorraine. L'objectif étant de comparer les rendements de culture de 6 souches Lorraine par rapport à 6 souches Paris.

2.1.1 Matériels et méthode de la première étude

Nous avons contaminé artificiellement des matrices hydriques par inocula standardisés. Les matrices étaient soit de l'eau stérile en flacon (B-Braun®), soit une solution de Ringer stérile préparée au CNRL. Pour chaque souche (Lorraine ou Paris), 6 isolats ont été testés : la souche de référence en duplicat (CIP108729 pour Lorraine et CIP107629T pour Paris), 2 souches cliniques et 2 souches environnementales. Les inoculums ont été préparés à partir d'une suspension de DO=1 à la longueur d'onde de 550 nm : 10^3 , 10^4 , et 10^5 UFC/L. Les milieux utilisés pour le dénombrement étaient soit des milieux GVPC, soit BCYE.

Les différents concentrats étaient obtenus en filtrant 1 L de matrice hydrique. La membrane filtrante était reprise dans 5 mL d'eau stérile et soniquée pendant 2 minutes correspondant

au concentrat. Un mL du concentrat était chauffé 30 minutes à 50°C et correspondait au concentrat chauffé. Un mL du concentrat était mélangé à 1 mL de solution de pH=2,2 pendant 5 minutes et correspondait au concentrat acidifié. Le rendement était calculé en faisant le rapport entre chacun des concentrats et l'inoculum de la matrice à analyser.

La comparaison statistique des rendements entre les souches Lorraine et Paris a été réalisée avec des tests paramétrique (Student) et non paramétrique (Mann-Whitney) sur SPSS v17.0

2.1.2 Résultats de la première étude

2.1.2.1 Conditions n°1 : eau stérile + milieu GVPC, tous inoculums

Nous avons montré que quelles que soient les conditions de culture et de prétraitement le rendement de culture de la souche Lorraine était inférieur à celui de la souche Paris ($p < 0,001$) (Figure 14).

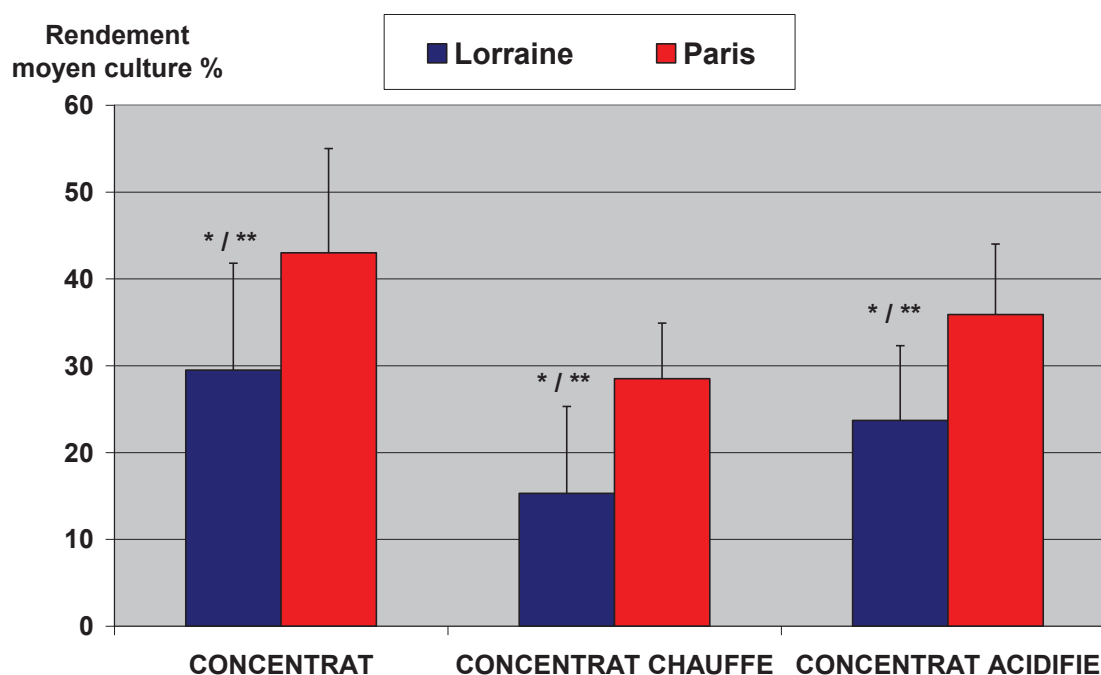


Figure 13. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°1 (* test paramétrique significatif, ** test non paramétrique significatif)

Nous avons cependant remarqué que la différence de cultivabilité entre les souches Lorraine et Paris dépendait de l'inoculum et existait surtout à faibles inoculums (Tableau 9)

Tableau 9. Différence de cultivabilité des souches Lorraine et Paris selon les inocula dans les conditions n°1

Inoculum et concentrat							
	10 ³			10 ⁴		10 ⁵	
Différence Lorraine/Paris	Conc.	Conc. Chauffé	Conc. acidifié	Conc.	Conc. Chauffé	Conc. acidifié	Conc.
p (Student)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	NS	<0.05	NS
p (M-W)	NS	<0.05	<0.05	<0.05	NS	<0.05	NS

NS= non significatif

2.1.2.2 Conditions n°2 : Ringer + milieu GVPC, tout inoculums

Lorsque la matrice étudiée est la solution de Ringer, nous n'avons pas observé de différence de rendement pour le concentrat chauffé. De plus, hormis pour le concentrat, le test non paramétrique était non significatif pour le concentrat acidifié (Figure 15).

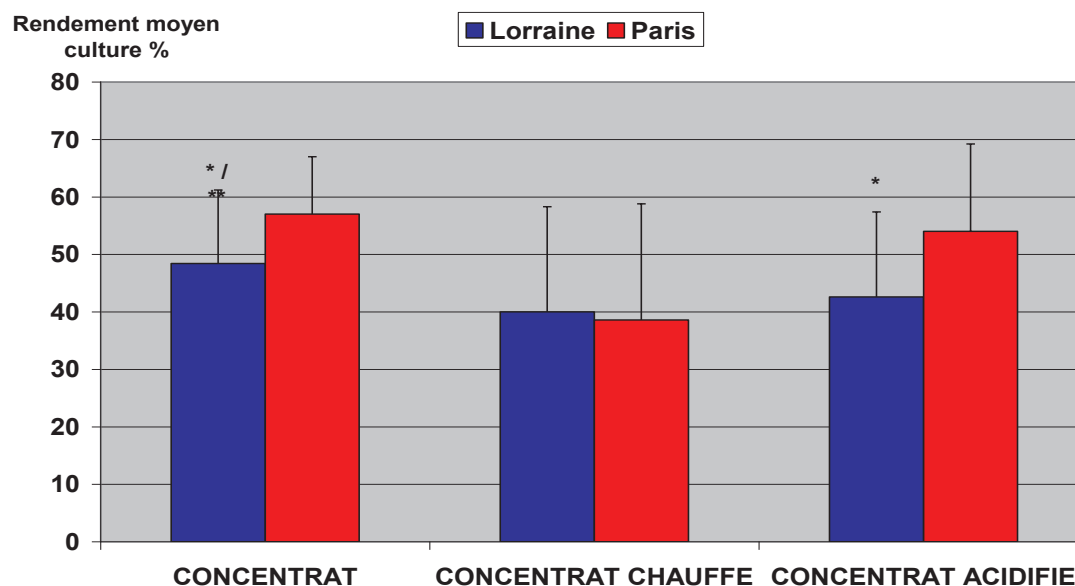


Figure 14. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°2 (* test paramétrique significatif, ** test non paramétrique significatif)

2.1.2.3 Conditions n°3 : eau stérile + souches de référence, milieu BCYE ou GVPC, tous inoculum

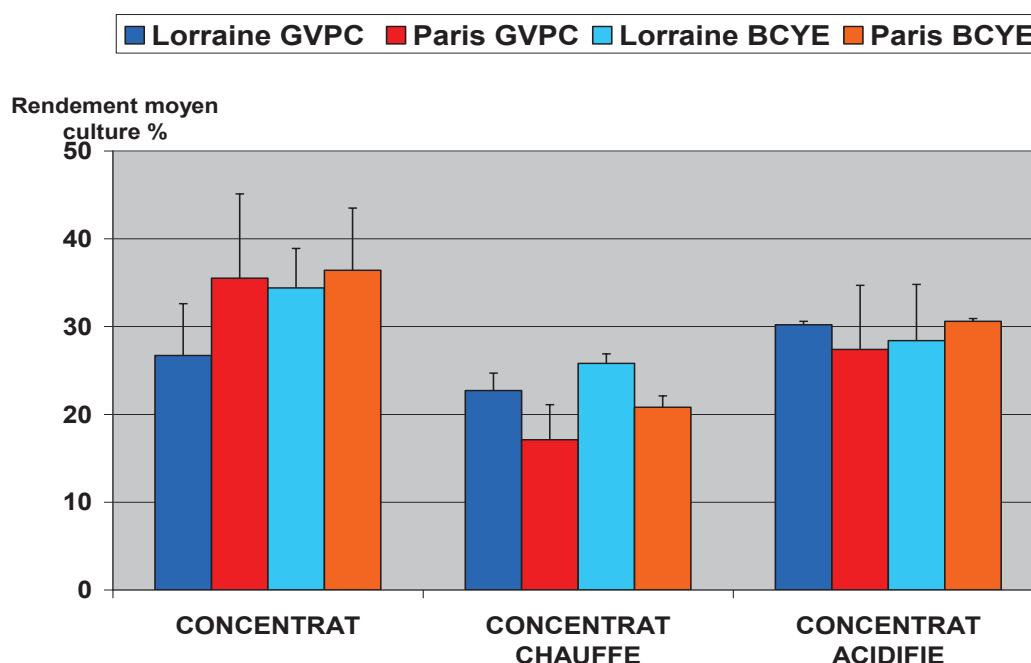


Figure 15. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions n°3

Dans ces conditions expérimentales nous n'avons pas observé de différence significative entre les rendements pour les différents concentrats. On peut donc penser qu'il n'y a pas, dans ces conditions d'influence du milieu de culture (Figure 16).

2.1.3 Objectifs, matériels et méthode de la seconde étude

Lors de la première étude nous avons observé que, comparée à la souche Paris, la moindre cultivabilité de la souche Lorraine dépendait :

- des traitements pré-analytiques (chauffage, acidification)
- de l'inoculum (surtout à faible inoculum)
- de la matrice liquide (plus faible cultivabilité avec l'eau stérile qu'avec le Ringer)

Nous avons voulu confirmer ces résultats en standardisant l'ensemencement des concentrats (ensemenceur automatique easy Spiral®, Interscience) et en triplicquant chaque mesure.

Les conditions de l'étude ont été simplifiées. Nous avons contaminé artificiellement de l'eau stérile en flacon (B-Braun®) par inoculum standardisé à 10^3 UFC/L. Pour chaque souche (Lorraine ou Paris), 6 isolats ont été testés : la souche de référence en duplicat (CIP 108729 pour Lorraine et CIP 107629T pour Paris), 2 souches cliniques et 2 souches environnementales. Hormis les 2 souches environnementales de la souche Lorraine, les isolats cliniques Lorraine et Paris, et environnementaux Paris étaient différents de la 1^{ère} étude. Le milieu utilisé pour le dénombrement était le milieu GVPC. Les différents concentrats étaient obtenus comme décrits précédemment.

La comparaison statistique des rendements entre les souches Lorraine et Paris a été réalisée avec des tests paramétrique (Student) et non paramétrique (Mann-Whitney) sur Stata v8.0.

2.1.4 Résultats de la seconde étude

Nous avons observé que, quelles que soient les conditions de prétraitement, les rendements de culture de la souche Lorraine ne différaient pas de manière significative par rapport à la souche Paris. Néanmoins, une variabilité dans les valeurs des rendements a été observée notamment pour la souche Lorraine. En effet, une souche environnementale Lorraine présentait un rendement de 7% pour le concentrat acidifié correspondant à la valeur minimale observée et de 0% pour le concentrat chauffé correspondant à la valeur minimale outlier (Figure 17).

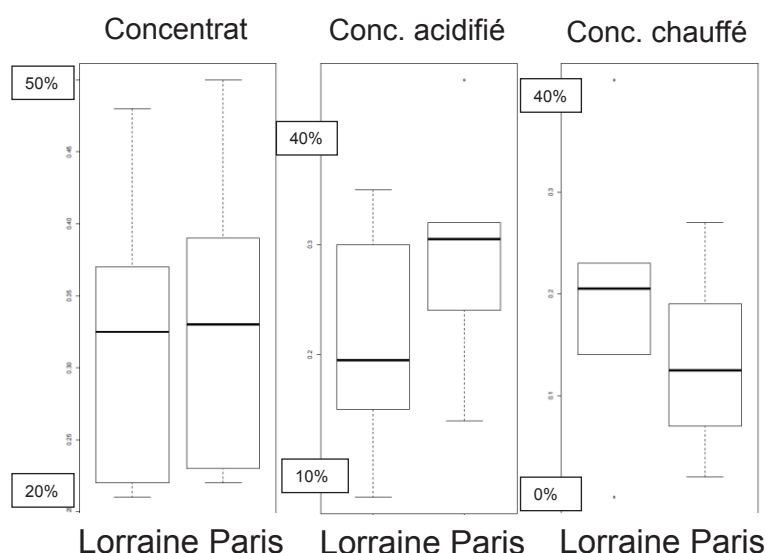


Figure 16. Rendements de culture des souches Lorraine et Paris en fonction des traitements pré-analytiques dans les conditions de la deuxième étude

2.2 Effet du milieu GVPC

Publication n°1

Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples.

Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S

J Microbiol Methods. 2014 Mar;98:119-21

Que ce soit pour la mise en culture de prélèvements d'eau ou de prélèvements respiratoires, la qualité des milieux de culture ensemencés semble jouer un rôle central. Tous les milieux de culture utilisés actuellement ont pour base le milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract). Il permet l'obtention en 4 jours de colonies de *Legionella* présentant un aspect caractéristique en verre fritté à la loupe binoculaire. Ce milieu peut être supplémenté en antibiotiques et antifongiques permettant d'inhiber la flore contaminante oro-pharyngée ou environnementale. Trois milieux sélectifs ont ainsi été développés à partir du BCYE (Tableau 10) :

- le milieu BMPA (189),
- le milieu MWY (190,191),
- le milieu GVPC imposé par la norme NF T90-431.

Tableau 10. Composition en antibiotiques et antifongiques des milieux BMPA, MWY et GVPC

	Céfamandole (mg/L)	Polymyxine B (mg/L)	Anisomycine (mg/L)	Vancomycine (mg/L)	Cycloheximide (mg/L)
BMPA	4	80 000	80		
MWY		50 000	80	1	
GVPC		80 000		1	80

Cependant, aucune étude comparative évaluant les performances des milieux commercialisés pour l'isolement de souches cliniques n'avait été publiée. Les évaluations des milieux réalisées à partir de prélèvements environnementaux présentaient des résultats contradictoires, en particulier pour le milieu GVPC. En effet, selon Reinthaler *et al.*, la sensibilité des milieux GVPC, BMPA et MWY n'était pas significativement différente, néanmoins le milieu GVPC a montré une moindre contamination par la flore interférente

comparé aux autres milieux ce qui le rendait a priori plus adapté pour les matrices environnementales, *a contrario* Lück, en 2004, avait montré une différence statistiquement significative en faveur du milieu BMPA par rapport au milieu GVPC (186–188,192).

Dans cette étude, nous avons montré que les milieux BCYE et GVPC présentaient des performances bien inférieures aux milieux MWY et BMPA, les milieux MWY et BMPA étaient caractérisés par une faible contamination par la flore oro-pharyngée et par des performances supérieures pour les prélèvements présentant un faible inoculum de *Legionella*. L'ensemencement des prélèvements respiratoires sur milieu GVPC n'est donc pas recommandé par le CNRL.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of *Legionella* species from respiratory samples[☆]G. Descours^{a,b,c,d,e,f,*}, P. Cassier^{a,b,c,d,e,f,g}, F. Forey^f, C. Ginevra^{a,b,c,d,e,f}, J. Etienne^{a,b,c,d,e,f}, G. Lina^{a,b,c,d,e,f}, S. Jarraud^{a,b,c,d,e,f}^a CIRI International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France^b INSERM U1111, Lyon, France^c Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France^d Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France^e CNRS, UMR5308, Lyon, France^f Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Legionella National Reference Center, East Biology & Pathology Center, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France^g Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Infection Control Unit, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 October 2013

Received in revised form 3 January 2014

Accepted 3 January 2014

Available online 23 January 2014

Keywords:

Legionella

Respiratory samples

Isolation

MWY

BMPA

GVPC

ABSTRACT

Culture media performance is a critical factor in the isolation of *Legionellae* from respiratory samples. We showed that BMPA and MWY media yielded significantly higher isolation rates than GVPC and BCYE media in regard to performance with samples that harbored low *Legionella* inocula and high contamination levels.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Legionnaires' disease (LD), a severe form of pneumonia, is mainly diagnosed by urinary antigen detection. Nevertheless, *Legionellae* isolation from respiratory secretions by culture is considered the gold standard for diagnosis because of its superior specificity. All *Legionella* species and serogroups can be detected by culture, as it allows epidemiological typing and susceptibility testing.

The reported culture sensitivities range widely from less than 10% to 80%, reflecting the difficulties in improving the isolation of this fastidious and slow-growing bacteria (Murdoch, 2003). Laboratories experienced in *Legionellae* isolation are more likely to recover the organism. Delays in respiratory sample processing, the prior use of antimicrobial therapies and culture overgrowth by other oropharyngeal bacteria are additional factors that limit the culture yields.

Over the last decades, specific formulated media have been developed, resulting in several buffered charcoal yeast extract (BCYE) agars

with or without selective added agents that inhibit competing flora (Edelstein, 1981). The culture medium quality is a critical factor in *Legionellae* isolation. Several studies have been performed to compare these selective media during *Legionellae* isolation from water samples (Edelstein, 1982; Luck et al., 2004; Reinthaler et al., 1993; Ta et al., 1995). However, their performances in *Legionellae* isolation from human samples have not yet been evaluated. Therefore, we performed a comparative assessment of four commercially available media for *Legionellae* recovery from respiratory samples.

