



SESSION SFM



# La légionelle dans tous ses états

## Epidémiologie et résistance

Sophie JARRAUD  
[sophie.jarraud@chu-lyon.fr](mailto:sophie.jarraud@chu-lyon.fr)

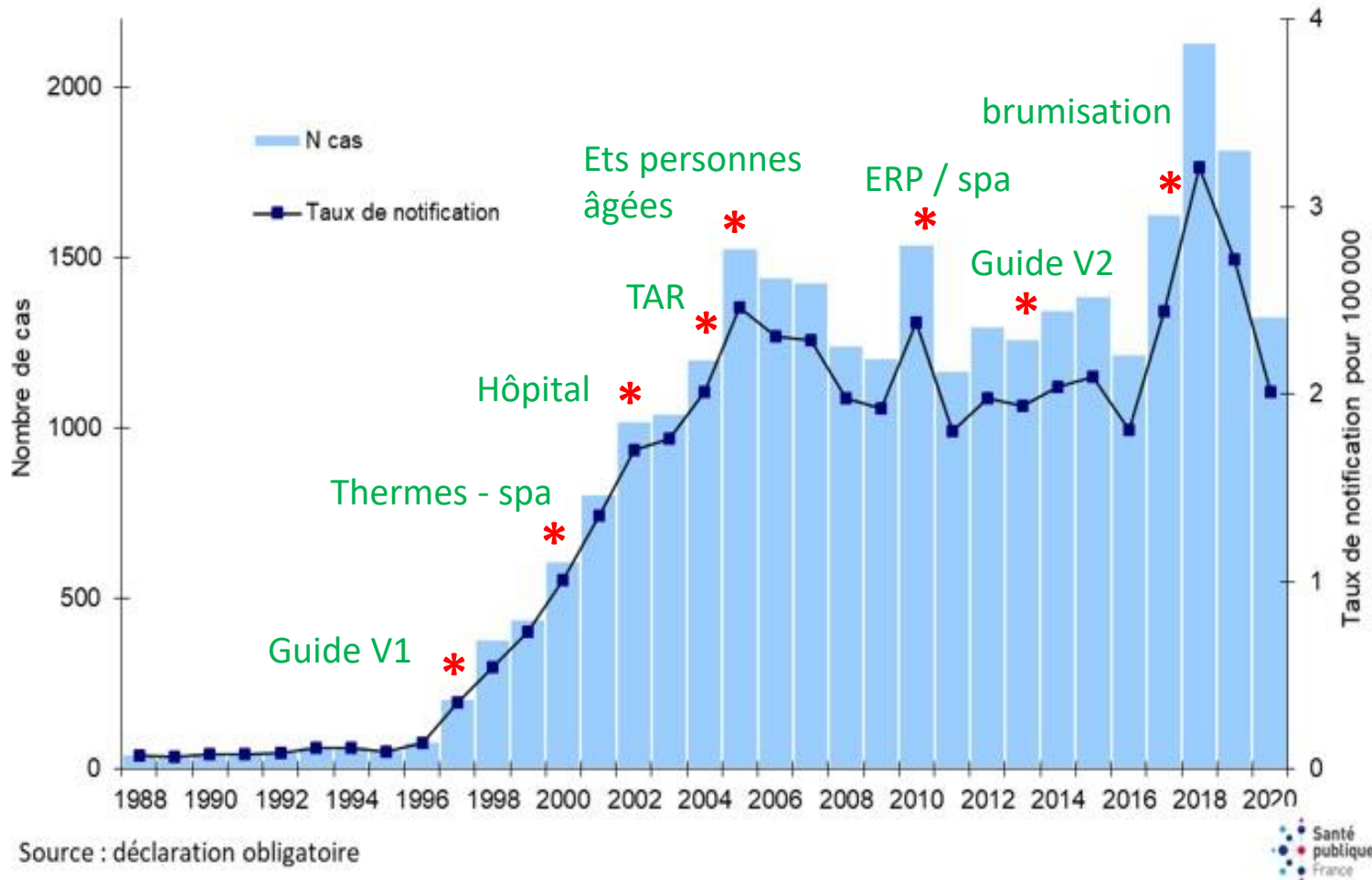
**LEGIONELLES**  
Centre National de Référence



Centre  
International  
de Recherche  
en Infectiologie



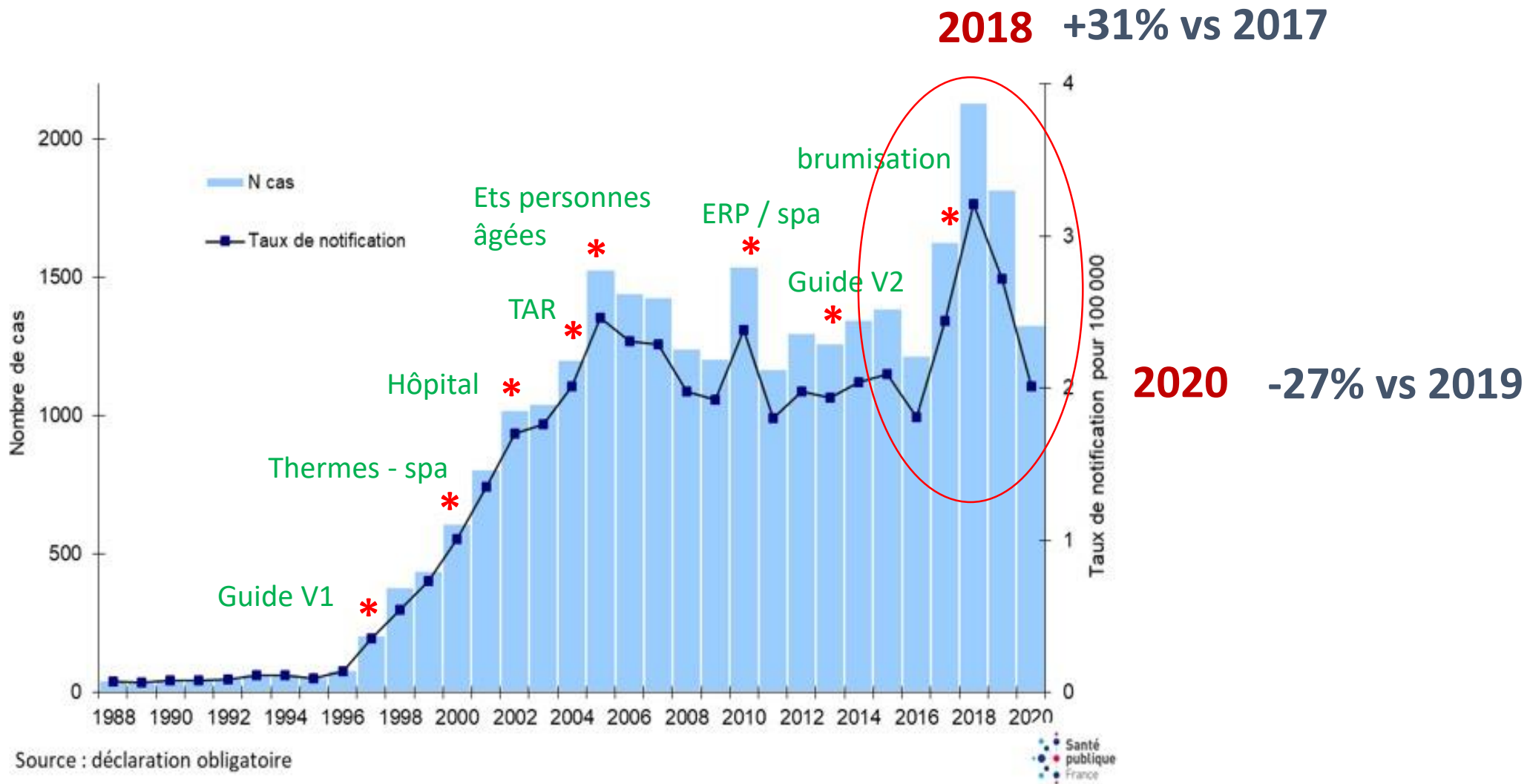
# Evolution de l'incidence des cas de légionellose



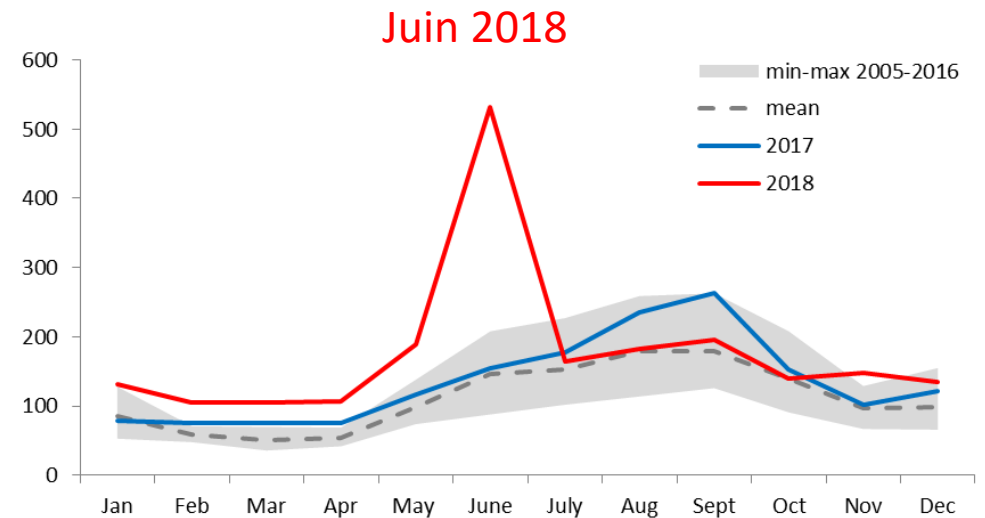
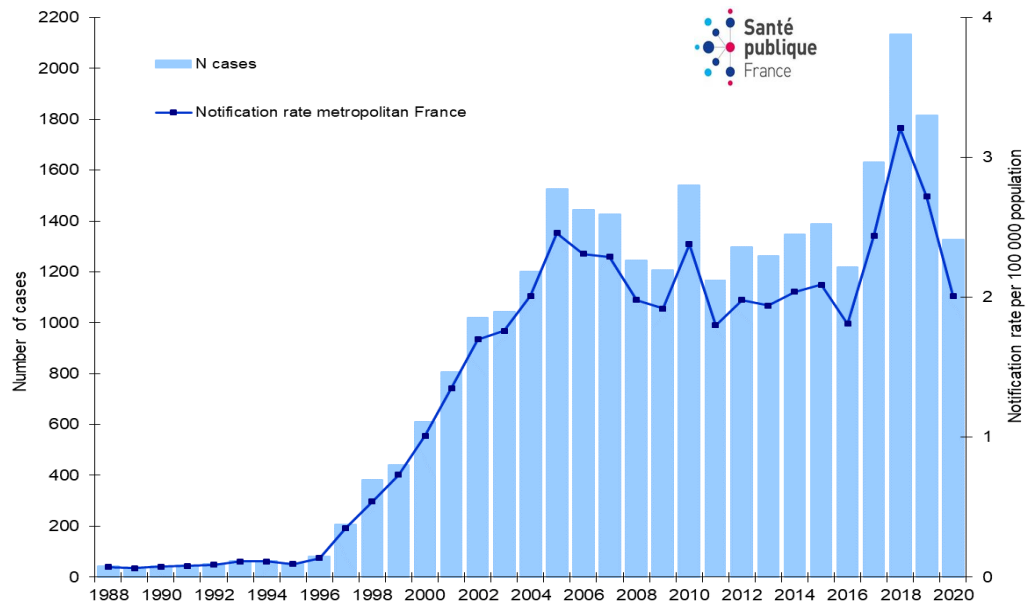
Malgré de multiples réglementations, le nombre de cas ne diminue pas en France