This prospective study included 328 patients with suspected LD who were admitted to French hospitals from September 2010 to June 2012. A LD case was defined as a patient with clinical and/or radiological findings compatible with pneumonia and at least one of the following positive tests for *Legionella*: urinary antigen, axenic culture, amoebic coculture, *Legionella*-specific PCR and nested sequence-based typing (Descours et al., 2012; Ginevra et al., 2009; Jarraud et al., 2013). A total of 328 respiratory samples (127 sputa, 61 tracheo-bronchial aspirations (TBA) and 140 broncho-alveolar lavages (BAL)) were collected. If necessary, the sputa were liquefied with dithiothreitol (Sputasol®, Oxoid, Dardilly, France).

The non-selective medium used in this study was the buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar (Oxoid). The selective media were BCYE supplemented with cefamandole (4 mg/L), polymyxin B (80,000 UI/L)

[☆] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author at: Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Legionella National Reference Center, East Biology & Pathology Center, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex, France. Tel.: +33 4 78 77 86 57.

E-mail address: gdescours@univ-lyon1.fr (G. Descours).

and anisomycin (80 mg/L; BMDA medium; Oxoid); BCYE supplemented with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (80,000 UI/L) and cycloheximide (80 mg/L; GVPC medium; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and BCYE supplemented with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (50,000 UI/L) and anisomycin (80 mg/L; MWY medium; Oxoid). The axenic culture was performed within 24 h of arrival at the laboratory. Specimens that were not immediately plated were refrigerated at 4 °C until processed. From each sample, 100 µL were inoculated without heat or acid pretreatment onto five plates, 1 BCYE, 2 BMDA, 1 GVPC and 1 MWY. The inoculated plates were incubated for 10 days at 35 °C in an aerobic atmosphere (BCYE, BMDA) or in a 2.5% CO₂ atmosphere (BMDA, GVPC, MWY) and inspected on days 3, 5 and 10 after inoculation. The presumptive colonies were subcultured on BCYE agar plates and serogrouped with latex agglutination (Slidex® *Legionella* kit, BioMérieux) and polyclonal antibodies produced in our laboratory for indirect fluorescent antibody staining (Jarraud et al., 2013).

Among the 328 patients, 183 LD cases were diagnosed; these comprised 178 *Legionella pneumophila* and 5 other *Legionella* species. A total of 96 samples were culture-positive for *L. pneumophila* according to one to five plates (sensitivity, 52.5%), including 93 samples with *L. pneumophila* serogroup 1 (Lp1), and 1 each with Lp2, Lp5 and Lp8. No other *Legionella* species grew. Most cultures (95.7%) were positive on days 3 or 5. The sampling type did not lead to statistically significant differences in the culture performances ($p = 0.079$, Chi-Square test).

Significant differences in *Legionella* recovery from the respiratory samples were observed for the five inoculated plates ($p < 0.001$, Chi-Square test). Their respective performances were BMDA (2.5% CO₂), 41%; MWY (2.5% CO₂), 40.4%; BMDA (air), 37.7%; GVPC (2.5% CO₂), 25.7% and BCYE (air), 21.3%. As described by Feeley et al. on BCYE, we observed a slightly greater number of colonies on BMDA plates incubated in a 2.5% CO₂ atmosphere than in BMDA plates incubated on air, which did not reach a statistical significance ($p = 0.52$, Chi-Square test) (Feeley et al., 1979; Feeley et al., 1978). The differences observed between the five inoculated plates correlated with low *Legionella*-load samples (<10 CFU/plate) ($p < 0.0001$, Chi-Square test) (Fig. 1). Similarly, significant differences in sample contamination by oropharyngeal flora were observed ($p < 0.001$, Chi-Square test) (Fig. 2). BMDA and MWY were the most sensitive and least contaminated media. The combined isolation rate for the BMDA and MWY plates yielded a sensitivity of 48.1%.

When selecting an appropriate culture method, maximal sensitivity for the isolation of *Legionella* strains is desirable. A major factor is the quality of the culture media used. To our knowledge, there are no published data regarding the performances of commercially available agar plates, although *Legionella* isolation from respiratory samples is performed in several laboratories.

We found that selective media supplemented with antibiotics and antifungals yielded significantly higher isolation rates than BCYE medium, as demonstrated by Leoni and Legnani with hot water systems (Leoni and Legnani, 2001). Among these, the higher recovery rates

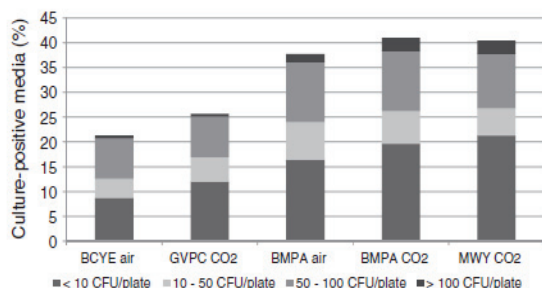


Fig. 1. Media performances with regard to the number of *Legionella* colonies on BCYE, GVPC, BMDA and MWY plates.

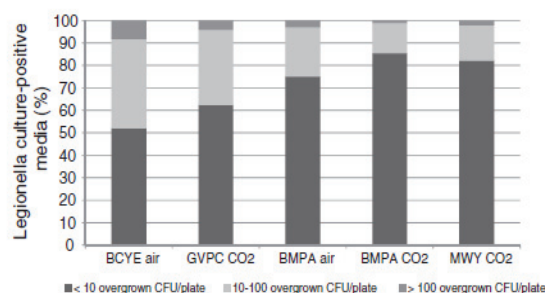


Fig. 2. Other bacterial overgrowth of BCYE, GVPC, BMDA and MWY among *Legionella* culture-positive media.

obtained with MWY and BMDA media were related to their performances with samples that harbored low levels of *Legionella* inocula and their low contamination levels. Their performances may be related to anisomycin B, an antifungal component inhibiting the growth of oropharyngeal yeasts and missing in GVPC medium. Several authors demonstrated similar results with hot water samples, whereas Reinthaler et al. observed no differences between culture media before heat or acid pretreatment (De Luca et al., 1999; Edelstein, 1982; Luck et al., 2004; Reinthaler et al. 1993). Our results suggest that the combination of MWY and BMDA plates provides an efficient *Legionella* isolation rate from respiratory specimens. The use of a combination of GVPC and BCYE is not recommended.

This work was limited to the comparison of four plates provided by two different manufacturers. A comparison of the performances of MWY, BMDA and GVPC media from several suppliers for the isolation of *Legionella* would complete this study, although Luck et al. have ever demonstrated no significant difference between four GVPC media for the isolation of *Legionella* from water samples. Moreover, the strains isolated in our study were all *L. pneumophila*. The glycine and cefamandole contained in these media have been shown to possibly inhibit the growth of any non-*pneumophila* species (Lee et al., 1993; Ta et al., 1995). On the basis of this literature data, the addition of BCYE to MWY and BMDA plates may be recommended when other *Legionella* species are suspected. Finally, sample processing by heat or acid buffer pretreatment, which was not evaluated in this study, is also critical to increase the culture sensitivity by reducing the overgrowth of other bacteria (Buesching et al., 1983; Edelstein et al., 1982). The combination of an optimal culture media choice and sample pretreatment could enhance the isolation of *Legionella* strains from overgrown respiratory samples.

References

- Buesching, W.J., Brust, R.A., Ayers, L.W., 1983. Enhanced primary isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens by low-pH treatment. *J. Clin. Microbiol.* 17, 1153–1155.
- De Luca, G., Stampi, S., Lezzi, L., Zanetti, F., 1999. Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiol.* 22, 203–208.
- Descours, G., Suet, A., Ginevra, C., Campese, C., Slimani, S., Ader, F., Che, D., Lina, G., Jarraud, S., 2012. Contribution of amoebic coculture to recovery of *Legionella* isolates from respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1725–1726.
- Edelstein, P.H., 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* 14, 298–303.
- Edelstein, P.H., 1982. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 16, 697–699.
- Edelstein, P.H., Snitzer, J.B., Bridge, J.A., 1982. Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. *J. Clin. Microbiol.* 16, 1061–1065.
- Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C., Smith, H.W., 1978. Primary isolation media for *Legionnaires disease bacterium*. *J. Clin. Microbiol.* 8, 320–325.
- Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., Baine, W.B., 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 10, 437–441.

- Ginevra, C., Lopez, M., Forey, F., Reyrolle, M., Meugnier, H., Vandenesch, F., Etienne, J., Jarraud, S., Molmeret, M., 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* 47, 981–987.
- Jarraud, S., Descours, G., Ginevra, C., Lina, G., Etienne, J., 2013. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol. Biol.* 954, 27–56.
- Lee, T.C., Vickers, R.M., Yu, V.L., Wagener, M.M., 1993. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2764–2768.
- Leoni, E., Legnani, P.P., 2001. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J. Appl. Microbiol.* 90, 27–33.
- Luck, P.C., Igel, L., Helbig, J.H., Kuhlisch, E., Jatzwauk, L., 2004. Comparison of commercially available media for the recovery of *Legionella* species. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 589–593.
- Murdoch, D.R., 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36, 64–69.
- Reinthal, F.F., Sattler, J., Schaffler-Dullnig, K., Weinmayr, B., Marth, E., 1993. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1213–1216.
- Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L., Wagener, M.M., 1995. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2118–2123.

3 Mise au point d'un outil de détection spécifique de la souche Lorraine ST47 de *Legionella pneumophila*

Publication n°2 (en cours)

Multicentre evaluation of a real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST47 in clinical and environmental samples by the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI)

Cassier P, Mentasti M, David S, Afshar B, Underwood AJ, Etienne E, Jarraud S, Harrison T

L'analyse comparée de 6 génomes de *L. pneumophila* sg1 a montré une grande diversité génétique au sein de souches qui appartiennent à la même espèce et au même séro groupe (36). En effet, les auteurs rapportaient l'existence de 183 gènes spécifiques dans le génome de la souche Lorraine, soit 10 à 12 % des gènes par rapport aux 5 autres génomes. La mise au point d'un outil de détection spécifique.

Nous avons donc tout d'abord « BLASTé » l'ensemble des séquences spécifiques (gènes + séquences intergéniques) pour actualiser le panel de séquences spécifiques disponibles. Au final, 35 couples d'amorces (23 cibles géniques, 12 cibles intergéniques) ont été testés sur 95 souches : 8 *L. pneumophila* sg1 Lorraine, 16 *L. pneumophila* sg1 non Lorraine, 15 *L. pneumophila* sg2-14 de référence, 40 *Legionella spp.*, 16 non *Legionella*. La séquence intergénique entre les gènes LPOv2_1073 et LPOv2_1074 a été sélectionnée et testée sur un plus grand nombre de souches (n=285).

L'étape suivante a été un passage en PCR temps réel avec sonde d'hybridation pour valider la spécificité et la limite de détection. Une sonde FRET a tout d'abord été testée. Elle a montré une bonne spécificité mais une limite de détection trop élevée (1 000 UG/μL). Une sonde Taqman a ensuite été évaluée et a montré une très bonne limite de détection à 2,36 UG/μL et une spécificité de 91% sur l'ensemble des souches testées. Notre choix s'est donc porté sur la sonde Taqman. Nous avons évalué les performances de cette PCR en temps réel tout d'abord sur des prélèvements cliniques puis sur des prélèvements environnementaux.

Premièrement, nous avons montré que la PCR restait spécifique sur prélèvements respiratoires (Tableau 11). L'évaluation s'est faite en 2 temps :

- sur des prélèvements avec culture positive pour *L. pneumophila* sg1 i. e. avec une souche de disponible typée par SBT,

- sur des prélèvements avec culture négative pour *L. pneumophila* sg1 dont le typage moléculaire a été réalisé par nested-SBT.

Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11. Evaluation de la PCR ST47 sur des prélèvements respiratoires

Extraits d'ADN de prélèvements respiratoires						
Prélèvements culture +			Prélèvements culture –			
Typage moléculaire sur souche (SBT)			Typage moléculaire sur prélèvement (nested SBT)			
ST47		Autres ST	ST47 (7/7 loci)	Possible (1-6 loci)	ST47	Autre ST
PCR ST47	Positive	6/6	1/93*	2/2	9/18	0/63
	Négative	0/6	92/93	0/2	9/18	63/63

*souche ST109; ST proche, pulsotype Lorraine

Deuxièmement, les prélèvements d'environnement utilisés pour l'évaluation des performances de la PCR étaient des eaux de TAR ou des eaux chaudes sanitaires, et provenaient du quart Nord-Est de la France (de Chalon sur Saône à Strasbourg). Les extraits d'ADN retenus étaient soit positifs ou inférieurs à la limite de quantification en PCR *L. pneumophila*. Au total, 40 échantillons ont été testés et la PCR spécifique de la souche ST47 Lorraine s'est révélée négative pour l'ensemble des prélèvements.

L'équipe de Tim Harrison à Londres a également développé une PCR spécifique de détection de la souche ST47 en réalisant une évaluation *in silico* de la cible choisie. Nous avons évalué les performances de cette PCR avec la même méthodologie que pour la nôtre, à savoir : spécificité sur plus de 360 souches, détermination de la limite de détection et évaluation sur prélèvements cliniques et environnementaux. L'évaluation comparative des performances des 2 PCR nous a conduits à retenir la PCR développée par T. Harrison, et, nous avons choisi de publier nos résultats conjointement. La publication n°2, actuellement en cours de rédaction, décrit donc les 2 approches complémentaires d'évaluation d'une PCR spécifique de détection de la souche ST47 Lorraine.

Introduction

Legionnaires' disease (LD) is an often severe respiratory infection caused by Gram-negative bacteria belonging to the *Legionella* genus. The infection is acquired through inhalation of aerosols from sources contaminated with *Legionellae*. Among the more than 60 *Legionella* species so far described, *Legionella pneumophila* alone is responsible for ca. 90% of LD cases (1). Outbreak or sporadic LD cases are associated with many environmental sources such as hot water systems, whirlpool spas, cooling towers, decorative fountain (2), consequently highly discriminatory typing methods are essential to establish clonal relatedness between clinical and environmental strains of *L. pneumophila* during epidemiological investigations (3). Moreover, they are also a useful tool to investigate geographic and temporal distribution of strains (4–7). DNA sequence-based typing (SBT) is the gold standard for typing of *L. pneumophila* isolates. Isolates can be characterized by SBT (8–10) or by nested SBT (nSBT) directly on clinical samples (11–13). Significantly, some strains are more likely to cause disease than are others. International epidemiological typing data (3600 isolates, 36 countries) showed that 46% of unrelated clinical cases were caused by only six strains: ST1, ST23, ST37, ST42, ST47 and ST62 (14).

ST47, is the leading cause of community acquired LD cases in Northern Europe (4,6,15,16), but in contrast to the other common clinical ST, it is very rarely isolated from environmental samples when investigations to identify the source of ST47 cases are undertaken (17). Indeed, a different prevalence of STs in clinical and environmental isolates was observed for ST47 strains, accounting for 13.6% of clinical isolates but only 0.4% of environmental isolates respectively (14). Thus its environmental habitat is unknown.

To detect and identify ST47 strains from environmental and clinical samples, we developed a ST47 specific real-time PCR method. This qPCR was evaluated in two different formats, multiplex or simplex assays, in two laboratories.

Material and methods

Participating centres and overall study design. The PHE, Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit (London, United Kingdom), “Lab 1”, designed primers and probes for the ST47 assay and validated the assay in a multiplex format assay using the Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany); the National Reference Centre of *Legionella* (Lyon, France), “Lab 2”, validated the assay in a simplex format on the LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Genomic sequences. When the study was initiated data were available for 32 isolates(18). Later data were obtained for an additional 333 isolates (David et al, 2016?) and these were used in the in silico evaluation of the assay. A further 19 isolates were newly sequenced for this study by paired-end sequencing on the Illumina HiSeq platform with read length of 100 bases.

Assay design. At the time of the study, DNA sequences for 32 strains, representative of the *L. pneumophila* population structure, were available (18). Comparison between these sequences and the genome of the Lorraine strain (LPO), the *L. pneumophila* sg1 ST47 type strain (19) allowed the identification of 14 targets potentially specific for ST47. Primers were designed to amplify four targets, chosen because they were on the chromosome and not on the plasmid. After testing these different targets on the design panel, a 142bp fragment from “ORF 27” (located on LPOv2_1073 gene), was selected as it amplified DNA exclusively from the ST47 strain. A specific taqman probe was then designed to bind ORF27 within the 142bp fragment (Table 1).

Bacterial isolates. A total of 387 *Legionella* isolates were selected from the culture collections of the two centres. 106 *L. pneumophila* Sg1 ST47, 160 *L. pneumophila* sg1 non-ST47, 55 *L. pneumophila* serogroup 2-16, three *L. pneumophila subsp. pascullei* and 66 non-*pneumophila Legionella* spp. isolates. Additionally, representatives of 16 non-*Legionella* species frequently present in aquatic environments were tested as recommended by French standards / previously described (20) (Table2 and supplementary table). DNA was extracted from pure cultures using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or Wizard (Promega UK, Southampton, UK) and DNA concentrations were determined by spectrophotometry at 260 nm (Nanodrop, Wilmington, DE). DNA extracts were kept at below –20°C until use.

Clinical samples. In Lab 1, among the 230 respiratory samples submitted from hospitals in England and Wales between August 2013 and October 2014, 175 were found to be *L. pneumophila* positive by PCR (21). After primary processing, sufficient volume of DNA extract (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)) remained from 106/175 patients (one sample per patient) for further analysis.

In Lab 2, a total of 105 respiratory samples from patients with culture-proven Legionnaires' disease (LD) cases were collected from hospital in France between January 2008 and August 2013. DNA was extracted using the MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) as previously described (11). To show the absence of PCR inhibitors, these samples were tested in parallel with a *L. pneumophila* sg1 qPCR assay adapted from Mérault *et al.* (20).

ST47 simplex assay. Reaction mixture contained 5 µl of DNA, 1.6 µl of each primer (ORF 27_FP and ORF 27_RP; concentration: 10 pmol/ µl), 0.4 µl of Sg1-specific probe (concentration: 10 pmol/ µl), 2 µl of TaqMan master mix (Roche), 2.4 µl of MgCl₂ at 25 mM and 7µl purified PCR-grade water to a final volume of 20 µl. Amplification was performed on a LightCycler with the following parameters: one step at 95°C for 5 min (initial denaturation and Taq activation); and 45 cycles of 15 s at 95°C and 15 s at 60°C. For clinical samples, the same PCR protocol was used, but reaction mixtures contained 10 µl of DNA.

The ST47 *L. pneumophila* sg1 strain used to establish limit of detection was a reference strain (CIP 107829). DNA was extracted as previously described (11) and DNA quantified by *L. pneumophila* sg1 qPCR assay using a range from 5.3 to 10600 GU/ µl of standard *L. pneumophila* sg 1 DNA (SRM_LEGDNA_01) prepared from the Philadelphia type strain (ATCC 33152).

ST47 triplex assay. The ORF27 assay was combined with a *L. pneumophila* sg 1 assay, targeting wzm (20), and an internal process control (IPC), targeting the gfp gene (22), to check for inhibition (Table 1). PCR reactions were performed in a final volume of 20 µL containing 10 µL of Rotor-Gene Multiplex PCR Kit (Qiagen, Germany), 0.5pg of gfp DNA, 0.5 µM of each ORF27 and wzm primers, 0.2 µM of ORF27 and wzm probes, 0.05 µM of each gfp primer and 0.1 µM of gfp probe. 5 µL of template were added to 15 µL of PCR mix into 0.1mL thin walled tubes (Qiagen, Germany). Taq polymerase was activated at 95°C for 3min, followed by 45 cycles of denaturation (95°C for 15sec) and annealing/extension (60°C for 30sec). Results were analysed in the green, orange and crimson channels using v2.1.0.9 of the Rotor-Gene Q software. The instrument was set to ignore fluorescent signals in the first 15 cycles and to use 0.025 as threshold value.

Table 1: Primers and probes used for real-time ST47 PCR assay

Name	Sequence (5' → 3')	Target	Amplicon	Reference
wzm_FP	CAAAGGGCGTTACAGTCAAACC	<i>wzm</i>	75	(193)
wzm_RP	GACAAACACCCCAACCGTAATCA			
wzm_HP	FAM -CTTGGGATTGGGTTGGGTTATTTAACTCC- BHQ1			
ORF27_FP	GGAGCCGCTGGAAGTTTATCA	<i>ORF27</i>	142	This study
ORF27_RP	CTCTTTGAGCCAACCTAGTAACG			
ORF27_HP	TexasRed -AGTTACAGCTCAATCTCCAGAAATGCAGG- BHQ2			
gfp_FP	CCTGTCCTTTTACCAGACAACCA	<i>gfp</i>	77	(194)
gfp_RP	GGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCT			
gfp_HP	ATTO680 -TACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCG- BHQ3			

Results and discussion

In silico evaluation

BLASTn analysis revealed 100% homology of ORF27 only for the genome of the ST47 type strain 'Lorraine'. In silico analysis showed 100% sequence identity of ORF27 in all 122 ST47 strains for which WGS data were available. Nucleotide sequence was translated using "Translate Tool" from ExPaSy website (<http://web.expasy.org/translate/>) and submitted to PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) an online tool able to assign putative protein sequences to protein families. No match was found by PFAM between ORF27 and the database of protein families. Moreover, no significant hits were observed with any of the 243 other strains for which we had WGS data. These data cover 82 different STs including those most commonly encountered.

In vitro evaluation

Specificity

Evaluation of the specificity of the ORF27 primers and the Taqman probe was carried out on the above described strain collection in either the simplex format, the triplex format, or both (Table2, supplementary table). All 106 *L. pneumophila* ST47 isolates gave a positive result while, with the exception of French ST109, all other isolates of *L. pneumophila* (215 isolates representative of 95 STs), non-*pneumophila* *Legionella* species (66), and non-*Legionella*

species (16) gave a negative result. Of the 15 ST109 isolates examined all nine from France gave a positive result while all five from England/Wales gave a negative result.

Table 2: Bacterial strains used in the study

Number and origin of strains tested					
Species	Serogroup	Lab 1 only	Lab 2 only	Both Labs 1 and 2	Total
<i>L. pneumophila</i>					321
	1 ST47	1 ref. 103 clin. 2 env.	0	0	106
	1 non-ST47	2 ref. 127 clin.	15 ref.	1 ref. 14 clin. 1 env.	160
	2	5 clin.	0	1 ref.	6
	3	7 clin.	0	1 ref.	8
	4	5 clin.	0	1 ref.	6
	5	5 clin.	1 ref.	1 ref.	7
	6	3 clin.	1 ref.	1 ref.	5
	7	3 clin.	0	1 ref.	4
	8	4 clin.	0	1 ref.	5
	9	0	0	1 ref.	1
	10	1 clin.	0	1 ref.	2
	11	1 clin.	0	1 ref.	2
	12	0	0	1 ref.	1
	13	0	0	1 ref.	1
	14	1 clin.	0	1 ref.	2
	15	0	0	1 ref.	1
	16	0	1 ref.	0	1
	<i>subsp. pascullei</i>	0	3 ref.	0	3
<i>L. non-pneumophila</i>		7 ref.	18 ref.	41 ref.	66
Non <i>Legionella</i>		2 ref. 14 clin.	0	0	16
Total		293	39	71	403

WGS analysis of ST109

Analysis of the WGS data confirmed that ORF27 was present in all nine of the ST109s isolated in France but in none of the five ST109s isolated in England/Wales. Furthermore the French ST109s are more closely related to the ST47s than are the England/Wales ST109s being located between the ST47s and UK ST109s in a phylogenetic tree.

So the ST47s and French ST109s diverged most recently, and together these diverged with the UK ST109s some time before that. Eight recombination regions were acquired by the ST47s/French ST109s since they diverged from the UK ST109s. In addition, the ST47s/French ST109s also acquired an insertion which brought in ORF27 after their divergence with the UK ST109s, explaining the PCR results. Since these events, the ST47s have also acquired a further two recombinant regions after they diverged from the French ST109s. While these two events brought in many thousands of SNPs, if SNPs from these recombined regions are excluded only 5-10 vertically-inherited SNPs separate the French ST109s and ST47s.

Sensitivity

Serially diluted DNA extracts of the *L. pneumophila* ST47 reference strain (CIP 108729) were used as qPCR templates to evaluate the sensitivity of the simplex PCR. They ranged from 2.6 to 5190 GU/ μ L. The sensitivity was defined as the smallest number of Genome Units (GU) per qPCR that gave a positive result in at least 90% of replicates. The detection limit was 130 GU/ μ L.

Clinical samples

ST47 triplex assay. A full SBT profile was determined (either by culture or nSBT) for 76/106 patients: 22 were ST47 and the remaining 54 comprised 43 different STs. Only a partial SBT profile could be determined for 17/106 patients but in all of these the partial profile excluded the possibility that they were infected by ST47. No SBT alleles could be determined from samples for 13/106 patients but all were positive for *L.pneumophila* serogroup 1 by PCR.

The samples from each of the 71 patients infected by a non-ST47 strain were negative in the ORF27 PCR while the samples from all 22 patients with ST47 strains were positive in the ORF27 PCR. Samples from 4/13 of the *L.pneumophila* serogroup 1 PCR positive patients from whom no SBT alleles could be determined were positive in the ORF27 PCR, a proportion consistent with that seen in the culture proven cases (22/93 (23.7%) vs. 4/13 (30.8%) add P value?).

Table 3: Analysis of pulmonary samples by ORF27 PCR

SBT performed on strain or nSBT (Lab1)					
		ST 47	Other STs		No SBT alleles
			Full SBT	Partial SBT (1-6 loci)	
ORF27	Positive	22	0	0	4
PCR	Negative	0	54	17	9

Conclusion

In this paper, we describe the design and validation of two different assays, a simplex and a triplex qPCR, for the rapid detection and characterisation of *L. pneumophila* sg1 ST47.

A genomic approach was used to rationally identify a target specific for ST47 and a wide number of experiments, both in silico and in vitro, were used to validate the two assays.

This ST47 qPCR can also be applied now to identify the environmental source of this clone. In our future work we will evaluate its performance and set it up for testing environmental samples. This would allow in long term to better adapt the disinfection measures in the environment to prevent the spreading of this virulent *L. pneumophila* clone.

With WGS becoming more and more affordable and quick, this approach opens new strategies during outbreak investigation: in theory a similar assay can be used to design a panel of molecular tests detecting other common *L. pneumophila* sg1 STs (i.e. ST1; ST23; ST37; ST42; ST47; ST62;) to be used to confirm/exclude outbreak... the genome of a clinical strain isolated during an outbreak could be quickly sequenced and a specific molecular assay designed to test environmental samples to find the possible source of the outbreak.

References

1. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, *et al.* Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis.* 2002 1;186:127–8.
2. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, *et al.* Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:1011–21.

3. Campese C, Roche D, Clément C, Fierobe F, Jarraud S, de Waelle P, *et al.* Cluster of Legionnaires' disease associated with a public whirlpool spa, France, April-May 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010 1;15.
4. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2009;28:781–91.
5. Fontana S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2014;304:597–602.
6. Vekens E, Soetens O, De Mendonça R, Echahidi F, Roisin S, Deplano A, *et al.* Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2012;17:20302.
7. Qin T, Zhou H, Ren H, Guan H, Li M, Zhu B, *et al.* Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:2150
8. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, *et al.* Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2047–52.
9. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1965–8.
10. Mentasti M, Underwood A, Lück C, Kozak-Muiznieks NA, Harrison TG, Fry NK. Extension of the *Legionella pneumophila* sequence-based typing scheme to include strains carrying a variant of the N-acylneuraminate cytidyltransferase gene. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;20:O435–41.
11. Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, *et al.* Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2009;47:981–7.
12. Mentasti M, Fry NK, Afshar B, Palepou-Foxley C, Naik FC, Harrison TG. Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2012 Aug;31:2017–28.

13. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol* Clifton NJ. 2013;954:119–48.
14. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol*. 2010;76:1–11.
15. Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LPB, Van der Zwaluw K, Jansen R, Yzerman EPF. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 May;14(5):459–66.
16. Ginevra C, Forey F, Campèse C, Reyrolle M, Che D, Etienne J, *et al*. Lorraine strain of *Legionella pneumophila* serogroup 1, France. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:673–5.
17. Schalk JAC, Euser SM, van Heijnsbergen E, Bruin JP, den Boer JW, de Roda Husman AM. Soil as a source of *Legionella pneumophila* sequence type 47. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2014 ;27:18–9.
18. Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiol*. 2013;13:302.
19. Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, *et al*. Comparative analyses of *Legionella species* identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol*. 2014;15:505.
20. Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, *et al*. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:1708–17.
21. Mentasti M, Kese D, Echahidi F, Uldum SA, Afshar B, David S, *et al*. Design and validation of a qPCR assay for accurate detection and initial serogrouping of *Legionella pneumophila* in clinical specimens by the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2015;34:1387–93.
22. Murphy NM, McLauchlin J, Ohai C, Grant KA. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Int J Food Microbiol*. 2007 Nov 30;120(1-2):110–9.

4 Existence d'autres sources de contamination

Publication n° 3:

Hospital washbasin water: risk of *Legionella*-contaminated aerosol inhalation.

Cassier P, Landelle C, Reyrolle M, Nicolle MC, Slimani S, Etienne J, Vanhems P, Jarraud S.

***J Hosp Infect.* 2013 Dec;85(4):308-11.**

Les sources de contamination potentielles de la légionellose sont très variées et ont été largement décrites dans la littérature. Les eaux chaudes sanitaires représentent une part non négligeable de ces réservoirs. A l'hôpital, dans les établissements recevant du public, ou à domicile, les douches sont très souvent incriminées. Cependant dans quelques cas, les robinets étaient la seule source possible de contamination (195,196). Nous avons donc cherché à savoir si des légionelles pouvaient être détectée par culture, PCR quantitative, par un immunoessai et par un test de viabilité dans les aérosols générés par un robinet contaminé par *L. pneumophila* et *L. anisa*.

Deux appareils (CIP 10-M et Biosampler) placés de part et d'autre du robinet ont permis de recueillir 20 échantillons d'aérosols chacun. Pour les 40 aérosols, les cultures de *Legionella* sont restées négatives. Cependant, de l'ADN de *Legionella spp.* a été détecté dans 18/40 aérosols, dont 4 échantillons supérieurs à la limite de quantification (480 UG/L). Dans une moindre mesure, de l'ADN de *Legionella pneumophila* a été détecté dans 6/40 aérosols, néanmoins les valeurs étaient toutes comprises entre la limite de détection et la limite de quantification.

Dans un deuxième temps, un immunoessai et un test de viabilité ont été réalisés sur 4 séries de prélèvement (eau du robinet et aérosols) supplémentaires. L'immunoessai a révélé des quantités variables de *L. pneumophila* sg1 et/ou de *L. anisa* : plus de 10 bactéries par champ dans les prélèvements d'eau et jusqu'à 15 bactéries pour 100 champs dans les aérosols. Le test de viabilité a montré, quant à lui, la présence de bactéries vivantes et mortes dans tous les types d'échantillon.

Bien que des légionelles n'aient pas été détectées en culture dans les aérosols de robinet, nous avons montré dans cette étude qu'il existait un faisceau d'arguments biologiques en faveur d'aérosols contaminants. En effet, de l'ADN de *Legionella spp.* et de *L. pneumophila* a été détecté par qPCR et par immunoessai dans ces échantillons. Les robinets sont donc des sources potentielles à ne pas négliger que ce soit en termes de prévention du risque infectieux, ou lors d'investigation de cas de légionellose notamment chez les patients immunodéprimés ou pour la recherche de souches de *L. pneumophila* ST47.



Short report

Hospital washbasin water: risk of legionella-contaminated aerosol inhalation

P. Cassier^{a,b}, C. Landelle^a, M. Reyrolle^b, M.C. Nicolle^a, S. Slimani^b, J. Etienne^b, P. Vanhems^a, S. Jarraud^{b,*}

^aGroupement Hospitalier Edouard Herriot, Service d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^bCentre National de Référence des Légionelles, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2013

Accepted 3 August 2013

Available online 5 September 2013

Keywords:

Aerosol

Impingement

Legionella

Tap water

Washbasin

SUMMARY

The contamination of aerosols by washbasin water colonized by legionella in a hospital was evaluated. Aerosol samples were collected by two impingement technologies. Legionella was never detected by culture in all the (aerosol) samples. However, 45% (18/40) of aerosol samples were positive for *Legionella* spp. by polymerase chain reaction, with measurable concentrations in 10% of samples (4/40). Moreover, immunoassay detected *Legionella pneumophila* serogroup 1 and *L. anisa*, and potentially viable bacteria were seen on viability testing. These data suggest that colonized hospital washbasins could represent risks of exposure to legionella aerosol inhalation, especially by immunocompromised patients.

© 2013 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Inhalation of aerosols containing *Legionella pneumophila*, generated from contaminated water, can induce Pontiac fever and Legionnaires' disease in humans. For instance, the presence of legionella in shower aerosols has been reported by Bauer *et al.* and correlated with increased risk of Pontiac fever among older people in retirement homes.¹ Therefore, detection of *L. pneumophila* in aerosols is essential to characterize diverse microbial exposures and avoid danger to humans.

Different techniques, comprising liquid impingement or agar impaction, have been developed for legionella detection in aerosols.² Viable legionella has been grown by culture assay

of aerosol samples, and DNA of viable and non-viable legionellae assessed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR).³ When qPCR is combined with propidium monoazide, only DNA from viable legionella is evident.⁴

In addition to showers, tap water is hypothesized to be the single source of contamination, especially in high-risk patients.^{5,6} While washbasins are suspected to be a source of Legionnaires' disease when water is contaminated by legionella, it has not been readily apparent, up to now, that airborne aerosols around taps contain the bacterium.⁷ The present study aims to evaluate the contamination of aerosols by washbasin water colonized by legionella.

Methods

A legionella-colonized washbasin tap with fluctuating hot water temperature – from 23.4 to 43.2 °C for pre-flushing samples and from 47.2 to 57.4 °C for post-flushing samples –

* Corresponding author. Address: Centre National de Référence des Légionelles, Groupement Hospitalier Est, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel 69500 Bron, France. Tel.: +33 472129665; fax: +33 472129625.

E-mail address: sophie.jarraud@chu-lyon.fr (S. Jarraud).

Table I
Detection of legionella from water and aerosol samples by conventional culture and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Samples	No. of samples	Culture	qPCR	
			<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
Water samples				
Pre-flushing:				
No. of positive samples	10	9	10	8
Mean (range)		2960 CFU/L of Lp1 and <i>L. anisa</i> (250–23,250)	8636 GU/L (528–40,610)	697 GU/L (22–3691)
After 30 min:				
No. of positive samples	10	9	10	8
Mean (range)		280 CFU/L of Lp1 (250–500)	9291 GU/L (1006–28,470)	577 GU/L (48–2171)
Aerosol samples				
CIP 10-M:				
No. of positive samples	20	0	6	5
No. of positive samples >DL and <QL		0	6	5
No. of positive samples >QL		0	0	0
Biosampler:				
No. of positive samples	20	0	12	1
No. of positive samples >DL but <QL		0	8	1
No. of positive samples >QL		0	4	0
Mean (range)			35,956 GU/L (19,764–63,856)	

DL, detection limit; QL, quantification limit; CFU, colony-forming units; GU, genome units.

and flow rate of 10 L/min was investigated in a university hospital. The washbasin used in the study had separate hot and cold water pipes feeding a single mixer tap. There was no thermostatic mixing valve connected to the water outlet, but the tap was fitted with an aerator. The washbasin located in the infection control unit was not used for patient care. However, it was representative of the hospital's water network, known to be colonized by *L. pneumophila* serogroup 1 and *Legionella anisa*.

Water and aerosol samples

An initial hot water sample was obtained at pre-flushing (as soon as the tap was opened). The hot water was run for 30 min to allow the formation of aerosols, as described by Sirigul et al.³ Two impingement technologies of aerosol collection – Biosampler® (SKC, Eighty Four, PA, USA) and CIP 10-M (Arelco, Englewood, NJ, USA) – were placed on platforms to simulate patient exposure during face-cleaning or hand-washing (0.17 m high and 0.20 m from the tap on both sides of the washbasin). All aerosol samples, respectively 300 L in 3 mL for CIP 10-M and 360 L in 20 mL for the Biosampler during flushing, were collected in DNA-free buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) compatible with culture. Water and aerosol samples from each run were tested in two CIP 10-M and two Biosamplers with repetition 10 times per week.