- ✓ Sources non maîtrisées ?
  - ✓ sources non connues / non surveillées
  - ✓ bactéries ubiquitaires ?
  - ✓ “non maîtrisables” ?

# Evolution de l'incidence ?



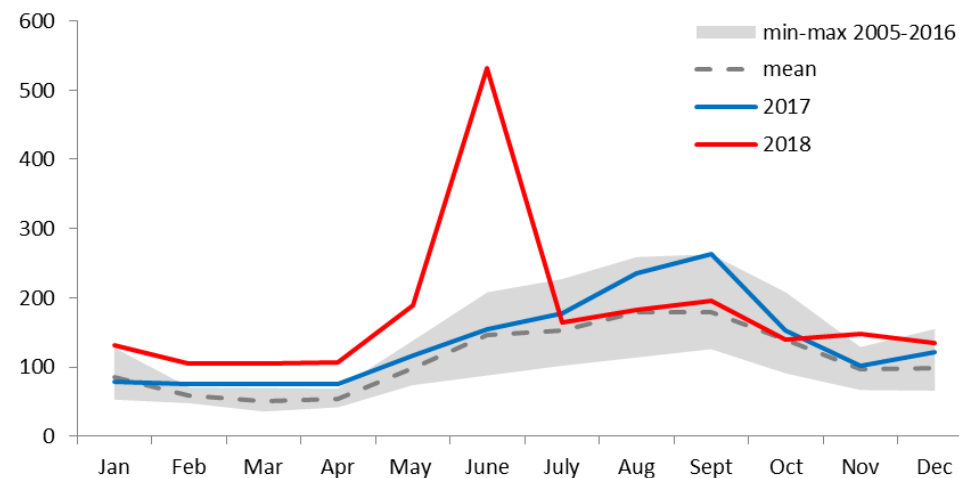
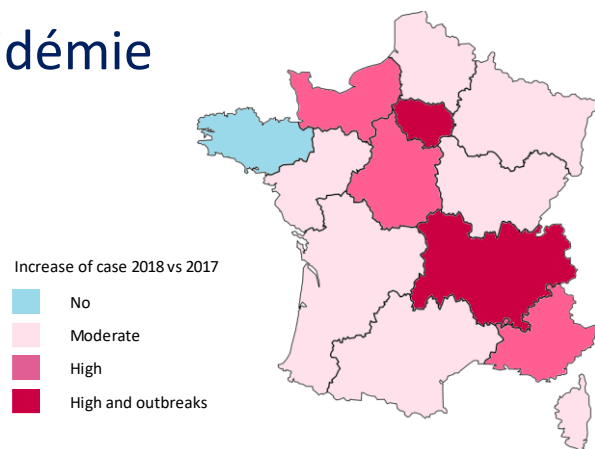
# Forte augmentation en Juin 2018



# Forte augmentation en Juin 2018

✓ Situation similaire dans plusieurs pays européens

✓ Non liée à une épidémie



✓ Cas sporadiques sans sources de contaminations communes



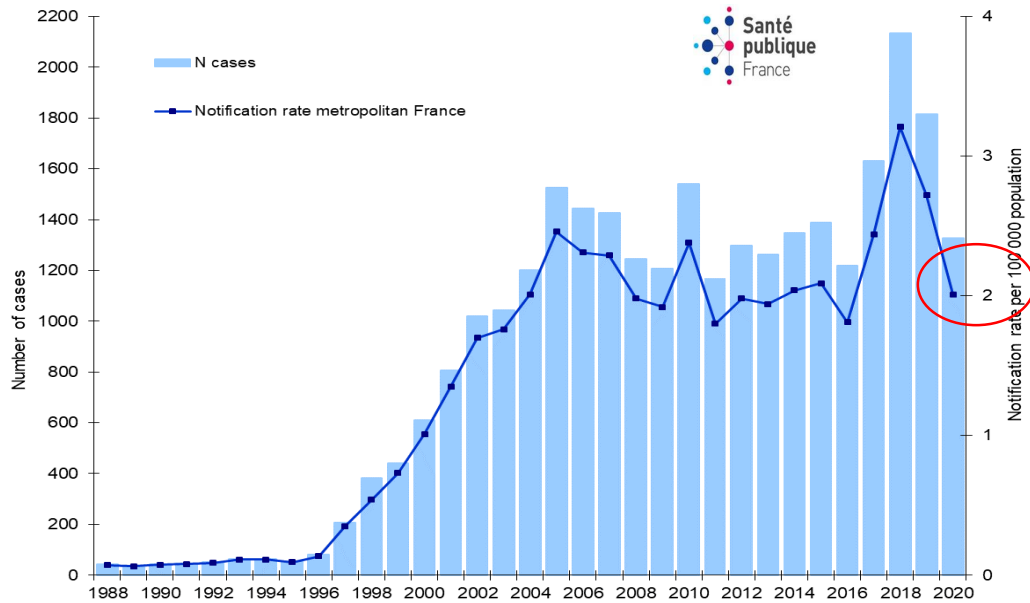
✓ Augmentation des cas en partie due à des **facteurs météorologiques** : températures, précipitations et humidité,

# Impact du climat / météorologie sur l'incidence des cas ?

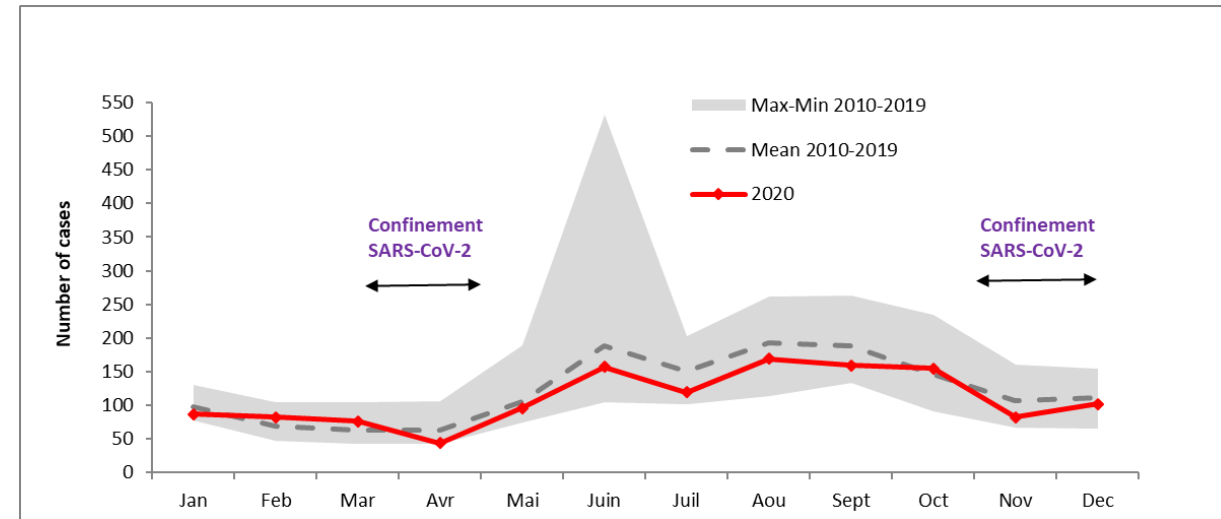
- lien entre une augmentation de l'incidence des cas et
  - **taux d'humidité relative élevé et température élevée** (Beauté J et al. 2016, Brandsema PS et al. 2014)
  - **fortes précipitations +++ :**
    - 2 à 10 jours avant début des symptômes (T. Braeye 2020, Fisman et al. 2005)
    - Entre 1 et 2 semaines (Hicks LA 2007, Garcia-Vidal C 2013, Chen NT 2014, Halsby KD 2014)
- Cas en France de 2008 – 2015 (étude de Santé publique France)
  - la durée d'un taux d'humidité relative élevé (>80%) est associée au taux d'incidence de légionellose
  - des températures moyennes d'environ 17°C (sur la journée) sont associés à un risque d'augmentation de cas de légionellose dans les semaines suivantes

# Incidence durant la pandémie (2020)?

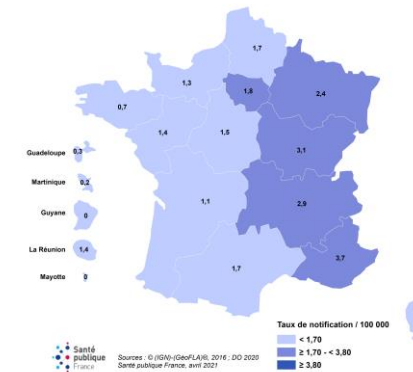
Number of cases and notification rate, France 1988 - 2020