Culture assay and qPCR

Legionella was cultured by normative methodology (NFT 90-431) for water samples, and 0.2 mL of collected aerosol was plated on buffered charcoal-yeast extract agar (Oxoid, Basingstoke, UK) for aerosol samples. To demonstrate the

absence of other bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and mesophilic flora were cultured according to ISO 16266 and ISO 6222, respectively.

Bacterial DNA was extracted by Aquadient™ kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. qPCR was conducted in a Chromo4™ system (Bio-Rad) with iQ-Check™ Screen *Legionella* spp. and *L. pneumophila* kits, employing XP T90-471 standard. The detection limit (DL) was 80 genome units (GU)/L (2.5 GU/well), and the quantification limit (QL) was 480 GU/L (15 GU/well). The results were the mean values of seven qPCR wells.

Immunoassay and viability testing

Immunoassay was performed directly on membrane filters (ChemFilterCB04, Chemunex, Ivry, France) with either polyclonal *L. anisa* antibody or coupled *L. pneumophila* sg1–*L. anisa* antibodies. Volume was 1 mL for concentrated water samples, and ranged from 20 to 45 mL for aerosol samples.

Live/dead bacteria were evaluated by BackLight kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) directly on ChemFilter CB04, as described elsewhere.⁸

Bacteria were counted by microscopy (×100) with both techniques. The following semiquantitative method was undertaken: if 1–9 bacteria were found in 100 fields, the exact number was recorded; if 10–99 bacteria were observed in 100 fields, it was reported as 1+; if 1–10 bacteria were noted per field, it was designated as 2+; and if >10 bacteria per field, it was registered as 3+.

Results

In total, 20 water samples and 40 aerosol samples were collected from March to May 2009. For different runs, a wide

Table II

Detection of potentially viable *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1) and *Legionella anisa* in water and aerosol samples by immunoassay and viability testing

Samples	Culture (CFU/L)	qPCR <i>Legionella</i> spp. (GU/L)	Immunoassay ^a	Viability
First run (N = 4)				
Pre-flushing water	9100 Lp1	10 ⁵	++ <i>L. anisa</i>	+++ viable and dead
CIP 10-M 1 and 2	ND	<DL	ND	ND
Biosampler 1	ND	ND	ND	4 dead
Biosampler 2	ND	ND	4 <i>L. anisa</i>	ND
Second run (N = 4)				
Pre-flushing water	<250 Lp1	10 ³	+++ Lp1/ <i>L. anisa</i>	+++ viable and dead
CIP 10-M 1 and 2	ND	ND	ND	6 dead, 3 viable
Biosampler 1	ND	ND	ND	3 dead
Biosampler 2	ND	ND	1 Lp1/ <i>L. anisa</i>	ND
Third run (N = 2)				
Pre-flushing water	<250 Lp1	10 ³	++ Lp1/ <i>L. anisa</i>	+++ viable and dead
Pooled CIP 10-M 1 and 2; Biosampler 1 and 2	ND	ND	ND	+ viable and dead
Fourth run (N = 2)				
Pre-flushing water	<250 Lp1	900	++ Lp1/ <i>L. anisa</i>	ND
Pooled CIP 10-M 1 and 2; Biosampler 1 and 2	ND	ND	+ Lp1/ <i>L. anisa</i>	ND

ND, not done.

^a *L. anisa* antibody for the first run. Coupled *Legionella pneumophila* sg1–*L. anisa* antibody for the other runs.

range of temperatures – from 23.4 to 43.2 °C for pre-flushing samples and from 47.2 to 57.4 °C for post-flushing samples – was observed.

Legionella pneumophila serogroup 1 (Lp1) and *L. anisa* were grown from pre-flushing samples [growth range: 250 (100; 600) to 23,250 (17,000; 31,000) colony-forming units (CFU)/L]. These concentrations seemed to be lower in post-flushing water samples after 30 min [growth range: 250 (100; 600) to 500 (250; 900) CFU/L of Lp1] (Table I) but there were no significant differences between pre- and post-flush ($P = 0.084$ with related-samples Wilcoxon signed ranks test). *P. aeruginosa* and mesophilic flora were never detected by culture.

Neither cultivable legionella nor other bacteria were reported for aerosol samples. However, 18/40 (45%) of aerosol results collected by CIP 10-M (six positive samples) and Biosampler (12 positive samples) were positive for *Legionella* spp. by qPCR. Aerosols collected by CIP 10-M revealed *Legionella* spp. DNA at a value higher than the DL but lower than the QL. When aerosols were collected by Biosampler, *Legionella* spp. DNA concentrations were higher than the DL but lower than the QL in eight samples and higher than the QL (from 2×10^4 to 6×10^4 GU/L) in four samples. *L. pneumophila* DNA was detected by qPCR in 6/40 aerosol samples (15%) collected by CIP 10-M (5/20 samples) and Biosampler (1/20 samples), respectively (Table I).

In a later phase, during four more runs, immunoassay enabled the detection of more than 10 Lp1 or *L. anisa* per field for water samples, and up to 15 Lp1 or *L. anisa* per 100 fields in aerosol samples (reported as 1+). Viability testing demonstrated viable and dead bacteria in both water and aerosol samples (Table II).

Discussion

In this study, *Legionella* spp. and *L. pneumophila* DNA were detected by qPCR and immunoassay in aerosol samples from a washbasin area. The presence of viable bacteria was also

noted. Conventional culture remained negative for *Legionella*, *P. aeruginosa* and mesophilic flora.

Bollin et al. detected a maximum of 5 CFU of *L. pneumophila* in aerosol samples from heavily contaminated taps ($>2.0 \times 10^5$ CFU/L).⁹ In our study, the water samples tested were contaminated with a maximum value of 2.0×10^4 CFU/L, and weekly fluctuation of *Legionella* spp. and *L. pneumophila* growth was evident. Thus, contamination being lower here, we could understand why conventional culture remained negative.

Although standard methods and regulations do not exist for legionella detection in aerosols, checking for its presence remains the only way to properly evaluate human exposure and infection risks. Risk assessment of human health is essential for immunocompromised patients. Nevertheless, no dose–response has yet been established among humans whereas experimentally administered aerosols containing from <129 to 200 CFU of *L. pneumophila* have been sufficient to produce non-lethal infection in guinea-pigs.^{9,10}

The present study was conducted under near 'real life' conditions, i.e. reflecting potential exposure to contaminated aerosol during washbasin water flowing in hospital. It suggests that hospital tap water may be at risk of legionella aerosol inhalation by immunocompromised patients as previously described.⁵ It was determined that the detection of legionella from aerosols by culture is not efficient in these circumstances. Assessment of risk is based on a body of biological arguments, such as qPCR, immunoassay and potentially viable bacteria.

Acknowledgements

The authors are grateful to Bio-Rad for providing qPCR kits and reagents. Thanks are also due to O. da Silva for editing the manuscript.

Conflict of interest statement
None declared.

Funding source

This study was supported by a grant entitled 'Action Incitative' from Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

References

1. Bauer M, Mathieu L, Deloge-Abarkan M, et al. Legionella bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes. *Epidemiol Community Health* 2008;62:913–920.
2. Chang CW, Chou FC. Methodologies for quantifying culturable, viable, and total *Legionella pneumophila* in indoor air. *Indoor Air* 2011;21:291–299.
3. Sirigul C, Wongwit W, Phanprasit W, Paveenkittiporn W, Blacksel SD, Ramasoota P. Development of a combined air sampling and quantitative real-time PCR method for detection of *Legionella* spp. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:503–507.
4. Slimani S, Robyns A, Jarraud S, et al. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods* 2012;88:319–321.
5. Brûlet A, Nicolle MC, Giard M, et al. Fatal nosocomial *Legionella pneumophila* infection due to exposure to contaminated water from a washbasin in a hematology unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:1091–1093.
6. Yu VL, Lee TC. Neonatal legionellosis: the tip of the iceberg for pediatric hospital-acquired pneumonia? *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:282–284.
7. Deloge-Abarkan M, Ha TL, Robine E, Zmirou-Navier D, Mathieu L. Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH). *J Environ Monit* 2007;9:91–97.
8. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, et al. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable legionellae that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:4817–4824.
9. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:1128–1131.
10. Fitzgeorge RB, Baskerville A, Broster M, Hambleton P, Dennis PJ. Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. *J Hyg (Lond)* 1983;90:81–89.

Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires' disease cases in France.

Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, Jarraud S

New Microbes New Infect. 2014 ;3:29-33

En France, environ 1200 cas de légionellose sont notifiés chaque année et la très grande majorité d'entre eux sont dûs à *L. pneumophila* sg1. Depuis 2000, une souche est disponible dans environ 20% des cas identifiés et depuis 2008, le génotypage des souches par SBT est réalisé systématiquement au CNRL. On distingue ainsi 3 ST majoritaires en France : ST1, ST23 et ST47.

Dans notre étude, nous avons inclus les cas de légionellose déclarés entre 2008 et 2012, pour lesquels une souche a été isolée. Nous avons comparé les caractéristiques géographiques et clinico-épidémiologiques des cas selon 4 groupes : ST1, ST23, ST47 et autres ST. Les souches ST23 étant les plus fréquemment retrouvées, l'analyse statistique multivariée par régression de Poisson a été effectuée en comparant les souches ST23 aux autres groupes. Cependant, l'analyse descriptive a permis de définir pour chacun des groupes étudiés, et donc pour les souches ST47, des caractéristiques particulières.

Ainsi entre 2008 et 2012, cent vingt trois cas de légionellose à *L. pneumophila* ST47 ont été notifiés à l'InVS, soit 10,3% des cas de l'étude (n=1192). L'âge médian était de 60,6 ans, les hommes représentaient plus de 82% des cas et le taux de mortalité était de 13.2%. Les cas ST47 présentaient aussi pour 19,5% d'entre eux un diabète et 44,7% étaient fumeurs. Seuls 3 cas nosocomiaux ont été recensés et aucun cas n'a été notifié en maison de retraite en 4 ans. La majorité des cas (59,4%) est survenue dans la région Nord-Est (région 4). Comparés aux cas infectés par une souche ST23, les cas liés au ST47 étaient significativement moins associés à une acquisition nosocomiale ($p=0,034$) ou dans une maison de retraite ($p<0,001$) et leur répartition géographique était différente de manière statistiquement significative ($p<0,001$).

Toutes ces caractéristiques clinico-épidémiologiques et géographiques semblent indiquer que la souche ST47 va infecter un profil de patients particulier : plus masculins, et présentant des caractéristiques d'âge et d'immunodépression moins élevées que celles retrouvées chez des patients hospitalisés ou en maison de retraite. De plus, cette souche semble très implantée dans la partie Est du pays et principalement dans le Nord Est. Cependant, les sources potentielles restent encore à identifier.

Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires disease cases in France

P. Cassier^{1,2,3,4,5,6}, C. Campese⁷, Y. Le Strat⁷, D. Che⁷, C. Ginevra^{1,2,3,4,5,6}, J. Etienne¹ and S. Jarraud^{1,2,3,4,5,6}

1) Hospices Civils de Lyon, National Reference Centre of Legionella, Centre de Biologie Est, 2) CIRI, International Center for Infectiology Research, Legionella Pathogenesis Team, Université de Lyon, 3) Inserm, U1111, 4) Ecole Normale Supérieure de Lyon, 5) Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, 6) CNRS, UMR5308, Lyon and 7) French Institute for Public Health Surveillance, Saint Maurice, France

Abstract

In France, approximately 1200 cases of Legionnaires disease (LD) are reported annually, and isolates are available for approximately 20% of cases identified since 2000. All *Legionella pneumophila* serogroup 1 (sg1) isolates are characterized by sequence-based typing at the National Reference Centre. LD cases caused by *L. pneumophila* sg1 reported from 2008 through 2012 were considered for the study. Our study objective was to describe cases according to their sequence type (ST). We also constructed multivariable modified Poisson regression models to estimate the incidence rate ratio (IRR) and to identify characteristics potentially associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones. We studied 1192 patients infected by ST1 ($n = 109$), ST23 ($n = 236$), ST47 ($n = 123$) or other STs ($n = 724$). The geographic distribution of the ST23 cases across the country was significantly different compared to other ST groups. This genotype was significantly associated with the absence of corticosteroid therapy compared to ST1 (IRR = 0.56; $p = 0.016$). Concerning exposure, the ST23 genotype was significantly less associated with hospital-acquired infections compared to ST1 (IRR = 0.32; $p = 0.001$), but it was more associated with infections acquired in hospitals and elderly settings compared with ST47. Finally, the ST23 genotype was less frequently associated with travel than other STs. Despite the large number of cases of ST23 infection, we did not identify any characteristics specific to this ST. However, we identified independent associations between ST1 and nosocomial transmission and steroid therapy. These findings should encourage further exploration, especially in terms of environmental diffusion, strain virulence and host factors.

New Microbes and New Infections © 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Legionnaires disease, molecular epidemiology, molecular typing, risk factors

Original Submission: 17 September 2014; **Accepted:** 30 October 2014

Available online 12 November 2014

Corresponding author: P. Cassier, Hospices Civils de Lyon, National Reference Centre of *Legionella*, Centre de Biologie Est, 59 Bd Pinel 69500 Bron, France
E-mail: pierre.cassier@chu-lyon.fr

Introduction

Legionnaires disease (LD) is usually acquired through inhalation of aerosolized water contaminated with *Legionella* spp., which is found ubiquitously in natural and man-made aqueous environments such as cooling towers, hot water systems or whirlpools

[1]. *Legionella pneumophila*, especially serogroup 1 (sg1), is the major cause of LD, which remains a serious disease. Several host-related risk factors have been clearly identified [2–4], including older age, male sex, smoking, diabetes, chronic heart or lung disease, cancer or hematologic malignancy and steroid use or any immunosuppressive therapy.

The characterization of clinical isolates by molecular typing methods is essential for epidemiologic investigations, particularly for clusters and outbreaks. Thus, *L. pneumophila* sg1 isolates can be characterized by sequence-based typing (SBT) using isolates or by nested-PCR-based SBT using clinical samples [5,6]. The typing method for *L. pneumophila* sg1 was developed by the European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) was renamed the European Study Group for *Legionella*

Infections, ESGLI, in September 2012). Both local and worldwide sequence types (STs), such as ST1, ST23, ST37, ST47 and ST62, have been identified [7–12]. In France, ST1- and ST47-associated LD represented 9% and 11% of culture-proven cases in 2008, respectively [7]. The epidemiologic characteristics of these two STs have previously been published: ST1 strains with the Paris pulsotype were more frequently identified among elderly patients, immunocompromised patients or women and had a high lethality rate (38%) compared to sporadic strains. In contrast, ST47 strains were significantly more frequently associated with smoking, but the case fatality rate was lower than with sporadic strains [13].

The present French epidemiologic report shows that the ST most frequently associated with LD is ST23. It accounted for approximately 20% of the strains isolated in France in 2008, but no specific host factors associated with this genotype have been reported thus far [7]. We thus characterized the epidemiologic and clinical features of 236 patients infected with ST23 and compared them to those of patients infected by two other predominant STs (ST1, ST47) and other nonpredominant STs.

Materials and Methods

Source of information

In France, all cases of LD are reported to the national health authority (Institut de Veille Sanitaire), which collects epidemiologic information through anonymous mandatory notification, including various risk factors and exposure routes for LD. The notification form allows the collection of information on current illness, the patient's personal characteristics (sex, age and post-code of residence), disease outcome and factors known to be associated with LD. Moreover, exposure to any of the following settings during the 10-day period preceding symptom onset (i.e. the incubation period) is also recorded: hospital, elderly setting, thermal centre, whirlpool spa or travel site (campsite, hotel) [7].

Additionally, all corresponding *Legionella* isolates are sent to the NRCL (national reference centre for *Legionella*), where they are characterized by SBT [6].

Included cases

In our study, cases presenting clinical and radiologic signs of pneumonia combined with *L. pneumophila* sgl isolation from a culture of sputum or bronchopulmonary secretions (bronchoalveolar lavage fluid or bronchial aspirate) were included. Cases of LD due to *L. pneumophila* sgl reported from 2008 through 2012 were considered for the study. All patients lived in metropolitan France. The geographic distribution of cases (based on the postcode of residence) was used as a proxy for the geographic distribution of strains, and the patients were then

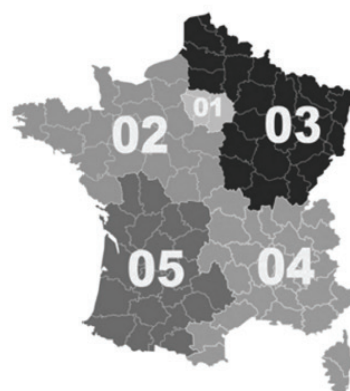


FIG. 1. Division of metropolitan France into five regions to determine geographic distribution of cases.

classified into five regions according to their telephone area code (Fig. 1). Finally, on the basis of genotype distribution, for the purposes of the study, the population was divided into four groups: ST1, ST23, ST47 and other ST culture-confirmed cases.

Statistical analysis

We constructed multivariable modified Poisson regression models to estimate the incidence rate ratio (IRR) and to identify characteristics potentially associated with ST23 compared to the three other groups, considering a p value of ≤ 0.05 to be significant [14]. Analyses were performed by Stata 11.2 (StataCorp, College Station, TX, USA) software.

Results

From 2008 to 2012, a total of 6458 cases of LD were reported, and *Legionella* isolates were recovered in 1192 cases (18.5%), which were included in the study. ST23 accounted for the largest number of isolates ($n = 236$), representing 19.8% of all clinical strains. This rate did not change significantly from year to year over the study period. ST1 and ST47 *L. pneumophila* represented 9.1% and 10.3% of all isolates, respectively. ST23 isolates were found ubiquitously across France, but mainly in regions 3 and 4 (76.4%); this strain was also found in LD cases from other ST groups with only minor differences. On the other hand, ST1 cases occurred mostly in regions 1 and 4, and ST47 cases were mainly found in region 3 (Fig. 1; Table 1).

Patients infected with *L. pneumophila* sgl ST23 had a mean age of 59.1 years and were mostly men (Table 1). Of these patients, 72.9% had at least one of the risk factors associated with LD in 72.9%. This percentage was not significantly different from the corresponding percentages among patients infected by

TABLE 1. Epidemiologic characteristics of ST23 cases compared to ST1, ST47 other STs and all cases of Legionnaires disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1 in France, 2008–2012

Characteristic	ST23	ST1	ST47	Other ST	All
No. of subjects	236	109	123	724	1192
Male	190 (80.5%)	80 (73.4%)	101 (82.1%)	576 (79.6%)	947 (79.5%)
Age (years) (mean/variable)	59.1	63.3	60.6	58.7	59.4
Death	35 (16.1%)	30 (30.9%)	15 (13.2%)	124 (18.6%)	204 (18.6%)
Risk factor					
At least one	172 (72.9%)	82 (75.2%)	85 (69.1%)	540 (79.6%)	879 (73.7%)
Cancer	19 (8.1%)	26 (23.9%)	13 (10.6%)	80 (11.1%)	138 (11.6%)
Steroid therapy	10 (4.2%)	24 (22.0%)	12 (9.8%)	68 (9.4%)	114 (9.6%)
Diabetes	42 (17.8%)	13 (11.9%)	24 (19.5%)	107 (14.8%)	186 (15.6%)
Tobacco	124 (52.5%)	31 (28.4%)	55 (44.7%)	370 (51.1%)	580 (48.7%)
Exposure					
Hospital-acquired infection	7 (3.0%)	34 (31.2%)	3 (2.4%)	45 (6.2%)	89 (7.5%)
Travel	29 (12.3%)	12 (11.0%)	21 (17.1%)	142 (19.6%)	204 (17.1%)
Elderly setting	9 (3.8%)	6 (5.5%)	0	14 (1.9%)	29 (2.4%)
Region					
1	27 (11.4%)	44 (40.4%)	16 (13.0%)	94 (13.0%)	181 (15.2%)
2	13 (5.5%)	13 (11.9%)	17 (13.8%)	114 (15.8%)	157 (13.2%)
3	88 (37.3%)	14 (12.8%)	73 (59.4%)	229 (31.6%)	404 (33.9%)
4	93 (39.4%)	37 (33.9%)	13 (10.6%)	219 (30.3%)	362 (30.4%)
5	15 (6.4%)	1 (0.9%)	4 (3.3%)	68 (9.4%)	88 (7.4%)

ST, sequence type.

ST1, ST47 or other STs of *L. pneumophila* sgl. The rarest risk factors associated with ST23 LD were steroid therapy (4.2%) or cancer (8.1%). Conversely, smoking was the most frequently reported risk factor ($n = 124$; 52.5%). The percentage of cases with this risk factor was highest in the ST23 group compared to the other three groups. Moreover, ST23 cases were rarely hospital acquired (3.0%) or acquired in elderly settings (3.8%). Travel-associated cases represented 12.3% of the ST23 cases.

Multivariate analysis comparing the characteristics of ST 23 cases with those of other groups revealed five significant differences (Table 2). First, the geographic distribution of ST23 cases was significantly different than the geographic distribution of other STs (Table 2). Second, this genotype was significantly less associated with steroid therapy compared to ST1 (IRR = 0.56; $p = 0.016$). This difference was not observed when

comparing ST23 to ST47 or ST23 to other STs. Concerning exposure route, the ST23 genotype was significantly less associated with hospital-acquired infections compared to ST1 (IRR = 0.32; $p = 0.001$), but it was more associated with hospital-acquired infections as well as with infections acquired in elderly settings compared to ST47. Finally, the ST23 genotype was less frequently associated with travel cases than other STs.

Discussion

In this study, we found a high rate of ST23 detection in LD; this ST represents 19.8% of cases with positive cultures in France between 2008 and 2012. This proportion is higher than those found in other countries, e.g. 6% in Belgium (2000–2010) [8],

TABLE 2. Multivariate analysis of epidemiologic characteristics of ST23 cases compared to ST1, ST47 and other STs

Characteristic	ST23 vs. ST1 ($n = 345$)		ST23 vs. ST47 ($n = 359$)		ST23 vs. other STs ($n = 960$)	
	IRR (95% CI)	p	IRR (95% CI)	p	IRR (95% CI)	p
Male	1.08 (0.92–1.26)	0.35	1.02 (0.86–1.20)	0.81	1.06 (0.80–1.40)	0.67
Age (years) (mean/variable)	1.00 (0.99–1.0)	0.81	1.00 (0.99–1.00)	0.46	1.00 (0.99–1.00)	0.85
Risk factor						
Cancer	0.75 (0.55–1.03)	0.07	0.93 (0.70–1.24)	0.62	0.81 (0.53–1.24)	0.33
Steroid therapy	0.56 (0.35–0.90)	0.016*	0.68 (0.43–1.09)	0.11	0.56 (0.31–1.02)	0.06
Diabetes	1.05 (0.91–1.21)	0.55	0.99 (0.82–1.18)	0.87	1.09 (0.82–1.45)	0.58
Tobacco	1.04 (0.92–1.17)	0.58	1.11 (0.95–1.31)	0.19	0.99 (0.77–1.26)	0.91
Exposure						
Hospital-acquired infection	0.32 (0.16–0.63)	0.001*	1.49 (1.03–2.14)	0.034*	0.69 (0.34–1.41)	0.31
Travel	0.97 (0.79–1.17)	0.73	0.89 (0.70–1.13)	0.34	0.66 (0.47–0.95)	0.023*
Elderly setting	0.95 (0.64–1.40)	0.78	1.69 (1.31–2.20)	<10 ⁻³	1.54 (0.88–2.70)	0.13
Region		<10 ^{-3a}		<10 ^{-3a}		0.003 ^a
1	Ref.		Ref.		Ref.	
2	1.14 (0.71–1.81)	0.60	0.68 (0.43–1.08)	0.10	0.44 (0.24–0.80)	0.007*
3	1.85 (1.38–2.47)	<10 ^{-3a}	0.88 (0.67–1.14)	0.33	1.12 (0.77–1.64)	0.56
4	1.61 (1.20–2.16)	0.001*	1.43 (1.12–1.83)	0.004*	1.17 (0.80–1.70)	0.42
5	1.95 (1.47–2.60)	<10 ⁻³	1.30 (0.94–1.76)	0.11	0.73 (0.41–1.28)	0.27

ST, sequence type; IRR, incidence rate ratio; CI, confidence interval; Ref., reference.

*Statistically significant.

^aGlobal test.

4.7% in Japan (1980–2008) [10], 4.5% in Portugal (1987–2008) [15] and 0 observed in England and Wales (2000–2008) [11]. A compilation of European data (3200 isolates from 36 countries) showed that ST23 accounted for only 10.7% of clinical isolates, including French strains [16]. The results and statistical comparisons in the present work pertain to patients with culture-proven LD. The inclusion of only these patients could be a critical source of bias. Throughout the study period, considering all cases of non-culture-proven LD with complete allelic profiles determined by nested-PCR-based SBT ($n = 70$), the ST23 genotype was detected in 28.6% of patients (data not shown). This proportion is consistent with the number of ST23 culture-proven LD cases of our study.

It also appeared that 72.9% of the ST23-infected patients had at least one of the risk factors usually associated with LD acquisition. This overall percentage did not differ from those observed for cases of LD due to other ST; however, a more detailed analysis of the different risk factors showed that patients infected by ST23 strains were less likely to have received corticosteroid therapy than patients with ST1 (IRR = 0.56; $p = 0.016$). Corticosteroids or other immunosuppressive therapies (e.g. anti-TNF- α) are increasingly used to treat systemic diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn disease or cutaneous psoriasis. The use of these types of medications was shown to be associated with an increased relative risk of LD, leading to a 1.6- to 8-fold increase in the risk of LD compared to the general population [17]. The overall standardized incidence ratio was 13.1 for patients receiving TNF- α antagonists in the French population [18]. The frequency with which ST23-infected patients are receiving corticoids suggests that they are less likely to have chronic diseases requiring hospital admission. This finding is consistent with our observations, which revealed that ST23 infections were more often community acquired compared to ST1 infections. Indeed, the observed IRR was low (IRR = 0.32; $p = 0.001$).

Comparing ST23 vs. ST1 cases regarding hospital exposure and corticosteroid therapy confirmed specific features related to ST1 strains that have already been reported [13]. In this study, 22% of ST1 patients received corticosteroids, and a high proportion of these patients were hospitalized (31.2%). Of course, we verified that there was no regional effect associated with these nosocomial infections (data not shown). The combination of environmental factors, strain virulence and host susceptibility may explain the observed differences among STs. Thus, concerning ST1 strains, we could hypothesize that they are either very well adapted to hospital water networks or are widely present in the environment. European data showed that ST1 accounted for 21.4% of environmental isolates, which is a relatively high percentage compared to other STs [16]. Other studies have also shown that ST1 was the most dominant ST in

analysed strains from the environment in China (81/164, 49.4%) and in the United States (73/149, 49%) [19,20]. Moreover, in the Chinese study, ST1 accounted for 92.3% and 53.1% of the environmental sgl isolates from potable water systems and cooling towers, respectively. This finding emphasises that ST1 strains are widely present in artificial water sources, but to our knowledge, these strains were never reported specifically in hospital water networks. Therefore, designing a ST1-specific PCR for rapid detection and identification in hospital environmental samples would be helpful. We could then hypothesize that this clone would be more ubiquitous and have lower virulence, infecting mainly immunocompromised patients. Finally, another approach would be for *L. pneumophila* ST1 to contain specific virulence determinants adapted for immunocompromised patients, who may also present specific host characteristics. The epidemiologic characteristics of ST1 cases could explain the higher case fatality rate observed with this clone (Table 1).

By contrast, both the ST47 and ST23 strains were rarely recovered from environmental samples [11,21]. European data indicated that ST47 and ST23 accounted for 0.4% and 1.5% of environmental isolates, respectively [16]. These rates suggest that these strains could have a peculiar virulence pattern because they are less disseminated in the environment and are less associated with patients receiving corticosteroids. Nevertheless, the ST23 genotype was more frequently associated with hospital-acquired infections and with infections acquired in elderly settings compared to ST47. We might therefore hypothesize that the source of infection could be different for these two clones.

Finally, although ST23 isolates could have developed a peculiar virulence pattern adapted to a larger population, we should have observed at least as many travel-associated cases in the ST23 group as we did in the other ST groups. In our study, this genotype was less frequently associated with travel cases than other STs. We unfortunately have no explanation for this difference. All of these observations suggest that ST23 could be a dominant infective clone in the global population of *Legionella* strains, as could ST1 and ST47. Nevertheless, there are still several unresolved issues, and further analysis will be necessary to determine the key host characteristics and virulence factors associated with susceptibility to these clones. Finally, this study reminds us that it is important to maintain clinician awareness of the need to collect sputum samples in order to document LD cases and to better understand the association between host characteristics and *Legionella* strains.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 1977;297:1197–203.
- [2] Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* 1994;154:2417–22.
- [3] Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campese C, Bissery A, et al. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *Eur Respir J* 2012;39: 963–70.
- [4] Che D, Campese C, Santa-Olalla P, Jacquier G, Bitar D, Bernillon P, et al. Sporadic community-acquired Legionnaires' disease in France: a 2-year national matched case-control study. *Epidemiol Infect* 2008;136: 1684–90.
- [5] Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol* 2013;954:119–48.
- [6] Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, et al. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol* 2009;47:981–7.
- [7] Campese C, Bitar D, Jarraud S, Maine C, Forey F, Etienne J, et al. Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998–2008. *Int J Infect Dis* 2011;15:30–7.
- [8] Vekens E, Soetens O, De Mendonça R, Echahidi F, Roisin S, Deplano A, et al. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. *Euro Surveill* 2012;17:2030–2.
- [9] Tijet N, Tang P, Romilowych M, Duncan C, Ng V, Fisman DN, et al. New endemic *Legionella pneumophila* serogroup 1 clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis* 2010;16:447–54.
- [10] Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, et al. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol* 2010;59(pt 6):653–9.
- [11] Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000–2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:781–91.
- [12] Lück C. *Legionella pneumophila*: genetic diversity of patients and environmental isolates. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2011;54:693–8.
- [13] Ginevra C, Duclos A, Vanhems P, Campese C, Forey F, Lina G, 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;49:184–91.
- [14] Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am J Epidemiol* 2004;159:702–6.
- [15] Chasqueira MJ, Rodrigues L, Nascimento M, Marques T. Sequence-based and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* isolated from patients in Portugal during 1987–2008. *Euro Surveill* 2009;14(28).
- [16] Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol* 2010;76:1–11.
- [17] Tubach F, Ravaud P, Salmon-Ceron D, Petitpain N, Brocq O, Grados F, et al. Emergence of *Legionella pneumophila* pneumonia in patients receiving tumor necrosis factor- α antagonists. *Clin Infect Dis* 2006;43:95–100.
- [18] Lanterrier F, Tubach F, Ravaud P, Salmon D, Dellamonica P, Bretagne S, et al. Incidence and risk factors of *Legionella pneumophila* pneumonia during anti-tumor necrosis factor therapy: a prospective French study. *Chest* 2013;144:990–8.
- [19] Qin T, Zhou H, Ren H, Guan H, Li M, Zhu B, et al. Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:2150–7.
- [20] Winchell JM. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol* 2014;52:201–11.
- [21] Ginevra C, Forey F, Campese C, Reyrolle M, Che D, Etienne J, et al. Lorraine strain of *Legionella pneumophila* serogroup 1, France. *Emerg Infect Dis* 2008;14:673–5.

5 Discussion, conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, différentes hypothèses concernant la non-détectabilité de la souche Lorraine ST47 dans l'environnement ont été évoquées.

Nous avons observé que les traitements pré-analytiques pouvaient interférer avec les paramètres de culture et que le milieu GVPC utilisé dans la norme NF T90-431 n'était pas recommandé pour la recherche des légionelles dans les prélèvements respiratoires, et potentiellement dans les prélèvements environnementaux.

Ainsi, la PCR spécifique ST47 développée en collaboration avec l'équipe de Tim Harrison, peut constituer un outil de détection intéressant dans les différentes matrices environnementales pour identifier les réservoirs de la souche. Nous avons montré que les robinets pouvaient être des réservoirs potentiels de légionelles. Par ailleurs, les données clinico-épidémiologiques et géographiques des souches ST47 ont montré que les cas survenaient essentiellement hors institution (hôpital, maison de retraite) et principalement dans le quart Nord-Est du pays.

En France, la détection de *L. pneumophila* dans les prélèvements environnementaux est réalisée selon la norme NF T90-431, qui associe une étape de concentration avec pré-traitement de l'échantillon et une phase de culture proprement dite. Nous avons évalué tout d'abord l'impact des pré-traitements, chauffage et acidification, sur la cultivabilité des souches Lorraine et Paris. Nous n'avons pas observé de différence significative entre ces deux souches quel que soit le prétraitement. Cependant le rendement moyen observé pour l'une des souches environnementales Lorraine après chauffage ou acidification était extrêmement faible (0 et 7% respectivement). Par ailleurs, sans traitement ce rendement était de 23%. On peut donc penser que certaines souches Lorraine issues de l'environnement présentent une susceptibilité aux pré-traitements appliqués à l'échantillon, alors que ces pré-traitements permettent d'améliorer les performances des milieux comme l'ont montré Reinthaler *et al.* (186). Ceci dit, depuis novembre 2014, la norme a évolué en supprimant la possibilité du chauffage du concentrat et en modifiant l'étape de concentration, abaissant ainsi la limite de quantification à 10 UFC/L. On peut donc espérer détecter plus de *L. pneumophila* ST47 avec ce nouveau seuil sur la boîte non acidifiée. Néanmoins, le milieu GVPC imposé par la norme reste le même et peut représenter un facteur limitant à la cultivabilité de la souche.

Nous avons évalué la place des milieux GVPC pour détecter *L. pneumophila* dans les prélèvements respiratoires. Nous avons montré que les milieux BMPA et MWY présentaient

une meilleure sensibilité que les milieux GVPC et BCYE. Ces résultats étaient concordants avec les travaux d'Edelstein *et al.* sur des prélèvements d'eau à l'hôpital qui montraient la supériorité des milieux BMPA et MWY sur le milieu BCYE (187). Quant aux moins bonnes performances du milieu GVPC, elles ne sont pas retrouvées dans la littérature hormis dans une étude de Lück où le milieu BMPA présentait de meilleures performances pour la détection de légionelles dans des matrices hydriques naturelles et artificielles (188).

Par ailleurs, l'une des limites de notre étude est de ne pas avoir comparé pour un même milieu plusieurs références. Cependant, en 2004, l'étude de Lück *et al.* a comparé 4 milieux GVPC et n'a pas identifié de différences de sensibilité entre les 4 fabricants (188). L'ensemble de ces données illustrent que le milieu GVPC n'est sans doute pas le meilleur milieu pour détecter les souches de *L. pneumophila* ST47. Ainsi, tout comme pour les prélèvements respiratoires, il pourrait être utile de combiner les milieux pour améliorer la sensibilité de la culture avec ici le milieu GVPC associé à un milieu BMPA ou MWY lorsque l'on réalise cette recherche spécifique.

Dans tous les cas, la sensibilité des méthodes culturales reste faible puisqu'elle est estimée pour *Legionella spp.* à 10 à 30% dans les échantillons d'eau (197) et à 52,5% pour les cas confirmés de légionellose au CNRL. Ces valeurs montrent l'utilité de développer une PCR de détection spécifique de la souche ST47 Lorraine. En 2011, l'analyse du génome de la souche Lorraine avait montré l'existence de 183 gènes spécifiques, comparé à 5 autres génomes de *L. pneumophila* sg1(36). Parmi ces séquences potentiellement spécifiques, nous avons élaboré une PCR spécifique avec une cible incluant la fin du gène codant la séquence LpOv2 1073 et la séquence intergénique 1073-1074. La séquence choisie par l'équipe de Tim Harrison avec une méthodologie différente a, quant à elle, ciblé la séquence codante LpOv21073. Cette partie du génome de la souche ST47 apparaît donc comme un choix pertinent pour la réalisation d'une PCR spécifique de souche. Cependant, malgré une très bonne sensibilité, la spécificité incomplète (>90%) de notre PCR nous a conduits à évaluer les amorces choisies par l'équipe anglaise sur l'ensemble des souches testées avec nos amorces. Nous avons repris les paramètres d'amplification choisis par l'équipe de Tim Harrison mais conservé la composition de notre mix de PCR. Avec les paramètres définis pour l'évaluation des performances, nous avons observé une sensibilité médiocre (130 UG/ μ L). Celle-ci aurait sans doute pu être améliorée en testant plusieurs paramètres d'amplification (temps/température, nombre de cycles). Concernant la spécificité, les amorces se sont révélées plus spécifiques que celles que nous avons choisies. En effet, la PCR anglaise était positive pour les souches ST109 françaises, et négative pour les souches ST109 anglaises. L'analyse phylogénétique a montré que les souches ST109 françaises étaient plus proches des souches ST47. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas du pulsotype des souches ST109 anglaises mais il serait intéressant de voir si comme leurs

homologues françaises, elles présentent un pulsotype Lorraine. Au final, on peut plutôt parler d'une PCR spécifique de la souche Lorraine que de la souche ST47.