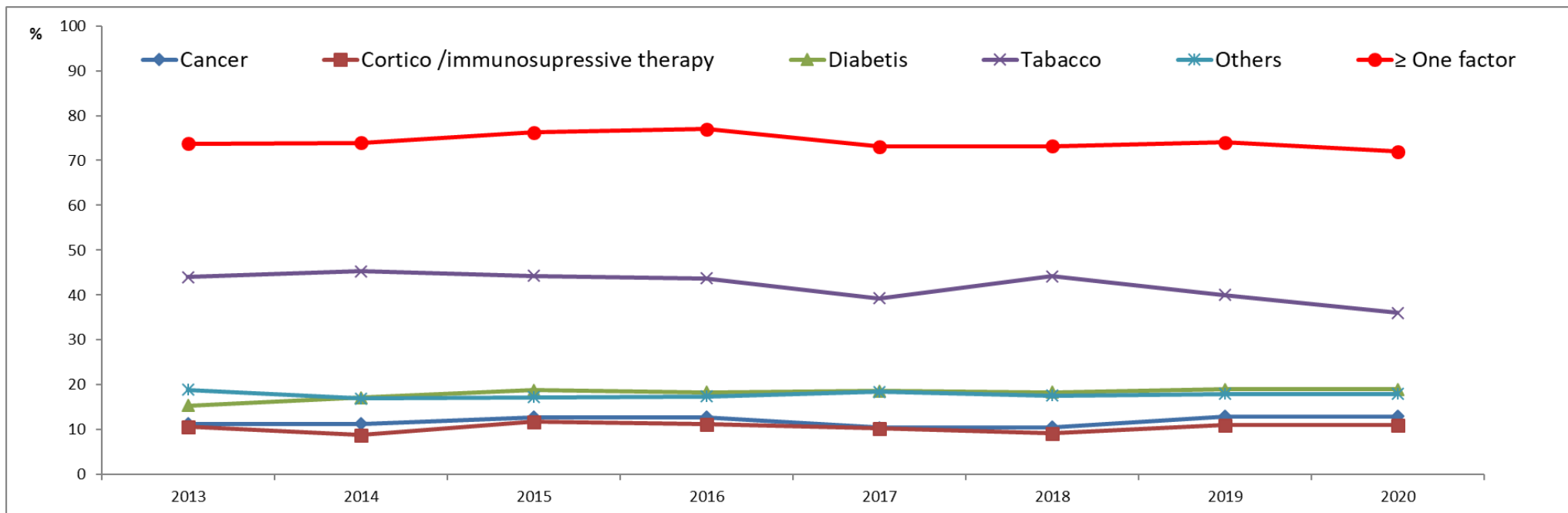
Number of LD cases by month, France, 2010-2020




- ✓ 2020 : 1328 cas (-27% vs 2019)
- ✓ Caractéristiques similaires
- ✓ Même gradient Ouest - Est
- ✓ case fatality rate: 10%



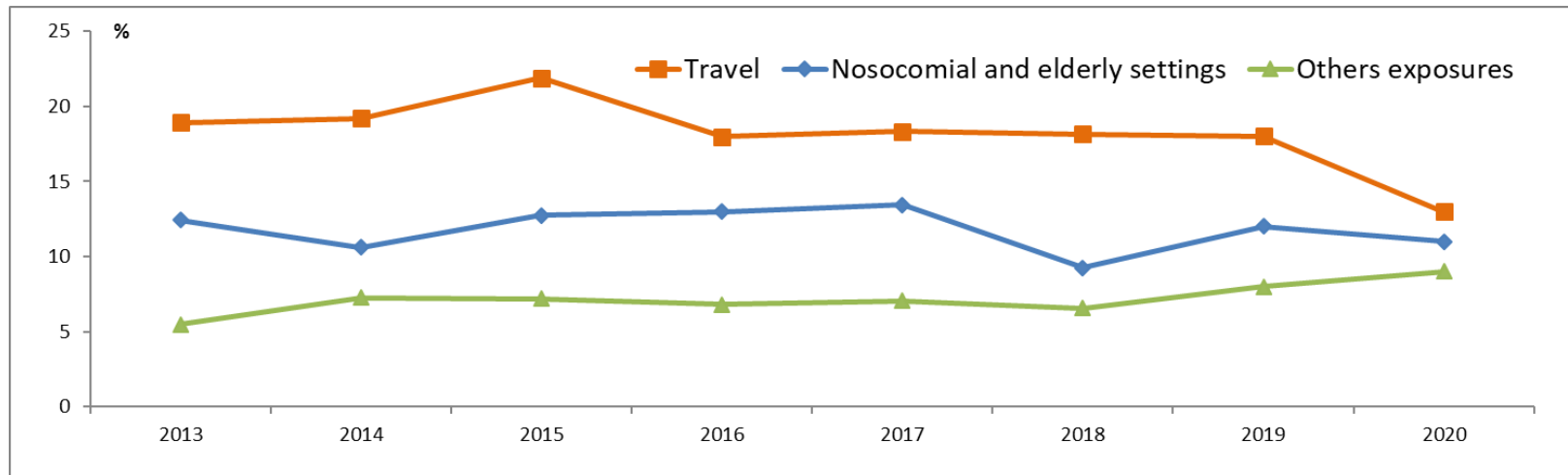
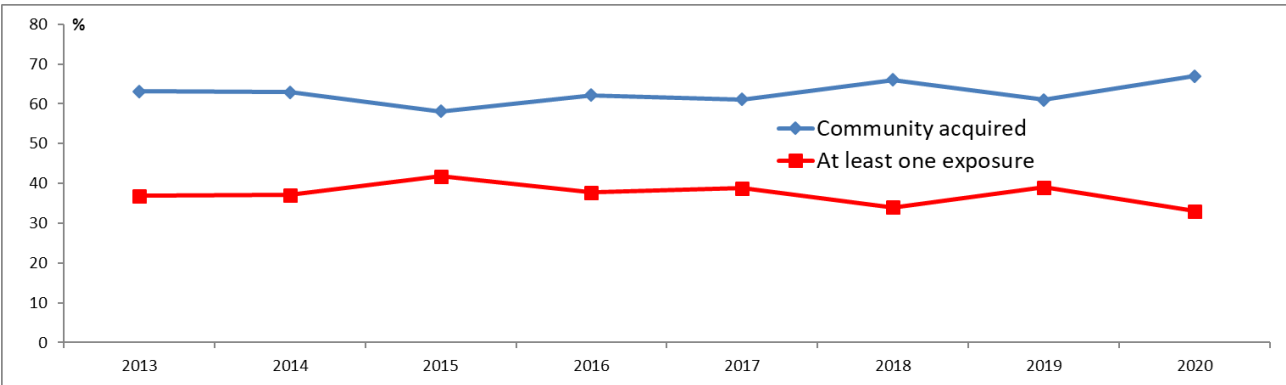
# Risk factors of LD cases, France 2013-2020



Source : Mandatory notifications 

	2013-2019	2020	<i>p</i>
	N = 10796	N= 1328	
Tobacco	4 621 (43%)	482 (36%)	<i>p</i> <10-6
Only Tobacco	3572 (33%)	377 (28%)	<i>p</i> <0.001

# Risk exposures of LD cases in France, 2013-2020



\* spa, work place ,  
leisure site...

	2013-2019	2020	<i>p</i>
	N = 10796	N= 1328	
Community acquired	6 727 (62%)	890 (67%)	<i>p</i> <0.001
Travel	2049 (19%)	179 (13%)	<i>p</i> <10-6

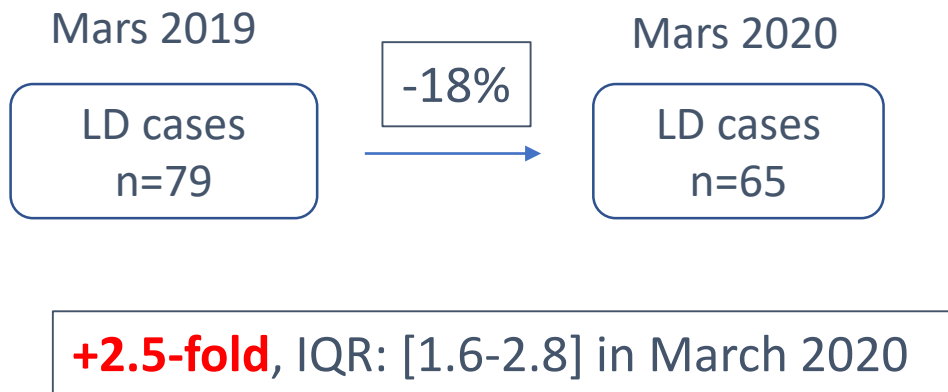
- ✓ Moins de cas
- ✓ Plus de cas communautaires
- ✓ = moins de cas liés au voyage

# Sous-diagnostic de légionellose en 2020 ?

Contact des labos : **tests urinaires réalisés** en Mars 2020 vs Mars 2019?



59 laboratoires d'hôpitaux (47 villes)



**Tests de detection des Ag dans les urines vendus** aux laboratoires français?

- Contact de 6 principaux distributeurs
- En Mars 2020 vs Mas 2019: **+2.1-fold**, IQR: [1.52-14.8]
- En 2020 vs 2019: **+1.3-fold**

=> pas de sous-diagnostic de la légionellose en 2020 comparé à 2019

Co-infection de *Legionella* et SARS-CoV-2 ?