Une autre hypothèse concernant la non détectabilité de la souche Lorraine est l'existence de sources d'exposition non identifiées. L'étude de la littérature a montré la multiplicité des réservoirs potentiels de légionelles, mais tous ne présentent pas le même degré d'évidence concernant les possibilités d'infection (198). En effet, certaines sources (TAR, fontaines, brumisateurs, etc) ont été identifiées à plusieurs reprises comme fortement associées à des cas grâce au typage moléculaire alors que d'autres sources, comme par exemple les aquariums, découvertes récemment grâce aux techniques de séquençage, semblent non impliquées ou alors de manière plus exceptionnelle dans des cas de légionellose (199). Nous avons étudié les aérosols d'un robinet contaminé par des légionelles et montré que ces aérosols, présentent des arguments biologiques (détection de *L. pneumophila* par PCR et immuno-essai) en faveur de leur pouvoir contaminant. Cependant, cette source, évoquée lors de l'investigation d'un cas fatal de légionellose en service d'hématologie ne semble pas correspondre au réservoir principal des souches ST47.

En effet, nous avons comparé les caractéristiques clinico-épidémiologiques des clones dominants en France entre 2008 et 2012, et nous avons observé que les cas associés à la souche ST47 étaient très rarement nosocomiaux (2,4%) et survenaient peu chez les patients immunodéprimés en lien avec une corticothérapie ou une pathologie cancéreuse (Tableau 12). Cette étude a permis définir de manière plus précise le profil de patients infectés par une souche ST47. Nous avons tout d'abord comparé les cas associés au ST23 (ST le plus représenté en France) par rapport aux cas infectés par une souche ST47. Notre travail a montré que ces derniers étaient moins associés à une acquisition en établissement de santé ou en maison de retraite, et différaient de par leur répartition géographique. Par contre, ces 2 ST présentent la particularité commune d'être peu retrouvés dans l'environnement (11). Néanmoins, lors de la conduite d'investigations à la recherche d'une source d'exposition pour un cas lié à une souche ST23, une souche environnementale de même ST est souvent retrouvée (source CNRL). Malgré cette différence, ces 2 ST semblent présenter une virulence particulière. Cependant, on peut faire l'hypothèse que les réservoirs environnementaux de ces 2 ST sont différents. Nous avons comparé les caractéristiques des cas associés à une souche ST47 par rapport aux autres ST. Cette analyse n'apparaît pas dans la publication n°4. Néanmoins, une différence statistiquement significative a été observée pour le sexe masculin, le tabac, la nosocomialité et la répartition géographique dans le Nord Est du pays. Le diabète est un des facteurs de risque à la limite de la significativité.

Tableau 12 Comparaison de certaines caractéristiques clinico-épidémiologiques et géographiques entre les souches ST47 et les souches d'autres ST isolées en France entre 2008 et 2012

Caractéristiques	ST47	Autres ST	p
Nombre de cas	123	1069	-
Sexe masculin	101 (82,1%)	846 (79,1%)	0,008
Mortalité	15 (13,2%)	189 (17,7%)	NS
Facteurs de risque			
Au moins 1	85 (69,1%)	794 (74,3%)	NS
Cancer	13 (10,6%)	80 (11,7%)	NS
Corticothérapie	12 (9,8%)	102 (9,5%)	NS
Diabète	24 (19,5%)	162 (15,1%)	0,07
Tabac	55 (44,7%)	525 (49,1%)	0,02
Expositions à risque			
Hôpital	3 (2,4%)	86 (8,0%)	0,04
Région			
Nord Est	73 (59,4%)	331 (31%)	<0,001

NS= non significatif

Le caractère communautaire des cas et leur localisation principalement dans le quart Nord-Est du pays peuvent inciter à rechercher un réservoir dans leur environnement extérieur. Aux Pays-Bas, la détection de la souche ST47 dans de la terre à proximité d'un bain bouillonnant à l'origine d'un cas rend l'hypothèse d'une contamination de matrices hydriques à partir de la terre très séduisante (184). On pourrait donc penser que le réservoir principal de la souche ST47 est la terre humide et que celle-ci contaminerait des réservoirs hydriques naturels ou artificiels secondaires par un vecteur de transmission (vent, homme,...).

Une dernière hypothèse que nous n'avons pas explorée serait la meilleure adaptabilité de la souche à l'homme par rapport aux amibes. Il serait alors intéressant de comparer la multiplication intracellulaire de la souche ST47 Lorraine dans des macrophages alvéolaires avec celle dans *Acanthamoeba castellanii* par exemple.

L'utilisation de la PCR spécifique ST47 ou l'amélioration des paramètres de culture pour cette souche pourrait permettre de détecter plus aisément la souche ST47 Lorraine dans les différentes matrices sélectionnées. Ainsi, l'identification des réservoirs permettrait bien évidemment de cibler les actions de prévention pour éradiquer les sources d'exposition et à terme, entraîner la diminution de l'incidence des cas de légionelloses associés à ce clone.

BIBLIOGRAPHIE

1. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, *et al.* Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:1011–21.
2. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2009;28:781–91.
3. Fontana S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2014;304:597–602.
4. Vekens E, Soetens O, De Mendonça R, Echahidi F, Roisin S, Deplano A, *et al.* Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2012;17:20302.
5. Qin T, Zhou H, Ren H, Guan H, Li M, Zhu B, *et al.* Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:2150–7.
6. Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, *et al.* Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol.* 2010;59:653–9.
7. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, *et al.* Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2047–52.
8. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1965–8.
9. Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, *et al.* Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2009;47:981–7.
10. Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;954:119–48.

11. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol.* 2010;76:1–11.
12. Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LPB, Van der Zwaluw K, Jansen R, Yzerman EPF. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002–2006. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;14:459–66.
13. Ginevra C, Forey F, Campèse C, Reyrolle M, Che D, Etienne J, *et al.* Lorraine strain of *Legionella pneumophila* serogroup 1, France. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:673–5.
14. Tijet N, Tang P, Romilowych M, Duncan C, Ng V, Fisman DN, *et al.* New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:447–54.
15. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, *et al.* Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977;297:1189–97.
16. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 1977;297:1197–203.
17. Stout J, Yu VL, Vickers RM, Zuravleff J, Best M, Brown A, *et al.* Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic Legionnaires' disease. *N Engl J Med.* 1982;306:466–8.
18. Stout J, Yu VL, Vickers RM, Shonnard J. Potable water supply as the hospital reservoir for Pittsburgh pneumonia agent. *Lancet Lond Engl.* 1982;1:471–2.
19. Garrity GM, Brown A, Vickers RM. Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30:609–14.
20. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51:221–71.
21. Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C. *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* 2009;9:727–39.
22. Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Ogawa M, *et al.* *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30:273–9.
23. Lück PC, Jacobs E, Röske I, Schröter-Bobsin U, Dumke R, Gronow S. *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2557–62.
24. Pearce MM, Theodoropoulos N, Mandel MJ, Brown E, Reed KD, Cianciotto NP. *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:2946–54.

25. Campocasso A, Boughalmi M, Fournous G, Raoult D, La Scola B. *Legionella tunisiensis* sp. nov. and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from environmental water samples. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62:3003–6.
26. Yang G, Benson RF, Ratcliff RM, Brown EW, Steigerwalt AG, Thacker WL, et al. *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62:284–8.
27. Edelstein PH, Edelstein MA, Shephard LJ, Ward KW, Ratcliff RM. *Legionella steelei* sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and South Australia. Int J Syst Evol Microbiol. 2012;62:1766–71.
28. Rizzardi K, Winięcka-Krusnell J, Ramliden M, Alm E, Andersson S, Byfors S. *Legionella norrlandica* sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. Int J Syst Evol Microbiol. 2015;65:598–603.
29. Diederer BMW. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J Infect. 2008;56:1–12.
30. Beauté J, Zucs P, de Jong B, European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2013;18:20417.
31. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, et al. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet. 2004;36:1165–73.
32. Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, et al. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. Science. 2004 24;305:1966–8.
33. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. Int J Med Microbiol IJMM. 2007;297:577–87.
34. Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, et al. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. J Bacteriol. 2010 192:6001–16.
35. D'Auria G, Jiménez-Hernández N, Peris-Bondia F, Moya A, Latorre A. *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. BMC Genomics. 2010;11:181.
36. Gomez-Valero L, Rusniok C, Jarraud S, Vacherie B, Rouy Z, Barbe V, et al. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. BMC Genomics. 2011;12:536.

37. Okamoto A, Lee H, Yabutani M, Yamada K, Ohta M. Draft Genome Sequence of a *Legionella pneumophila* Serogroup 4 Strain Causing Legionellosis. *Genome Announc.* 2014 26;2:e00602–14.
38. Khan MA, Knox N, Prashar A, Alexander D, Abdel-Nour M, Duncan C, *et al.* Comparative Genomics Reveal That Host-Innate Immune Responses Influence the Clinical Prevalence of *Legionella pneumophila* Serogroups. *PloS One.* 2013;8:e67298.
39. Amaro F, Gilbert JA, Owens S, Trimble W, Shuman HA. Whole-Genome Sequence of the Human Pathogen *Legionella pneumophila* Serogroup 12 Strain 570-CO-H. *J Bacteriol.* 2012 Mar 15;194(6):1613–4.
40. Kozak NA, Buss M, Lucas CE, Frace M, Govil D, Travis T, *et al.* Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J Bacteriol.* 2010;192:1030–44.
41. Brzuszkiewicz E, Schulz T, Rydzewski K, Daniel R, Gillmaier N, Dittmann C, *et al.* *Legionella oakridgensis* ATCC 33761 genome sequence and phenotypic characterization reveals its replication capacity in amoebae. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2013;303:514–28.
42. Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, *et al.* Comparative analyses of *Legionella species* identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol.* 2014;15(11):505.
43. Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):86–94.
44. De Felipe KS, Pampou S, Jovanovic OS, Pericone CD, Ye SF, Kalachikov S, *et al.* Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol.* 2005 Nov;187(22):7716–26.
45. De Felipe KS, Glover RT, Charpentier X, Anderson OR, Reyes M, Pericone CD, *et al.* *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog.* 2008;4(8):e1000117.
46. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* 1981 Jan;41(1):9–16.
47. Miyamoto H, Jitsurong S, Shiota R, Maruta K, Yoshida S, Yabuuchi E. Molecular determination of infection source of a sporadic *Legionella* pneumonia case associated with a hot spring bath. *Microbiol Immunol.* 1997;41(3):197–202.
48. Van Heijnsbergen E, de Roda Husman A m., Lodder W j., Bouwknecht M, Docters van Leeuwen A e., Bruin J p., *et al.* Viable *Legionella pneumophila* bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J Appl Microbiol.* 2014 1;117:882–90.
49. Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann Clin Lab Sci.* 1987;17:150–6.

50. Warren WJ, Miller RD. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. J Clin Microbiol. 1979;10:50–5.
51. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ Microbiol. 2010;12:557–66.
52. Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F. Detection of *Legionella spp.* and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. Water Res. 2007;41:3159–67.
53. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl Environ Microbiol. 2003;69:2540–7.
54. Fields BS. The molecular ecology of *Legionellae*. Trends Microbiol. 1996;4:286–90.
55. Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret J-F, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. Int J Hyg Environ Health. 2010;213:158–66.
56. Loret J-F, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. Int J Hyg Environ Health. 2010;213:167–75.
57. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol. 1980;33:1179–83.
58. Bozue JA, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. Infect Immun. 1996;64:668–73.
59. Bitar DM, Molmeret M, Abu Kwaik Y. Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol IJMM. 2004;293:519–27.
60. Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. Infect Immun. 2002;70:6273–83.
61. Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol. 1997;63:2047–53.
62. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, *et al.* A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability. Appl Environ Microbiol. 2008;74:4817–24.
63. Jaresova M, Hlozanek I, Striz I, Petrickova K, Kocmoud Z. *Legionella* detection in oropharyngeal aspirates of transplant patients prior to surgery. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2006;25:63–4.

64. Cassier P, Bénet T, Nicolle MC, Brunet M, Buron F, Morelon E, *et al.* Community-acquired Legionnaires' disease in a renal transplant recipient with unclear incubation period: the importance of molecular typing. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2015;
65. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R, CDC, *et al.* Guidelines for preventing health-care--associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control.* 2004;53:1–36.
66. Demirjian A, Lucas CE, Garrison LE, Kozak-Muiznieks NA, States S, Brown EW, *et al.* The importance of clinical surveillance in detecting legionnaires' disease outbreaks: a large outbreak in a hospital with a *Legionella* disinfection system-pennsylvania, 2011-2012. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015 1;60:1596–602.
67. Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, *et al.* An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *Med J Aust.* 2004;180:566–72.
68. Bargellini A, Marchesi I, Marchegiano P, Richeldi L, Cagarelli R, Ferranti G, *et al.* A culture-proven case of community-acquired *Legionella* pneumonia apparently classified as nosocomial: diagnostic and public health implications. *Case Rep Med.* 2013;2013:303712.
69. Sopena N, Pedro-Botet ML, Sabrià M, García-Parés D, Reynaga E, García-Nuñez M. Comparative study of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* or *Chlamydia pneumoniae*. *Scand J Infect Dis.* 2004;36:330–4.
70. Fernández-Sabé N, Rosón B, Carratalà J, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Clinical diagnosis of *Legionella* pneumonia revisited: evaluation of the Community-Based Pneumonia Incidence Study Group scoring system. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2003;37:483–9.
71. Sopena N, Sabrià-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominguez J, Morera J, *et al.* Comparative study of the clinical presentation of *Legionella* pneumonia and other community-acquired pneumonias. *Chest.* 1998;113:1195–200.
72. Viasus D, Di Yacovo S, Garcia-Vidal C, Verdaguer R, Manresa F, Dorca J, *et al.* Community-acquired *Legionella pneumophila* pneumonia: a single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years. *Medicine (Baltimore).* 2013;92:51–60.
73. O'Reilly KMA, Urban MA, Barriero T, Betts RF, Trawick DR. Persistent culture-positive *Legionella* infection in an immunocompromised host. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005 15;40:e87–9.
74. Girard LP, Gregson DB. Community-acquired lung abscess caused by *Legionella micdadei* in a myeloma patient receiving thalidomide treatment. *J Clin Microbiol.* 2007 p;45:3135–7.

75. Yu H, Higa F, Koide M, Haranaga S, Yara S, Tateyama M, *et al.* Lung abscess caused by *Legionella* species: implication of the immune status of hosts. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2009;48:1997–2002.
76. Campèse C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, *et al.* Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect.* 2015;
77. Campese C, Bitar D, Jarraud S, Maine C, Forey F, Etienne J, *et al.* Progress in the surveillance and control of *Legionella* infection in France, 1998-2008. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2011;15:e30–7.
78. Farnham A, Alleyne L, Cimini D, Balter S. Legionnaires' Disease Incidence and Risk Factors, New York, New York, USA, 2002–2011. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1795–802.
79. Jacobson KL, Miceli MH, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. *Legionella* pneumonia in cancer patients. *Medicine (Baltimore).* 2008;87:152–9.
80. Gudiol C, Garcia-Vidal C, Fernández-Sabé N, Verdaguer R, Lladó L, Roca J, *et al.* Clinical features and outcomes of Legionnaires' disease in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2009;11:78–82.
81. Gacouin A, Le Tulzo Y, Lavoue S, Camus C, Hoff J, Bassen R, *et al.* Severe pneumonia due to *Legionella pneumophila*: prognostic factors, impact of delayed appropriate antimicrobial therapy. *Intensive Care Med.* 2002;28:686–91.
82. Sopena N, Pedro-Botet L, Mateu L, Tolschinsky G, Rey-Joly C, Sabrià M. Community-acquired *Legionella* pneumonia in elderly patients: characteristics and outcome. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55:114–9.
83. Greenberg D, Chiou CC, Famigilletti R, Lee TC, Yu VL. Problem pathogens: paediatric legionellosis--implications for improved diagnosis. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:529–35.
84. Shachor-Meyouhas Y, Kassis I, Bamberger E, Nativ T, Sprecher H, Levy I, *et al.* Fatal hospital-acquired *Legionella* pneumonia in a neonate. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:280–1.
85. Phin N, Cresswell T, Parry-Ford F, Incident Control Team. Case of Legionnaires disease in a neonate following a home birth in a heated birthing pool, England, June 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2014;19.
86. Lanternier F, Tubach F, Ravaut P, Salmon D, Dellamonica P, Bretagne S, *et al.* Incidence and risk factors of *Legionella pneumophila* pneumonia during anti-tumor necrosis factor therapy: a prospective French study. *Chest.* 2013;144:990–8.
87. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, *et al.* A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med.* 2003;198:1563–72.
88. Merx S, Zimmer W, Neumaier M, Ahmad-Nejad P. Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene. *Hum Mutat.* 2006;27:293.

89. Zhang F, Gao X-D, Wu W-W, Gao Y, Zhang Y-W, Wang S-P. Polymorphisms in toll-like receptors 2, 4 and 5 are associated with *Legionella pneumophila* infection. Infection. 2013 ;41:941–8.
90. Lee JV, Joseph C, PHLS Atypical Pneumonia Working Group. Guidelines for investigating single cases of Legionnaires' disease. Commun Dis Public Health PHLS. 2002;5:157–62.
91. Lee JV, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. J Appl Microbiol. 2011;110:1032–44.
92. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. Appl Environ Microbiol. 1991;57:597–600.
93. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. Appl Environ Microbiol. 2001;67:3985–93.
94. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnol Nat Publ Co. 1992;10:413–7.
95. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnol Nat Publ Co. 1993;11:1026–30.
96. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. J Clin Microbiol. 2001;39:2618–26.
97. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylors A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:125–32.
98. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26:2465–6.
99. Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Lück PC. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. J Clin Microbiol. 1997;35:2841–5.
100. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, et al. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2002;21:710–6.

101. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1986;23:768–71.
102. Ott M, Bender L, Marre R, Hacker J. Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. J Clin Microbiol. 1991;29:813–5.
103. Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, *et al.* A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 1999;5:462–77.
104. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol. 1998;36:161–7.
105. Schoonmaker D, Heimberger T, Birkhead G. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. J Clin Microbiol. 1992;30:1491–8.
106. Zhou H, Ren H, Zhu B, Kan B, Xu J, Shao Z. Optimization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Legionella pneumophila* Subtyping. Appl Environ Microbiol. 2010;76:1334–40.
107. Lück PC, Bender L, Ott M, Helbig JH, Hacker J. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 6 strains isolated from a hospital warm water supply over a three-year period by using genomic long-range mapping techniques and monoclonal antibodies. Appl Environ Microbiol. 1991;57:3226–31.
108. Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of pulsed-field gel electrophoresis agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. Jpn J Infect Dis. 2009;62:54–6.
109. Fields BS. *Legionellae* and Legionnaires' disease. In: C J Hurst, G R Knudsen, M J McInerney, L D Stetzenbach, and M V Walter (ed), Manual of environmental microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1997. p. 666–75.
110. Carvalho FRS, Vazoller RF, Foronda AS, Pellizari VH. Phylogenetic study of *Legionella* species in pristine and polluted aquatic samples from a tropical Atlantic forest ecosystem. Curr Microbiol. 2007;55:288–93.
111. Carvalho FRS, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. Occurrence and diversity of *Legionellaceae* in polar lakes of the Antarctic peninsula. Curr Microbiol. 2008;57:294–300.

112. Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Filion LG, Sattar SA. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2001;43:99–102.
113. Brooks T, Osicki R, Springthorpe V, Sattar S, Filion L, Abrial D, *et al.* Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *J Toxicol Environ Health A.* 2004;67:1845–59.
114. Wullings BA, van der Kooij D. Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 degrees C. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:157–66.
115. Wullings BA, Bakker G, van der Kooij D. Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:634–41.
116. Stojek NM, Dutkiewicz J. Co-existence of *Legionella* and other Gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. *Ann Agric Environ Med AAEM.* 2011;18:330–4.
117. Stojek NM, Wójcik-Fatla A, Dutkiewicz J. Efficacy of the detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR. II. Examination of native samples from various sources. *Ann Agric Environ Med AAEM.* 2012;19:295–8.
118. Martinelli F, Carasi S, Scarcella C, Speziani F. Detection of *Legionella pneumophila* at thermal spas. *New Microbiol.* 2001;24:259–64.
119. Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Arslan A, Esteve J, *et al.* Exposure to *Legionellaceae* at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. *Epidemiol Infect.* 1989;102:31–6.
120. Gaia V, Poloni C, Peduzzi R. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping. Report of two clinical cases. *Eur J Epidemiol.* 1994;10:303–6.
121. Molmeret M, Jarraud S, Mori JP, Pernin P, Forey F, Reyrolle M, *et al.* Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa. *Epidemiol Infect.* 2001;126:231–9.
122. Tominaga M, Aoki Y, Haraguchi S, Fukuoka M, Hayashi S, Tamesada M, *et al.* Legionnaires' disease associated with habitual drinking of hot spring water. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2001;40:1064–7.
123. Ito I, Naito J, Kadowaki S, Mishima M, Ishida T, Hongo T, *et al.* Hot spring bath and *Legionella* pneumonia: an association confirmed by genomic identification. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2002;41:859–63.
124. Nozue T, Chikazawa H, Miyanishi S, Shimazaki T, Oka R, Shimazaki S, *et al.* *Legionella* pneumonia associated with adult respiratory distress syndrome caused by *Legionella pneumophila* serogroup 3. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2005;44:73–8.

125. Matsui M, Fujii S, Shirowa R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, *et al.* Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. J Med Microbiol. 2010;59:1242–6.
126. Kurosawa H, Fujita M, Kobatake S, Kimura H, Ohshima M, Nagai A, *et al.* A case of *Legionella* pneumonia linked to a hot spring facility in Gunma Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 2010;63:78–9.
127. Schalk JAC, Docters van Leeuwen AE, Lodder WJ, de Man H, Euser S, den Boer JW, *et al.* Isolation of *Legionella pneumophila* from Pluvial Floods by Amoebal Coculture. Appl Environ Microbiol. 2012;78:4519–21.
128. Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, *et al.* *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. Emerg Infect Dis. 2009;15:1295–7.
129. Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, *et al.* Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. Appl Environ Microbiol. 2013;79:3959–66.
130. Schets FM, Italiaander R, van den Berg HHJL, de Roda Husman AM. Rainwater harvesting: quality assessment and utilization in The Netherlands. J Water Health. 2010;8:224–35.
131. Simmons G, Jury S, Thornley C, Harte D, Mohiuddin J, Taylor M. A Legionnaires' disease outbreak: a water blaster and roof-collected rainwater systems. Water Res. 2008;42:1449–58.
132. Palmer CJ, Tsai YL, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. Appl Environ Microbiol. 1993;59:3618–24.
133. Ortiz-Roque CM, Hazen TC. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. Appl Environ Microbiol. 1987;53:2231–6.
134. Gast RJ, Moran DM, Dennett MR, Wurtsbaugh WA, Amaral-Zettler LA. Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. J Water Health. 2011;9:37–52.
135. Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. Appl Environ Microbiol. 1998;64:1688–93.
136. Travis TC, Brown EW, Peruski LF, Siludjai D, Jorakate P, Salika P, *et al.* Survey of *Legionella* species found in thai soil. Int J Microbiol. 2012;2012:218791.
137. Wallis L, Robinson P. Soil as a source of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1). Aust N Z J Public Health. 2005;29:518–20.
138. Parry MF, Stampleman L, Hutchinson JH, Folta D, Steinberg MG, Krasnogor LJ. Waterborne *Legionella bozemanii* and nosocomial pneumonia in immunosuppressed patients. Ann Intern Med. 1985;103:205–10.

139. Haley CE, Cohen ML, Halter J, Meyer RD. Nosocomial Legionnaires' disease: a continuing common-source epidemic at Wadsworth Medical Center. *Ann Intern Med.* 1979;90:583–6.
140. Nguyen TMN, Ille D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, *et al.* A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis.* 2006 1;193:102–11.
141. Ulleryd P, Hugosson A, Allestam G, Bernander S, Claesson BEB, Eilertz I, *et al.* Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden--epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. *BMC Infect Dis.* 2012;12:313.
142. Ferré MRS, Arias C, Oliva JM, Pedrol A, García M, Pellicer T, *et al.* A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2009;28:153–9.
143. Gilmour MW, Bernard K, Tracz DM, Olson AB, Corbett CR, Burdz T, *et al.* Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 3):336–41.
144. Kirrage D, Reynolds G, Smith GE, Olowokure B, Hereford Legionnaires Outbreak Control Team. Investigation of an outbreak of Legionnaires' disease: Hereford, UK 2003. *Respir Med.* 2007;101:1639–44.
145. Coetzee N, Duggal H, Hawker J, Ibbotson S, Harrison TG, Phin N, *et al.* An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2012;17.
146. Beyrer K, Lai S, Dreesman J, Lee Jv, Joseph C, Harrison T, *et al.* Legionnaires' disease outbreak associated with a cruise liner, August 2003: epidemiological and microbiological findings. *Epidemiol Infect.* 2007;135:802–10.
147. Benkel DH, McClure EM, Woolard D, Rullan JV, Miller GB, Jenkins SR, *et al.* Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *Int J Epidemiol.* 2000;29:1092–8.
148. Campese C, Roche D, Clément C, Fierobe F, Jarraud S, de Waelle P, *et al.* Cluster of Legionnaires' disease associated with a public whirlpool spa, France, April-May 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010;15.
149. Euser SM, Pelgrim M, den Boer JW. Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. *Scand J Infect Dis.* 2010;42:910–6.

150. Bouwknecht M, Schijven JF, Schalk JAC, de Roda Husman AM. Quantitative Risk Estimation for a *Legionella pneumophila* Infection Due to Whirlpool Use. *Risk Anal.* 2013;33:1228–36.
151. Steele TW, Moore CV, Sangster N. Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionellae* in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:2984–8.
152. Cramp GJ, Harte D, Douglas NM, Graham F, Schousboe M, Sykes K. An outbreak of Pontiac fever due to *Legionella longbeachae* serogroup 2 found in potting mix in a horticultural nursery in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 2010;138:15–20.
153. Koide M, Arakaki N, Saito A. Distribution of *Legionella longbeachae* and other *Legionellae* in Japanese potting soils. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2001;7:224–7.
154. Casati S, Conza L, Bruin J, Gaia V. Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;16:945–7.
155. Hughes MS, Steele TW. Occurrence and distribution of *Legionella* species in composted plant materials. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2003–5.
156. Casati S, Gioria-Martinoni A, Gaia V. Commercial potting soils as an alternative infection source of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in Switzerland. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;15:571–5.
157. O’Loughlin RE, Kightlinger L, Werpy MC, Brown E, Stevens V, Hepper C, *et al.* Restaurant outbreak of Legionnaires’ disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study. *BMC Infect Dis.* 2007 9;7:93.
158. Hlady WG, Mullen RC, Mintz CS, Shelton BG, Hopkins RS, Daikos GL. Outbreak of Legionnaire’s disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *Am J Epidemiol.* 1993;138:555–62.
159. Nygård K, Werner-Johansen Ø, Rønsen S, Caugant DA, Simonsen Ø, Kanestrøm A, *et al.* An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008;46:61–9.
160. Borgen K, Aaberge I, Werner-Johansen O, Gjørund K, Størsrud B, Haugsten S, *et al.* A cluster of Legionnaires disease linked to an industrial plant in southeast Norway, June-July 2008. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2008 18;13.
161. Mahoney FJ, Hoge CW, Farley TA, Barbaree JM, Breiman RF, Benson RF, *et al.* Communitywide outbreak of Legionnaires’ disease associated with a grocery store mist machine. *J Infect Dis.* 1992;165:736–9.
162. Barrabeig I, Rovira A, Garcia M, Oliva JM, Vilamala A, Ferrer MD, *et al.* Outbreak of Legionnaires’ disease associated with a supermarket mist machine. *Epidemiol Infect.* 2010;138:1823–8.

163. Yiallourous PK, Papadouri T, Karaoli C, Papamichael E, Zeniou M, Pieridou-Bagatzouni D, *et al.* First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2013;57:48–56.
164. Moran-Gilad J, Lazarovitch T, Mentasti M, Harrison T, Weinberger M, Mordish Y, *et al.* Humidifier-associated paediatric Legionnaires' disease, Israel, February 2012. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2012;17:20293.
165. Joly JR, Déry P, Gauvreau L, Coté L, Trépanier C. Legionnaires' disease caused by *Legionella dumoffii* in distilled water. CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can. 1986;135:1274–7.
166. Kaan JA, Simoons-Smit AM, MacLaren DM. Another source of aerosol causing nosocomial Legionnaires' disease. J Infect. 1985;11:145–8.
167. Stout JE, Yu VL, Muraca P. Isolation of *Legionella pneumophila* from the cold water of hospital ice machines: implications for origin and transmission of the organism. Infect Control IC. 1985;6:141–6.
168. Bangsberg JM, Uldum S, Jensen JS, Bruun BG. Nosocomial legionellosis in three heart-lung transplant patients: case reports and environmental observations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 1995;14:99–104.
169. Graman PS, Quinlan GA, Rank JA. Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997;18:637–40.
170. Schuetz AN, Hughes RL, Howard RM, Williams TC, Nolte FS, Jackson D, *et al.* Pseudo-outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 8 infection associated with a contaminated ice machine in a bronchoscopy suite. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30:461–6.
171. Broome CV, Goings SA, Thacker SB, Vogt RL, Beaty HN, Fraser DW. The Vermont epidemic of Legionnaires' disease. Ann Intern Med. 1979;90:573–7.
172. Cordes LG, Fraser DW, Skaliy P, Perlino CA, Elsea WR, Mallison GF, *et al.* Legionnaires' disease outbreak at an Atlanta, Georgia, Country Club: evidence for spread from an evaporative condenser. Am J Epidemiol. 1980;111:425–31.
173. O'Mahony MC, Stanwell-Smith RE, Tillett HE, Harper D, Hutchison JG, Farrell ID, *et al.* The Stafford outbreak of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect. 1990;104:361–80.
174. Breiman RF, Cozen W, Fields BS, Mastro TD, Carr SJ, Spika JS, *et al.* Role of air sampling in investigation of an outbreak of legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. J Infect Dis. 1990;161:1257–61.
175. Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, *et al.* Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. Am J Epidemiol. 1981;114:337–47.

176. Pinar A, Ramirez JA, Schindler LL, Miller RD, Summersgill JT. The use of heteroduplex analysis of polymerase chain reaction products to support the possible transmission of *Legionella pneumophila* from a malfunctioning automobile air conditioner. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2002;23:145–7.
177. Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, *et al*. Is driving a car a risk for Legionnaires' disease? *Epidemiol Infect*. 2009;137:1615–22.
178. Ricci ML, Fontana S, Pinci F, Fiumana E, Pedna MF, Farolfi P, *et al*. Pneumonia associated with a dental unit waterline. *The Lancet*. 2012;379:684.
179. Pasquarella C, Veronesi L, Napoli C, Castiglia P, Liguori G, Rizzetto R, *et al*. Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values. *Sci Total Environ*. 2012;420:289–99.
180. Singh T, Coogan MM. Isolation of pathogenic *Legionella* species and *Legionella*-laden amoebae in dental unit waterlines. *J Hosp Infect*. 2005;61:257–62.
181. Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M, Fulford MR, Frandsen E, ØStergaard E, *et al*. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *Eur J Oral Sci*. 2004;112:412–8.
182. Ricketts KD, Joseph CA, Lee JV, Wilkinson P. Wet cooling systems as a source of sporadic Legionnaires' disease: a geographical analysis of data for England and Wales, 1996–2006. *J Epidemiol Community Health*. 2012;66:618–23.
183. Euser SM, Bruin JP, Brandsema P, Reijnen L, Boers SA, Boer JWD. *Legionella* prevention in the Netherlands: an evaluation using genotype distribution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32:1017–22.
184. Schalk JAC, Euser SM, van Heijnsbergen E, Bruin JP, den Boer JW, de Roda Husman AM. Soil as a source of *Legionella pneumophila* sequence type 47. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2014;27:18–9.
185. Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiol*. 2013;13:302.
186. Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1213–6.
187. Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J Clin Microbiol*. 1982 ;16:697–9.
188. Lück PC, Igel L, Helbig JH, Kuhlisch E, Jatzwauk L. Comparison of commercially available media for the recovery of *Legionella* species. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207:589–93.

189. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol. 1981;14:298–303.
190. Wadowsky RM, Yee RB. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. Appl Environ Microbiol. 1981 42:768–72.
191. Edelstein PH, Snitzer JB, Bridge JA. Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. J Clin Microbiol. 1982;16:1061–5.
192. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. J Clin Microbiol. 1995;33:2118–23.
193. Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Marin M, et al. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1708–17.
194. Murphy NM, McLauchlin J, Ohai C, Grant KA. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Int J Food Microbiol. 2007;120:110–9.
195. Brûlet A, Nicolle M-C, Giard M, Nicolini F-E, Michallet M, Jarraud S, et al. Fatal nosocomial *Legionella pneumophila* infection due to exposure to contaminated water from a washbasin in a hematology unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008;29:1091–3.
196. Yu VL, Lee TC. Neonatal legionellosis: the tip of the iceberg for pediatric hospital-acquired pneumonia? Pediatr Infect Dis J. 2010;29:282–4.
197. Baume M, Reyrolle M, Jarraud S. Détection et quantification des légionelles dans l'environnement. In: *Legionella*. Lavoisier. Paris; p. 201.
198. Van Heijnsbergen E, Schalk JAC, Euser SM, Brandsema PS, den Boer JW, de Roda Husman AM. Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. Environ Sci Technol. 2015;49:4797–815.
199. Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, Amaral-Zettler L. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. PloS One. 2012;7:e39971.