# Co-infection de *Legionella* et SARS-CoV-2 ?

## Inclusion

All notified LD cases  
n=65

✓ Onset symptoms from  
**March 1 to 31, 2020**



59 hospital laboratories in 47 cities

33 labs

No SARS-CoV-2  
testing  
n=12

No data,  
n=4

SARS-CoV-2  
testing,  
n=49

SARS-CoV-2  
Negative  
n=42

SARS-CoV-2  
Positive  
n=7

# Co-infection de *Legionella* et SARS-CoV-2 ?

## Inclusion

All notified LD cases  
n=65

✓ Onset symptoms from  
**March 1 to 31, 2020**



59 hospital laboratories in 47 cities

33 labs

No SARS-CoV-2  
testing  
n=12

No data,  
n=4

SARS-CoV-2  
testing,  
n=49

## Frequency of co-infection

**7/49 = 14%**

SARS-CoV-2  
Negative  
n=42

SARS-CoV-2  
Positive  
n=7

# Co-infection de *Legionella* et SARS-CoV-2 ?

## Inclusion

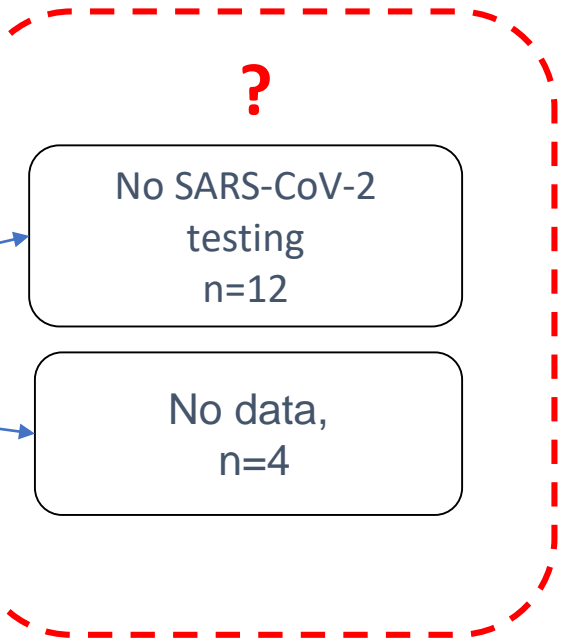


All notified LD cases  
March 1 to 31, 2020  
n=65

COVID-19 incidence (<5 cases / 100 000)  
in the region of residence

59 hospital laboratories in 47 cities

33 labs



## Co-infection frequency

**from 10.8% (7/65) to 14% (7/49)**

SARS-CoV-2 testing,  
n=49

SARS-CoV-2  
Negative  
n=42

SARS-CoV-2  
Positive  
n=7

## Co-infection with Legionella and SARS-CoV-2, France, March 2020

Camille Allam, Alexandre Gaymard, Ghislaine Descours, Christophe Ginevra, Laurence Josset, Maud Bouscambert, Laetitia Beraud, Marine Ibranosyan, Camille Golfier, Arnaud Friggeri, Bruno Lina, Christine Campèse, Florence Ader, Sophie Jarraud, COVID-19 diagnosis HCL consortium1

PMID: 34469708 DOI: 10.3201/eid2711.202150

Characteristics	Cases (n=7)
Median age	72 y
Sex ratio	6/1
LD risk factors	4/7
COVID-19 risk factor	6/7
<b>ICU admission</b>	<b>7/7</b>
<b>Mortality rate</b>	<b>29%</b>

### Legionella and SARS-Cov-2 Co-infected patients

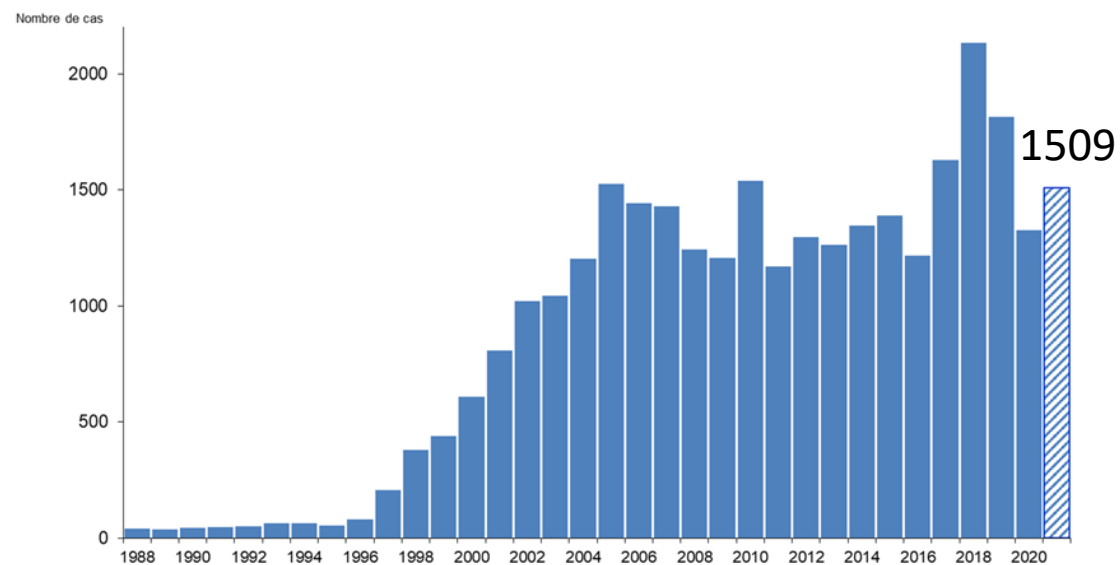
- elderly patients
- mostly men
- co-morbidities
- all admitted to ICU
- higher case fatality rate than patients without SARS-Cov-2 co-infections

≈ severe LD ≈ severe COVID >> SARS-CoV2-negative LD (9%)

# En 2021 ?

Mise à jour le 05/10/2021

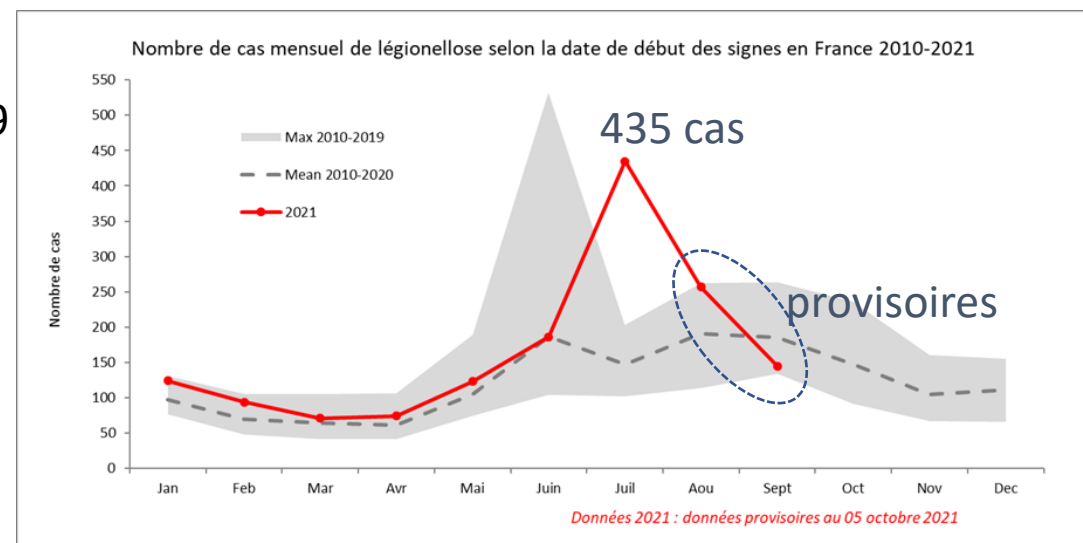
Nombre de cas de légionellose notifiés en France de 1988 à 2020



Source maladie à déclaration obligatoire

2021 données provisoires au 05 octobre 2021

Nombre de cas mensuel de légionellose selon la date de début des signes en France 2010-2021



Données 2021 : données provisoires au 05 octobre 2021

# Sources de contamination ?

Expositions à risque ? (questionnaires)

Cas de 2005-2017 (N=17703)

<b>Expositions</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Ets de soins	1200	7
Thermes	6	<1
Maison de retraite	767	4
Voyage	3329	19
Autre exposition	1367	8
<b>Total</b>	<b>724</b>	<b>39</b>

→ 60 % : pas  
d'exposition  
particulière !

# Sources de contamination ?

Expositions à risque ? (questionnaires)

Cas de 2005-2017 (N=17703)

<b>Expositions</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Ets de soins	1200	7
Thermes	6	<1
Maison de retraite	767	4
Voyage	3329	19
Autre exposition	1367	8
<b>Total</b>	<b>724</b>	<b>39</b>

→ 60 % : pas  
d'exposition  
particulière !

Place du domicile ?

# Sources de contamination ?

Expositions à risque ? (questionnaires)

Cas de 2005-2017 (N=17703)

Expositions	n	%
Ets de soins	1200	7
Thermes	6	<1
Maison de retraite	767	4
Voyage	3329	19
Autre exposition	1367	8
<b>Total</b>	<b>724</b>	<b>39</b>

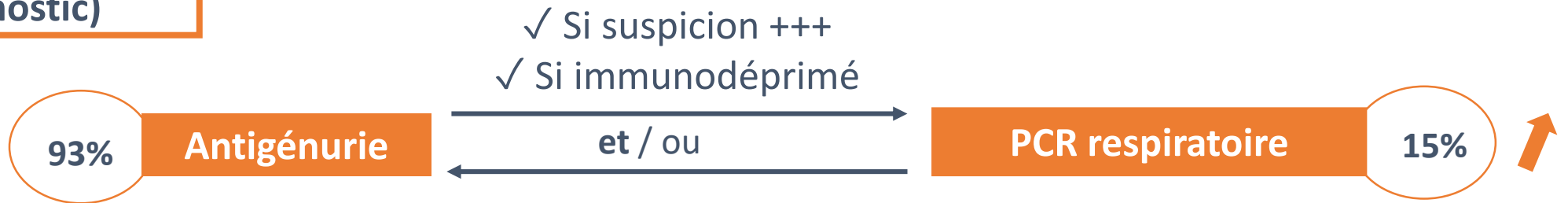
→ 60 % : pas d'exposition particulière !

7% de cas nosocomiaux ( $\approx$  100 cas /an)

- ✓ ↓ en lien avec la réglementation de 2002
  - ✓ Diagnostic exhaustif des cas ?
    - ✓ Cas à Lp1
    - ✓ Cas Lp non sg1 et non Lp
- } Nosocomiaux

# Démarche du diagnostic ?

**1<sup>ÈRE</sup> INTENTION  
(= diagnostic)**



- ✓ rapide (< 1h)
- ✓ non invasif
- ✓ sensibilité > PCR (pour Lp1)
- ✓ non influencé par ATBthérapie
- ✗ limité à Lp1
- ✗ sensibilité faible pour les cas nosocomiaux (même Lp1)

- ✓ tout échantillon respiratoire bas
- ✓ détection toutes espèces et sg de Lp (attention dépendant des kits)
- ✓ sensibilité > Ag urinaire (toutes les *Legionelloses*)
- ✓ outils de suivi
- ✗ sensibilité < Ag urinaire pour Lp1 (80-85%)

 **des cas à Legionella non-Lp1 +++**

# Démarche du diagnostic ?

**1<sup>ÈRE</sup> INTENTION  
(= diagnostic)**

Antigénurie

et / ou

PCR respiratoire

+

+

Recommandé  
+++

**2<sup>ÈME</sup> INTENTION  
(= épidémiologie)**

Culture sur échantillon  
respiratoire

Typage par NGS

ISOLAT CLINIQUE

Genre Legionella

> 60 espèces

Légionellose

*L. pneumophila*

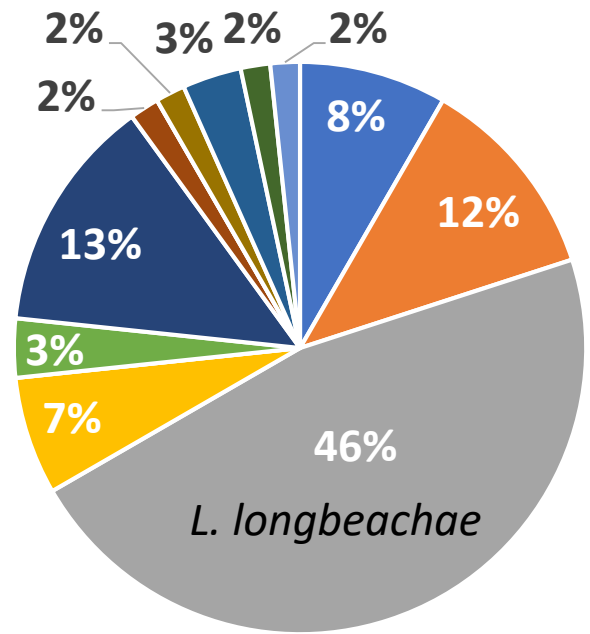
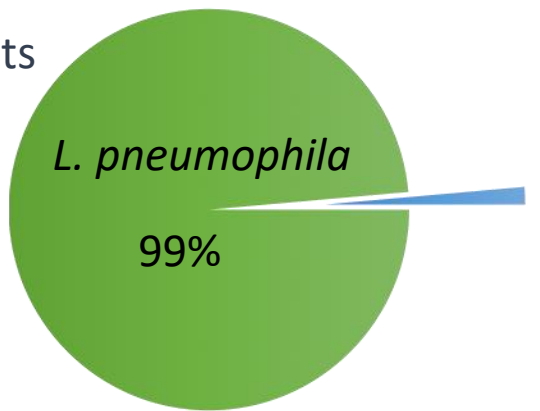
*L. non pneumophila*

99 %


1 %

Chez les immunodéprimés +++

N=4336 isolats



- Legionella dumoffii
- Legionella micdadei
- Legionella longbeachae
- Legionella anisa
- Legionella tucsonensis
- Legionella gormanii
- Legionella bozemanii
- Legionella feelei
- Legionella cincinnatiensis
- Legionella wadsworthii
- Legionella sainthelensis
- Legionella maceachernii

 Biais culturel et diagnostic initial par AgU

ISOLAT CLINIQUE



**8 STs majoritaires** = 50% des isolats cliniques    ST23, ST1, ST47, ST62, ST259, ST40, ST701, ST146

ISOLAT CLINIQUE

Genre Legionella

> 60 espèces

L. pneumophila

Sérogroupe 1

16 sérogroupes

Profil antigénique du LPS

Sequence Type

~ 3000 ST

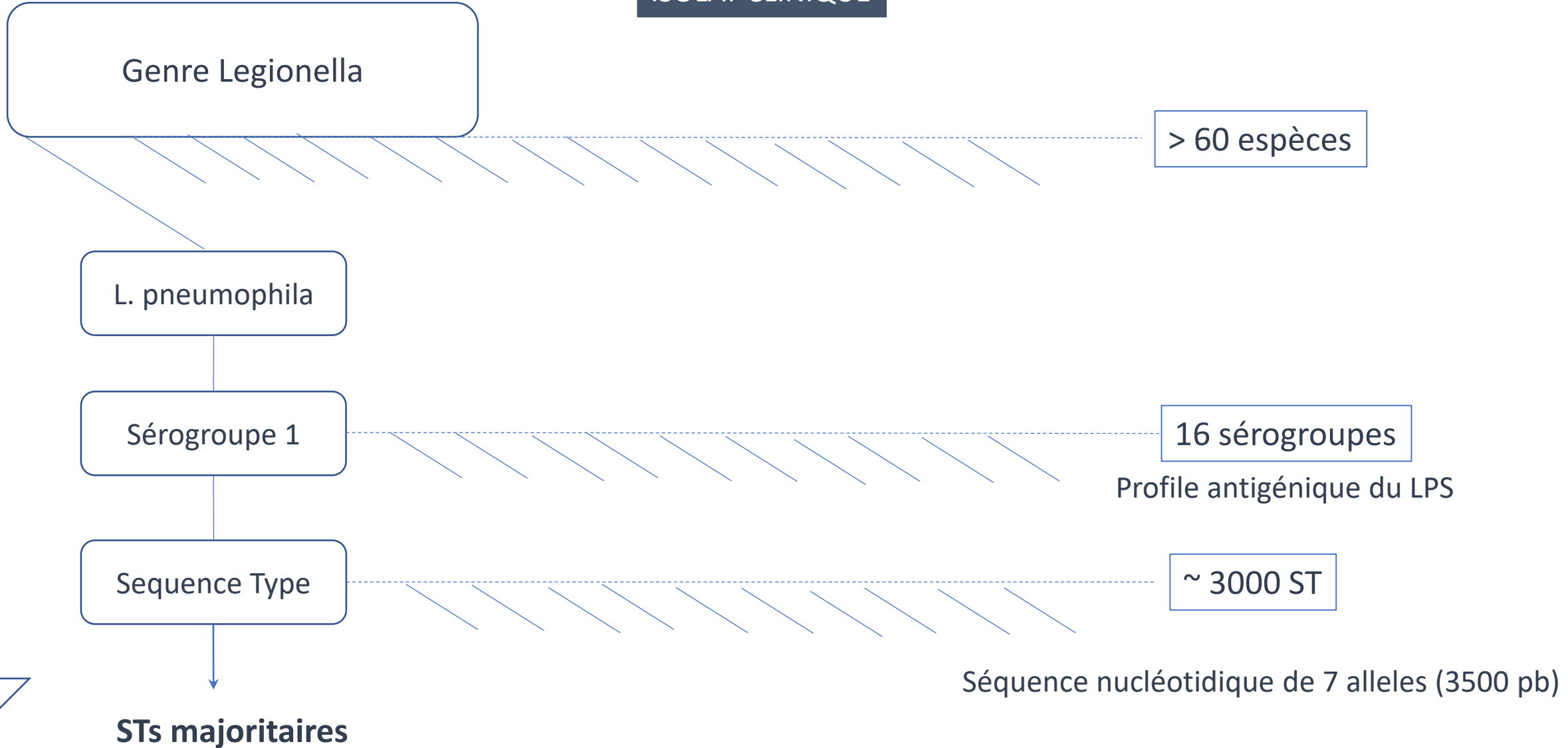
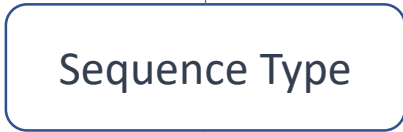
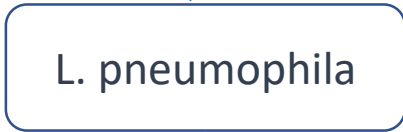
Séquence nucléotidique de 7 alleles (3500 pb)

STs majoritaires

8 STs majoritaires = 50% des isolats cliniques

ST23, **ST1**, ST47, ST62, ST259, ST40, ST701, ST146

Homme



# Sources de contamination ?

Expositions à risque ?  
(questionnaires)

Cas de 2005-2017 (N=17703)

Expositions	n	%
Ets de soins	1200	7
Thermes	6	<1
Maison de retraite	767	4
Voyage	3329	19
Autre exposition	1367	8
<b>Total</b>	<b>724</b>	<b>39</b>

→ 60 % : pas d'exposition particulière !

Investigation avec comparaison génomique

Cas de 2008-2019 (N=17 253) Comparaison : N=648 cas **(4% des cas)**

Sites	Profils de souches identiques	%	Total of comparisons
Collectivité de personnes âgées	26	93	28
Etablissement hospitalier	110	74	148
Domicile	111	70	159
Etablissement de tourisme	63	70	90
Autre *	73	66	111
Tar	8	7	112
<b>Total</b>	<b>391</b>	<b>60</b>	<b>648</b>

} Eau sanitaire

\* spa, lieu de travail, loisirs ...

PFGE, SBT, WGS

# Souches ST1

- distribution mondiale
- très fréquente dans environnement
- Cas / mortalité élevée
- association avec (analyse multivariée)
  - transmission nosocomiale
  - corticothérapie
  - cancer
  - maladies hématologiques