ANNEXES

Annexe 1. Supplementary Table de la publication n°2 en cours

Name	Serogroup	ST	Further information	Strain No.	Simplex format	Triplex format
non-ST47 Sgp1						
<i>L. pneumophila</i>	1	1	Paris pulsotype	CIP 1076295	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1202 5033	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1209 3009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 0948 4034	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1004 4014	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1009 5093	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1145 2007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1213 4012	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1222 4017	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1250 2024	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	clinical	LG 1302 5007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1	OLDA	NCTC 12008	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	1	Oxford	NCTC 12009	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	1	Camperdown	NCTC 12098	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	3	Heysham	NCTC 12025	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	9	clinical	LG 1132 3017	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	9	clinical	LG 1229 4013	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	15	Lens pulsotype	CIP 108256	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	15	clinical	LG 0944 3023	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	16	clinical	LG 0902 4029	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	18	clinical	LG 1134 1017	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	18	clinical	LG 1140 5007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	20	clinical	LG 1001 2009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	20	clinical	LG 1214 2003	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	22	clinical	LG 1206 2007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	22	clinical	LG 0948 5010	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	23	clinical	LG 1202 2003	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	23	clinical	LG 1206 4014	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	23	clinical	LG 0906 4016	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	23	clinical	LG 0932 3006	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	23	clinical	LG 1004 4017	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	36	Philadelphia-1	ATCC 33152 / NCTC 11192	Neg	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	36	Philadelphia-2	NCTC 11193	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	37	clinical	LG 1249 3007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	37	Kingston-1	NCTC 11378	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	38	clinical	LG 1144 1013	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	40	clinical	LG 1206 3003	Neg	NT

<i>L. pneumophila</i>	1	40	clinical	LG 0932 4002	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	40	clinical	LG 1245 5017	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	40	France	NCTC 12007	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	42	clinical	LG 1006 5003	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	42	clinical	LG 1229 4015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	42	Benidorm	NCTC 12006	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	42	W872	NCTC 12821	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	44	clinical	LG 1205 4021	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	44	clinical	LG 1249 4012	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	44	Allentown	NCTC 12024	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	48	clinical	LG 1238 1018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	58	Knoxville-1	NCTC 11286	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	59	clinical	LG 1001 4001	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	61	Bellingham	NCTC 11404	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	61	Washington	NCTC 11201	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1205 5005	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 0944 3024	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1004 4015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1132 3016	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1140 5025	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1144 4014	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1145 1030	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	clinical	LG 1205 5005	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	62	Pontiac-1	NCTC 11191	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	65	clinical	LG 1201 5006	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	65	clinical	LG 1236 3026	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	65	clinical	LG 1246 1004	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	74	clinical	LG 0934 4010	Neg	NT	ST74 is a TLV of ST47
<i>L. pneumophila</i>	1	75	clinical	LG 1203 5005	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	75	clinical	LG 1145 3010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1207 1029	Neg	NT	ST82 is a TLV of ST47
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 0953 3017	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1132 3015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1238 2009	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1403 5007	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1302 2006	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1329 3007	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1329 2003	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1347 2009	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1236 5002	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1238 3011	Neg	NT	

<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1126 2010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1127 3020	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1131 2009	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1147 1020	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 1027 2002	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 0939 3010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 0837 5015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	82	clinical	LG 0813 3016	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	84	clinical	LG 1222 4014	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	87	clinical	LG 1249 4018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	87	clinical	LG 1304 3018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	93	clinical	LG 1229 3033	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	94	clinical	LG 1206 1025	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	94	clinical	LG 0948 4033	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	94	clinical	LG 1004 5004	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 1204 3003	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 1206 5010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 0918 3011	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 0918 3029	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 1027 5006	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	96	clinical	LG 1250 4013	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	107	clinical	LG 1214 4001	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1230 2004	Pos	Pos	ST109 is a DLV of ST47
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1101 4027	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1105 1006	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1106 4019	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1135 3014	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 0927 5012	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 0928 1008	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 0933 1003	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	LG 1334 4008	Pos	Pos	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	H053040071	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	H083920183	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	H092380261	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	environmental	H092400768	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	H073660663	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	109	clinical	H100640680	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	1	117	clinical	LG 1129 1010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	143	clinical	LG 1236 3008	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	146	clinical	LG 0915 4010	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	146	clinical	LG 1129 1011	Neg	NT	

<i>L. pneumophila</i>	1	146	clinical	LG 1129 3004	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	146	clinical	LG 1222 4016	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	152	clinical	LG 1036 1001	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	152	clinical	LG 1304 4030	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	154	clinical	LG 1303 2010	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	224	clinical	LG 1031 2006	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 1205 5009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 0902 4027	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 1004 5013	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 1129 3010	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 1214 3009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	259	clinical	LG 1303 1018	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	313	clinical	LG 1210 5007	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	345	clinical	LG 1210 2003	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	346	Cambridge-1	NCTC 11231	NT	Neg
<i>L. pneumophila</i>	1	435	clinical	LG 1006 3002	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	436	clinical	LG 1004 3006	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	436	clinical	LG 1028 2010	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	436	clinical	LG 1035 5002	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	444	clinical	LG 0902 5001	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	500	clinical	LG 1129 3009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	534	clinical	LG 1010 1024	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	534	clinical	LG 1304 2006	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	540	clinical	LG 1031 2002	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	542	clinical	LG 1206 5009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	579	clinical	LG 0938 1004	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	647	clinical	LG 0915 3010	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	664	clinical	LG 1006 3009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	664	clinical	LG 1129 1026	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	664	clinical	LG 1250 3003	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	701	clinical	LG 1206 5001	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	701	clinical	LG 0944 4016	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	701	clinical	LG 1140 2025	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	701	clinical	LG 1215 2045	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	702	clinical	LG 1212 2009	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	706	clinical	LG 1035 5001	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	751	clinical	LG 0938 4014	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	948	clinical	LG 1209 4023	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1074	clinical	LG 1135 1011	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1084	clinical	LG 1141 4013	Neg	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	1147	clinical	LG 1147 4009	Neg	NT
						160 isolates covering 59 ST

ST47						
<i>L. pneumophila</i>	1	47	pulsotype Lorraine	CIP 108729	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0842 1021	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0742 5012	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1104 2016	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1104 4042	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1105 5013	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1106 3013	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1109 1026	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1110 2014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1111 2001	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1126 2014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	98 01 0561	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0227 4033	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0231 1034	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0235 1033	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0239 2002	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0302 5015	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0303 5006	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0305 3023	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0307 4038	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0334 3052	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0344 3027	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0350 3011	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0406 4040	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0407 5055	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0408 3041	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0426 4021	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1011 2008	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0435 5030	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0436 3019	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0438 2020	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0439 2006	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0440 4025	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0445 5101	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0447 2046	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0447 2047	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 10491019	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0535 5024	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0546 5018	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0645 3016	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0603 5032	Pos	NT

<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0612 3003	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1040 1013	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0645 3023	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0645 3024	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG1039 1003	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	HL 0710 5012	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0731 5014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1039 1003	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0739 5005	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0751 2016	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	environmental	LG 0743 5013	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	environmental	LG 0743 5014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0802 3006	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0826 4030	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0829 2015	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0835 5011	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0838 4026	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0848 3003	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0909 5008	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0924 1014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0928 5005	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0927 3014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 0934 4009	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1005 3001	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1026 5004	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1027 5005	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1035 4004	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1039 7001	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1042 5016	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1050 4011	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1103 5011	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1104 4015	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1106 4019	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1102 3009	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1103 1019	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1103 2051	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1103 2052	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1103 3012	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1128 1003	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1129 3001	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1135 3014	Pos	NT
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1136 4009	Pos	NT

<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1140 3003	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1141 3009	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1208 1019	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1202 2004	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1203 4018	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1208 4002	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1211 2005	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1222 3003	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1223 5003	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1227 5006	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1227 2002	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1227 3004	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1227 4009	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1228 2004	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1229 2013	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1230 2002	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1230 3010	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1230 4026	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1232 2006	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1238 4012	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1243 2031	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1302 2003	Pos	NT	
<i>L. pneumophila</i>	1	47	clinical	LG 1303 4017	Pos	NT	106 isolates
non-serogroup 1							
<i>L. pneumophila</i>							
<i>L. pneumophila</i>	2	39	Togus-1	ATCC 33154 / NCTC 11230	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	2	39	clinical	LG 0735 3006	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	2	39	clinical	LG 0928 2005	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	2	338	clinical	LG 1051 4015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	2	948	clinical	LG 1209 4023	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	2	1455	clinical	LG 1235 1021	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	395	Bloomington-2	ATCC 33155 / NCTC 11232	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	3	87	clinical	LG 0819 5001	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	93	clinical	LG 0928 2008	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	93	clinical	LG 1002 4012	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	790	clinical	LG 1009 4045	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	93	clinical	LG 1124 2022	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	1341	clinical	LG 1227 3015	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	3	87	clinical	LG 1304 3018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	1334	Los Angeles	NCTC 11233	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	4	378	clinical	LG 1201 2012	Neg	NT	

<i>L. pneumophila</i>	4		clinical	LG 1113 1027	Neg	NT	momp'S mismatch
<i>L. pneumophila</i>	4	17	clinical	LG 1118 2027	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	4	ND	clinical	LG 0929 3017	Neg	NT	neu A fail
<i>L. pneumophila</i>	4	378	clinical	LG 0830 1011	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	5	80	Cambridge-2	NCTC 11417	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	1300	Dallas-1E	ATCC 33216 / NCTC 11405	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	5	1362	clinical	LG 1203 3016	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	5	1358	clinical	LG 1127 3018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	5	70	clinical	LG 1002 4013	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	5	ND	clinical	LG 0902 4050	Neg	NT	new ST
<i>L. pneumophila</i>	5	2059	clinical	LG 0830 2017	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	6	30	Chicago-2	ATCC 33125 / NCTC 11406	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	6	60	Oxford	NCTC 11287	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	6	778	clinical	LG 1004 4016	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	6	114	clinical	LG 0906 2008	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	6	114	clinical	LG 0930 2019	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	7	1319	Chicago-8	ATCC 33823 / NCTC 11984	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	7	451	clinical	LG 0751 2019	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	7	1904	clinical	LG 1106 1018	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	7	ND	clinical	LG 0942 4021	Neg	NT	neuA fail
<i>L. pneumophila</i>	8	1320	Concord-3	ATCC 35096 / NCTC 11985	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	8	48	clinical	LG 1139 6001	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	8	1332	clinical	LG 1040 1025	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	8	74	clinical	LG 0934 4010	Neg	NT	ST74 is a TLV of ST47
<i>L. pneumophila</i>	8	ND	clinical	LG 0934 4011	Neg	NT	pilE mismatch
<i>L. pneumophila</i>	9	390	IN-23-GI-C2	ATCC 35289 / NCTC 11986	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	10	17	Leiden-1	ATCC 43283 / NCTC 12000	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	10	1392	clinical	LG 1241 3001	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	11	ND	797-PA-H	ATCC 43130 / NCTC 12179	Neg	Neg	neuA and neuAh fail (see Massimo's paper)
<i>L. pneumophila</i>	11	ND	clinical	LG 1241 3003	Neg	NT	2/10/14/28/2/5/203
<i>L. pneumophila</i>	12	187	570-CO-H	ATCC 43290 / NCTC 12180	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	13	1318	82A3105	ATCC 43736 / NCTC 12181	Neg	Neg	
<i>L. pneumophila</i>	14	ND	1169-MN-H	ATCC 73703 / NCTC 12174	Neg	Neg	Need to check this (Tim/Bee)
<i>L. pneumophila</i>	14	1324	clinical	LG 0819 2016	Neg	NT	
<i>L. pneumophila</i>	15	336	Lansing-3	ATCC 35251 /	Neg	Neg	

LC3330							
<i>L. pneumophila</i>	16	378	Jena-1	LC3392	NT	Neg	(some call this Portland Sgp4)
<i>L. pneumophila</i> <i>subsp. pascullei</i>		1335	MICU-B	NCTC 12271	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i> <i>subsp. pascullei</i>		1335	U7W	NCTC 12272	NT	Neg	
<i>L. pneumophila</i> <i>subsp. pascullei</i>		1335	U8W	NCTC 12273	NT	Neg	55 isolates covering >36ST
non-pneumophila species							
<i>L. adelaidensis</i>		NA		CDC 1762-AUS-E / NCTC 12735	Neg	Neg	
<i>L. anisa</i>		NA		ATCC 35290 / NCTC 11974	Neg	Neg	
<i>L. anisa</i>		NA		CH-47-C3	Neg	NT	
<i>L. anisa</i>		NA		WA-316-C3	Neg	NT	
<i>L. beliardensis</i>		NA		NCTC 13315	NT	Neg	
<i>L. birminghamensis</i>		NA		ATCC 73702 / NCTC 12437	Neg	Neg	
<i>L. bozemanii</i>	1	NA		ATCC 33217 / NCTC 11368	Neg	Neg	
<i>L. bozemanii</i>	2	NA		ATCC 35245 / NCTC 11975	Neg	Neg	
<i>L. brunensis</i>		NA		ATCC 43878 / NCTC 12240	Neg	Neg	
<i>L. busanensis</i>		NA		NCTC 13316	NT	Neg	
<i>L. cherrii</i>		NA		ATCC 35252 / NCTC 11976	Neg	Neg	
<i>L. cincinnatiensis</i>		NA		ATCC 43753 / NCTC 12438	Neg	Neg	
<i>L. dresdeniensis</i>		NA		NCTC 13409	NT	Neg	
<i>L. drozanskii</i>		NA		DSM 19890	NT	Neg	
<i>L. dumoffii</i>		NA		ATCC 35280 / NCTC 11370	Neg	Neg	
<i>L. erythra</i>	1	NA		ATCC 35303 / NCTC 11977	Neg	Neg	
<i>L. fairfieldensis</i>		NA		NCTC 12488	NT	Neg	
<i>L. fallonii</i>		NA		DSM 19889	NT	Neg	
<i>L. feeleeii</i>	1	NA		NCTC 12022	NT	Neg	
<i>L. feeleeii</i>	2	NA		ATCC 35849 / NCTC 11978	Neg	Neg	
<i>L. feeleeii</i>		NA		ATCC 700514	Neg	NT	
<i>L. geestiana</i>		NA		NCTC 12373	NT	Neg	
<i>L. gormanii</i>		NA		ATCC 33297 / NCTC 11401	Neg	Neg	
<i>L. gratiana</i>		NA		ATCC 49413 / NCTC 12388	Neg	Neg	
<i>L. gresilensis</i>		NA		ATCC 700509 / NCTC 13312	Neg	Neg	
<i>L. hackeliae</i>	1	NA		ATCC 35250 /	Neg	Neg	

NCTC 11979					
<i>L. hackeliae</i>	2	NA	ATCC 35999 / NCTC 11980	Neg	Neg
<i>L. impletisoli</i>		NA	DSM 18493	NT	Neg
<i>L. israelensis</i>		NA	ATCC 43119 / NCTC 12010	Neg	Neg
<i>L. jamestownensis</i>		NA	ATCC 35298 / NCTC 11981	Neg	Neg
<i>L. jordanis</i>		NA	ATCC 33263 / NCTC 11533	Neg	Neg
<i>L. lansingensis</i>		NA	ATCC 49751 / NCTC 12830	NT	Neg
<i>L. londiniensis</i>		NA	ATCC 49505 / NCTC 12931	Neg	Neg
<i>L. londiniensis</i>		NA	ATCC 700510	Neg	NT
<i>L. longbeachae</i>	1	NA	ATCC 33462 / NCTC 11477	Neg	Neg
<i>L. longbeachae</i>	2	NA	ATCC 33484 / NCTC 11530	Neg	Neg
<i>L. maceachernii</i>		NA	ATCC 35300 / NCTC 11982	Neg	Neg
<i>L. micdadei</i>		NA	Heba NCTC 11403	NT	Neg
<i>L. micdadei</i>		NA	Tatlock ATCC 33218 / NCTC 11371	Neg	Neg
<i>L. moravica</i>		NA	ATCC 43877 / NCTC 12239	Neg	Neg
<i>L. nagasakii</i>		NA	ATCC BAA1558	NT	Neg
<i>L. nautarum</i>		NA	ATCC 49506 /NCTC 12932	Neg	Neg
<i>L. oakridgensis</i>		NA	ATCC 700515 / NCTC 11531	Neg	Neg
<i>L. parisiensis</i>		NA	ATCC 35299 / NCTC 11983	Neg	Neg
<i>L. quateirensis</i>		NA	ATCC 49507 / NCTC 12376	Neg	Neg
<i>L. quinlivanii</i>	1	NA	1448-AUS-E	Neg	NT
<i>L. quinlivanii</i>	1	NA	ATCC 43830 / NCTC 12433	Neg	Neg
<i>L. quinlivanii</i>	2	NA	NCTC 12434	NT	Neg
<i>L. rowbothamii</i>		NA	ATCC 700991	NT	Neg
<i>L. rubrilucens</i>		NA	ATCC 35304 / NCTC 11987	Neg	Neg
<i>L. sainthelensi</i>	1	NA	ATCC 35248 / NCTC 11988	Neg	Neg
<i>L. sainthelensi</i>	2	NA	ATCC 49322 / NCTC 12450	Neg	Neg
<i>L. sainthelensi</i>	2	NA	ATCC 700517	Neg	NT
<i>L. santicrucis</i>		NA	ATCC 35301 / NCTC 11989	Neg	Neg
<i>L. shakespearei</i>		NA	NCTC 12829	NT	Neg
<i>L. species IBV-3</i>		NA	ATCC 700511	Neg	NT

<i>L. spiritensis</i>	1	NA	ATCC 35249 / NCTC 11990	Neg	Neg
<i>L. spiritensis</i>	2	NA	NCTC 12082	NT	Neg
<i>L. steelei</i>		NA	ATCC BAA2169	NT	Neg
<i>L. steigerwaltii</i>		NA	ATCC 35302 / NCTC 11991	Neg	Neg
<i>L. taurinensis</i>		NA	ATCC 700508 / NCTC 13314	Neg	Neg
<i>L. tucsonensis</i>		NA	ATCC 49180 / NCTC 12439	Neg	Neg
<i>L. wadsworthii</i>		NA	ATCC 33877 / NCTC 11532	Neg	Neg
<i>L. waltersii</i>		NA	ATCC 51914 / NCTC 13017	Neg	Neg
<i>L. worsliensis</i>		NA	ATCC 49508 / NCTC 12377	Neg	Neg
<i>L. yabuuchiae</i>		NA	DSM 18492	NT	Neg
non-Legionella spp.					
<i>A. hydrophila</i>		clinical	BE 1236 -1	Neg	NT
<i>Alcaligenes faecalis</i>		clinical	BE 1236 -2	Neg	NT
<i>Bacillus subtilis</i>		Quanticult+ Oxoid	ATCC 6633	Neg	NT
<i>B. cepacia</i>		clinical	BE 1236-3	Neg	NT
<i>C. sporogenes</i>		Quanticult+ Oxoid	ATCC 19404	Neg	NT
<i>E. aerogenes</i>		clinical	BE 1236-3	Neg	NT
<i>Escherichia coli</i>		clinical	BE 1236-4	Neg	NT
<i>Flavobacterium sp.</i>		clinical	BE 1236-5	Neg	NT
<i>Klebsiella oxytoca</i>		clinical	BE 1236-6	Neg	NT
<i>L. monocytogenes</i>		clinical	BE 1236-7	Neg	NT
<i>Proteus vulgaris</i>		clinical	BE 1236-8	Neg	NT
<i>P. aeruginosa</i>		Quanticult+ Oxoid	ATCC 9027	Neg	NT
<i>P. fluorescens</i>		clinical	BE 1236-9	Neg	NT
<i>P. putida</i>		clinical	BE 1236-10	Neg	NT
<i>Serratia marcescens</i>		clinical	BE 1236-11	Neg	NT
<i>S. maltophilia</i>		clinical	BE 1236-12	Neg	NT

NA : Not Applicable ; Neg : Negative ; NT : Not tested