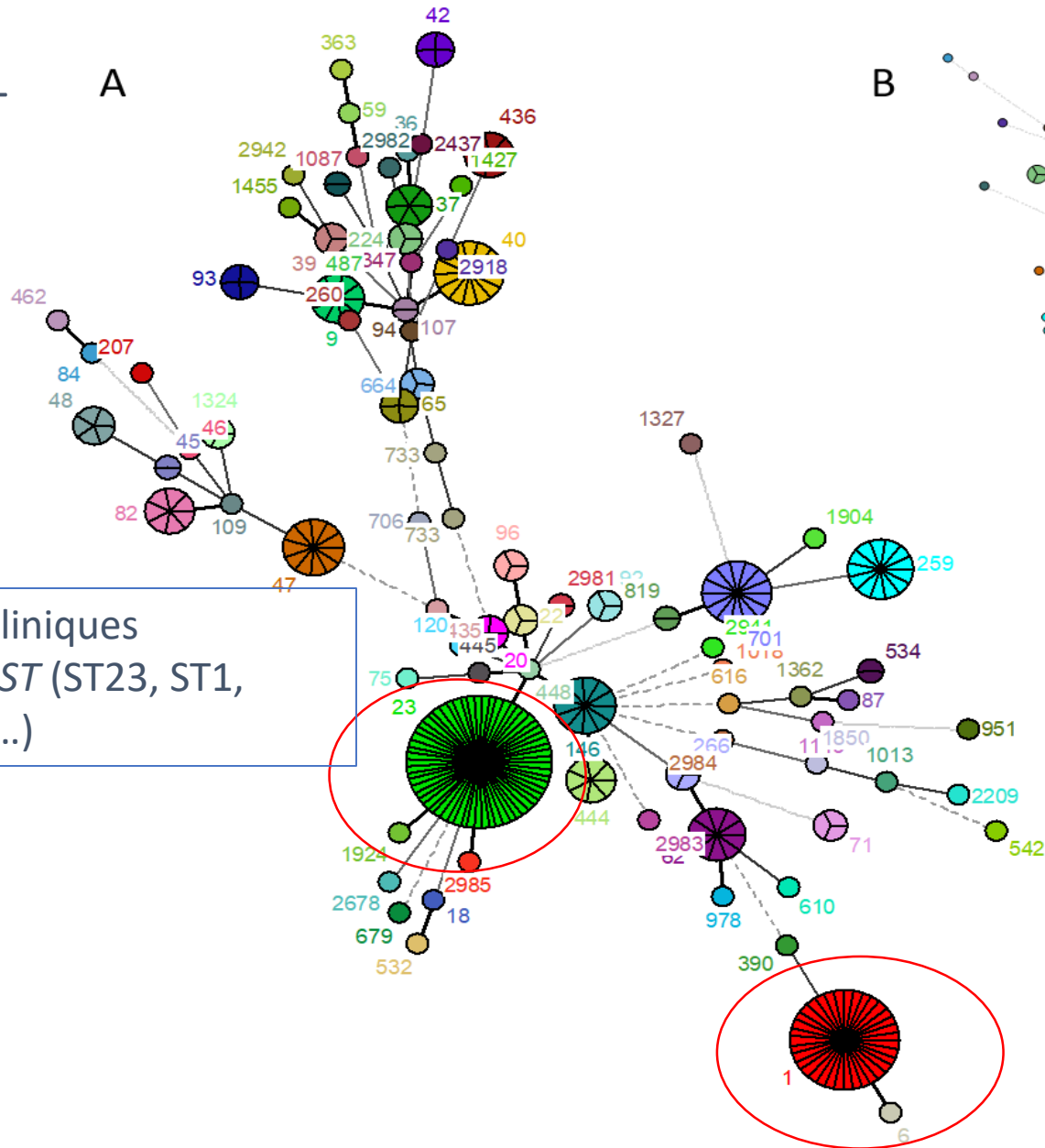
Lawrence C. JCM 1999

Cassier et al. 2014 ; Ginevra et al. 2009

# Apport du Whole Genome Sequencing (WGS)

Génotypage par SBT

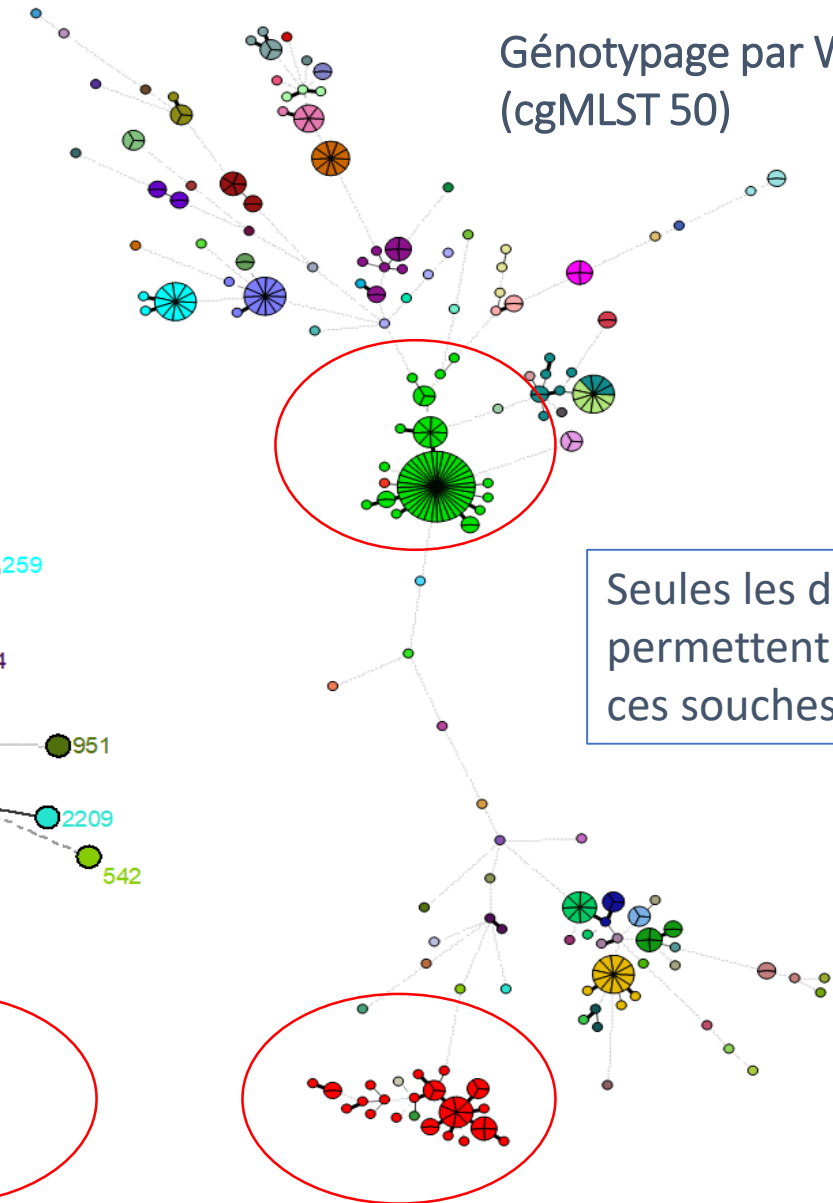
A



Souches CNR

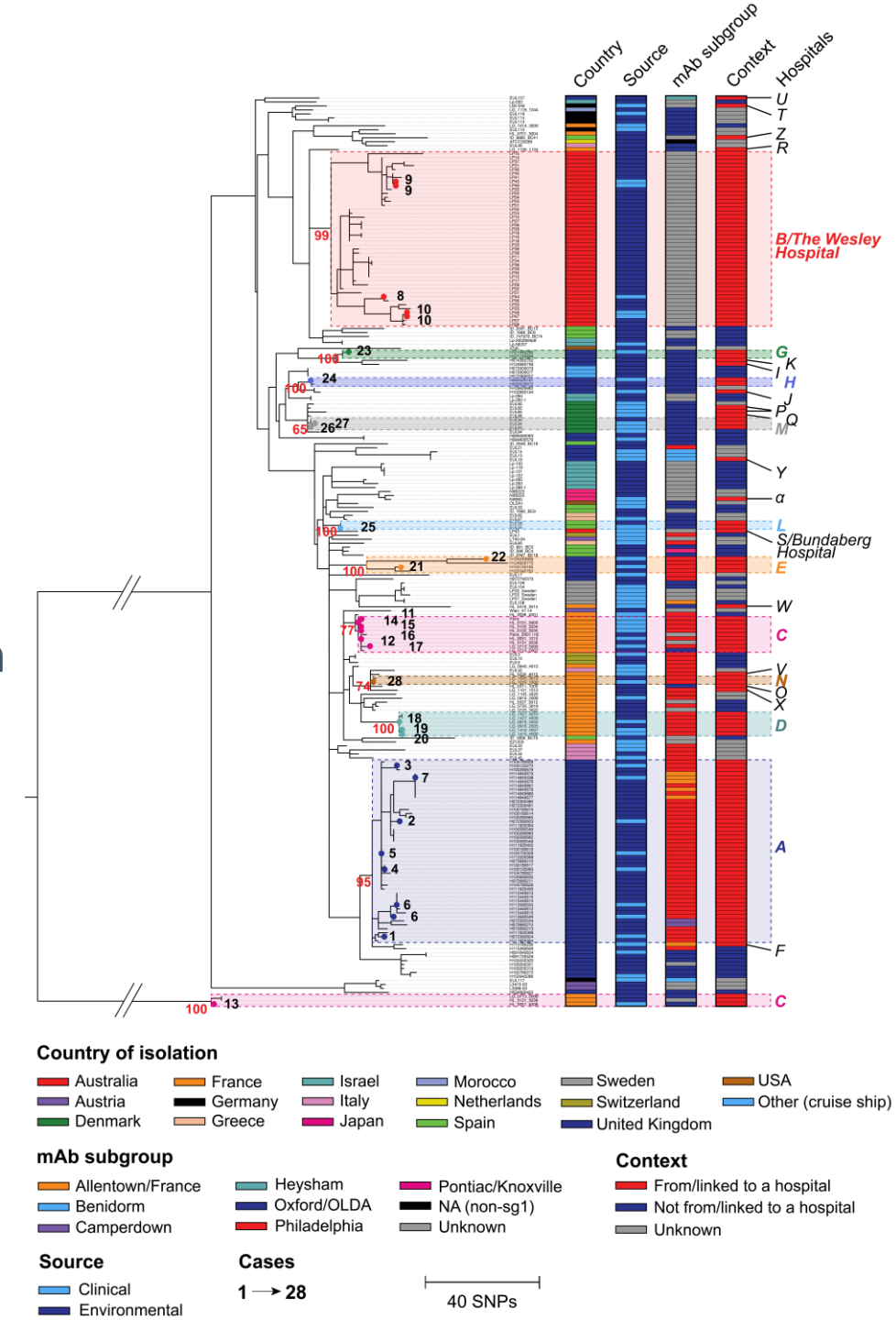
B

Génotypage par WGS (cgMLST 50)



# Souches ST1

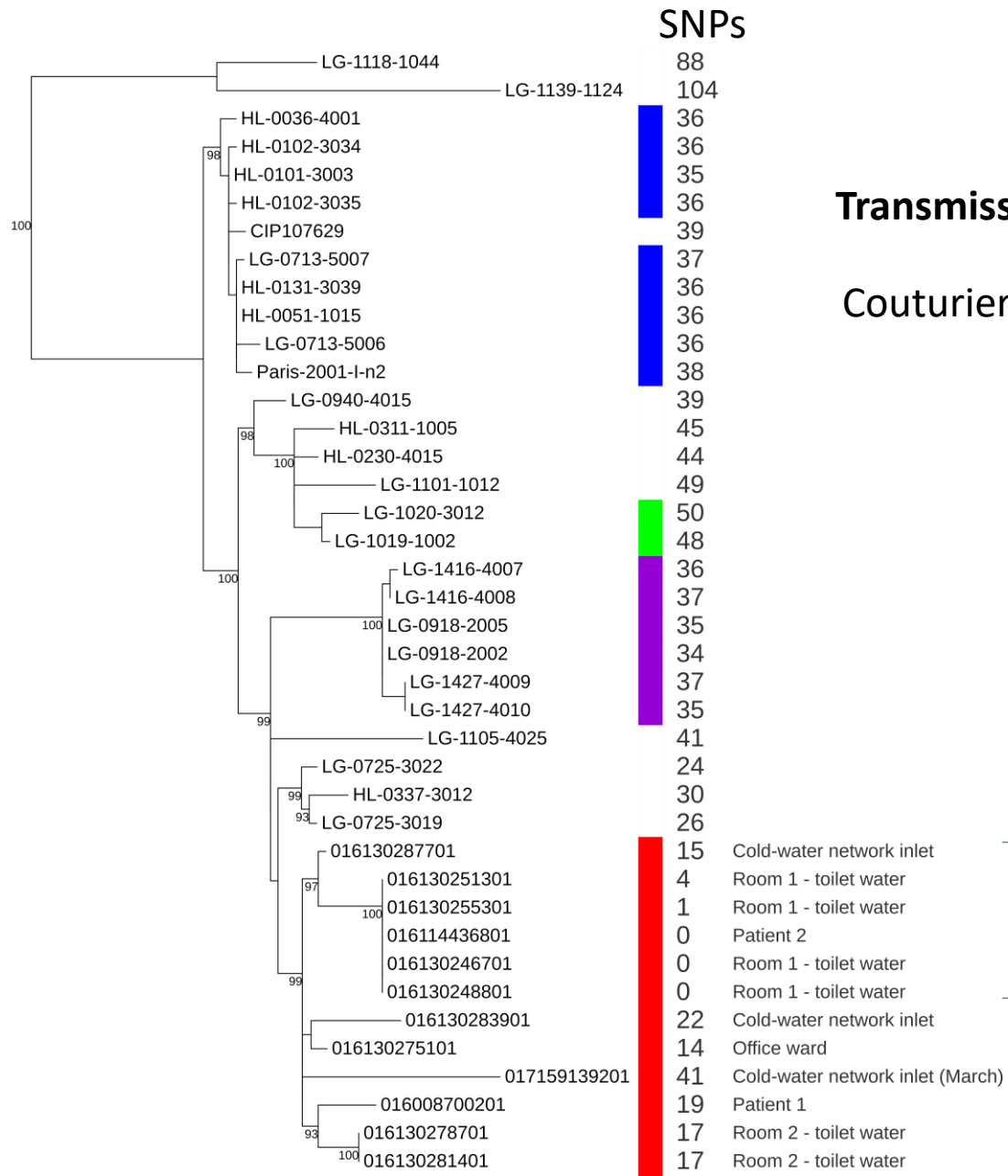
- analyse phylogéographique (SNPs) : 229 ST1
- hôpitaux 17 pays
- cas nosocomiaux et communautaires
- Diversité au sein d'un même hôpital : micro-evolution service dépendant
- WGS permet de soutenir une origine nosocomiale
- Mais niveau de "soutien" depend de l'importance de l'échantillonnage
- les hôpitaux ont étéensemencés par Lp1 ST1 via une propagation locale et internationale.



Tree scale: 0.01



Souches ST1



# Transmission of Legionnaires' Disease through Toilet Flushing

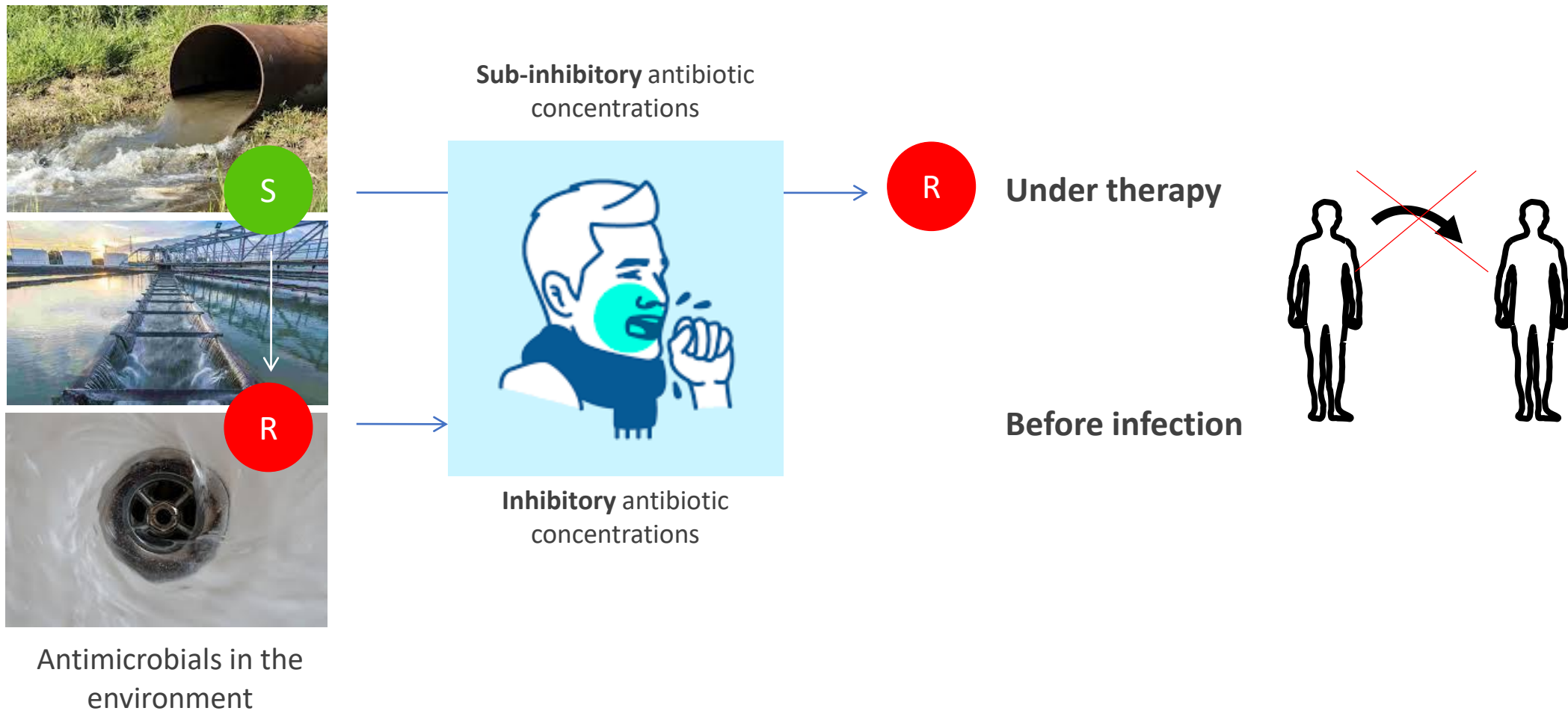
Couturier Jeanne et al. EID 2020



- Cold-water network inlet
- Room 1 - toilet water
- Room 1 - toilet water
- Patient 2
- Room 1 - toilet water
- Room 1 - toilet water
- Room 1 - toilet water
- Cold-water network inlet
- Office ward
- Cold-water network inlet (March)
- Patient 1
- Room 2 - toilet water
- Room 2 - toilet water

Résistance de *Legionella* aux antibiotiques ?

# Hypothèses sur l'acquisition de résistance ?



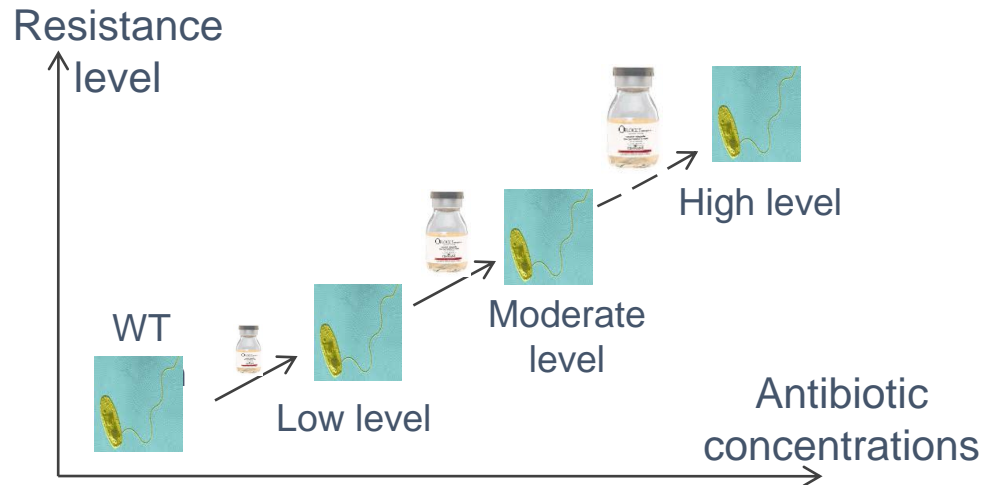
# Résistance de *Legionella* aux antibiotiques ?

## Sélection de mutants résistants experimental *in vitro*

- très facile
- → de haut niveau

CMI

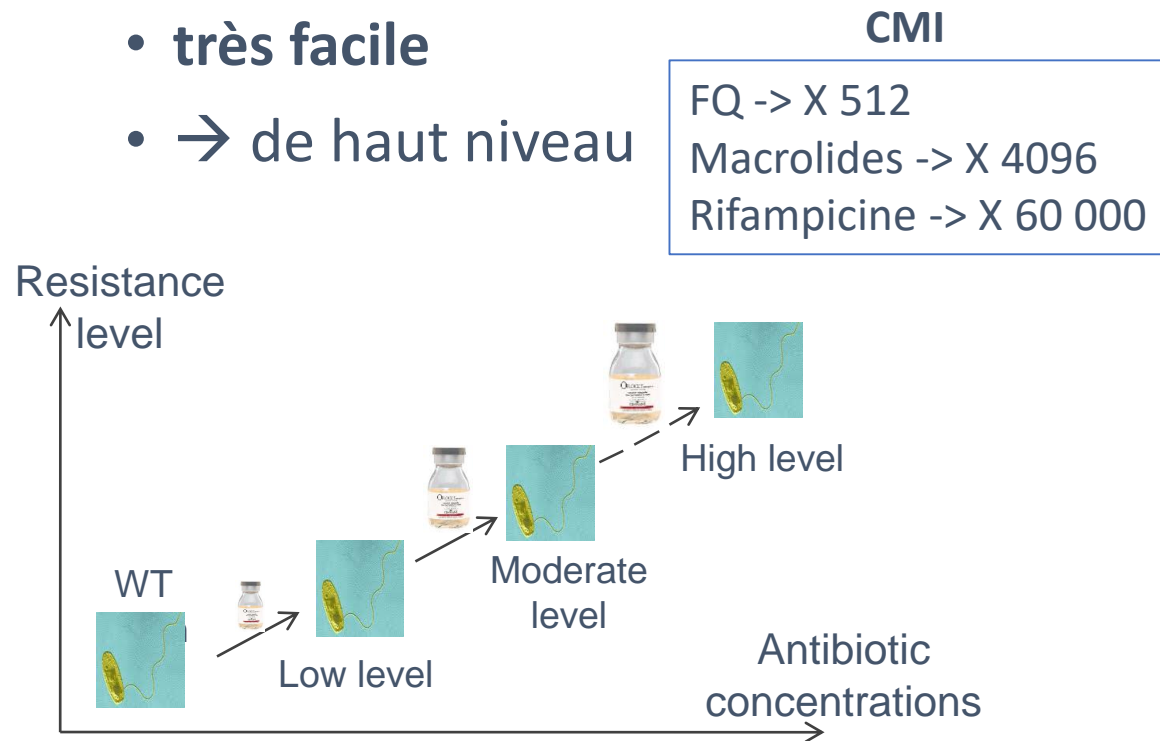
FQ -> X 512  
Macrolides -> X 4096  
Rifampicine -> X 60 000



# Résistance de *Legionella* aux antibiotiques ?

## Sélection de mutants résistants experimental *in vitro*

- très facile
- → de haut niveau



## Mécanismes

- Fluoroquinolones<sup>1,2,6</sup>
  - *gyrA*, *gyrB*, *parC*
- Macrolides<sup>1,3</sup>
  - 23S rRNA, *rpID* (L4), *rpIV* (L22)
- Rifampicine<sup>1,4,5</sup>
  - *rpoB*

# Détection chez les patients ? dans l'environnement ?

## ISOLATS

### Acquisition “naturelle” de résistance ?

- dans le monde :
  - **1 seul** isolat clinique résistant à bas niveau aux **fluoroquinolones**
  - mutation de *gyrA*<sup>1</sup>
  - Pas d'isolats environnementaux

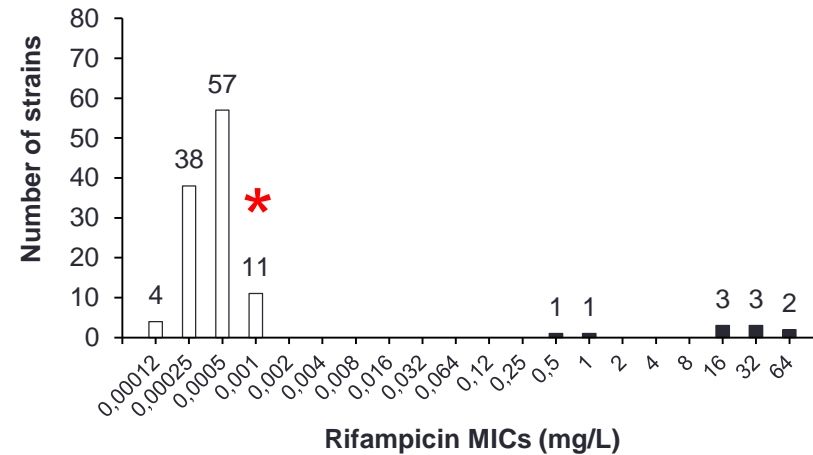
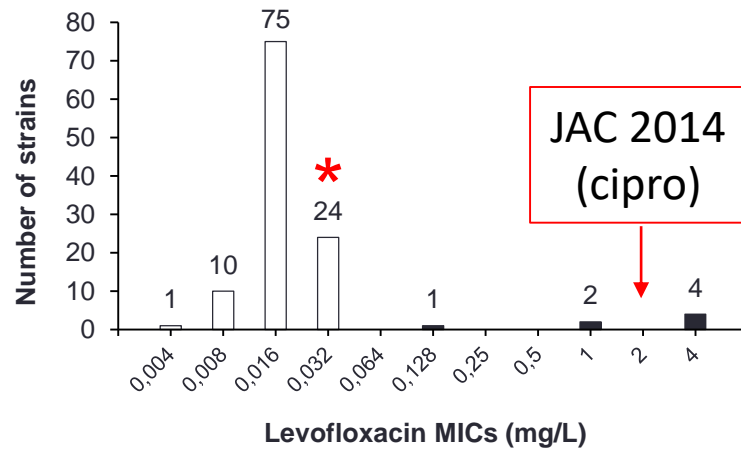
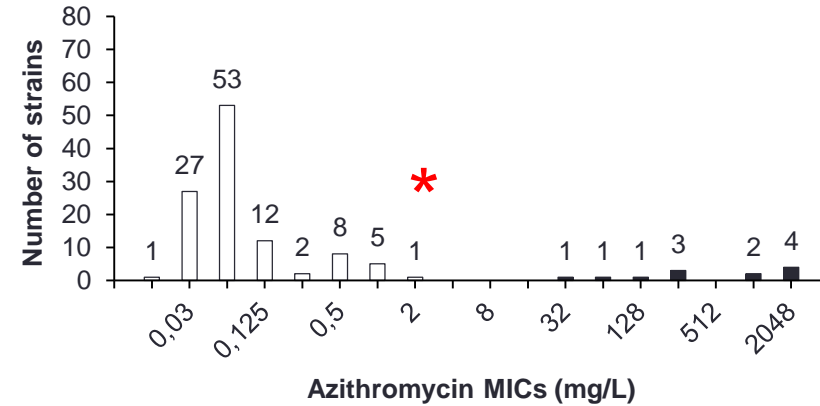
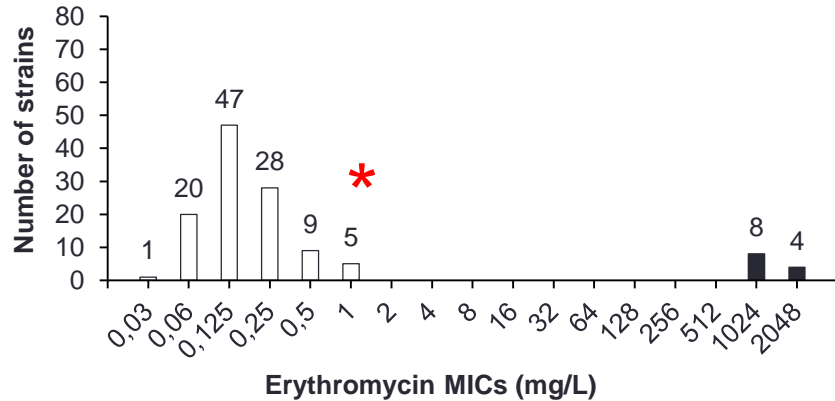
### Méthodes de detection ? (phénotypiques)

- besoin de standardization européenne<sup>2</sup>
- Etest sur BCYE : non recommandé
- **CMI en milieu liquide**
  - Nouvelles recommandations EUCAST (groupe ESGLI)

<sup>1</sup> Bruin *et al.* JAC 2014

<sup>2</sup> Portal, Descours *et al.* JAC 2021

# Distribution des CMI : WT vs résistants sélectionnés *in vitro*

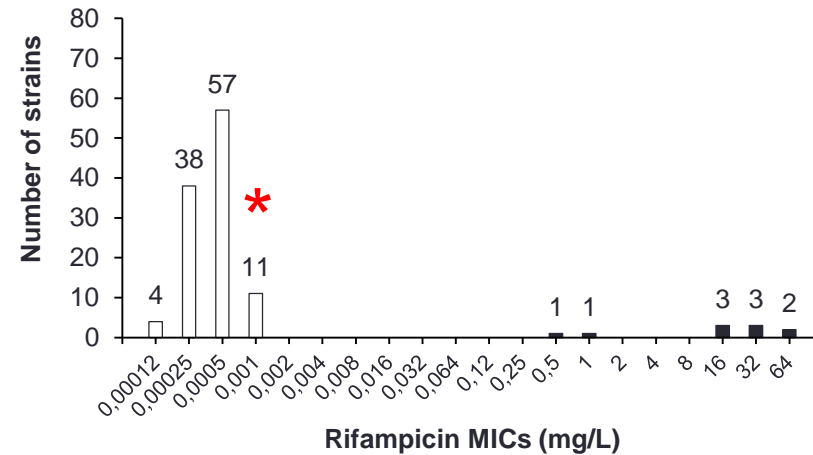
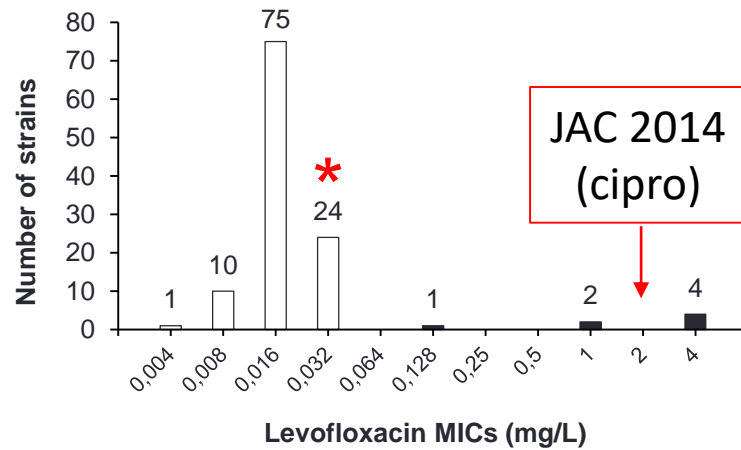
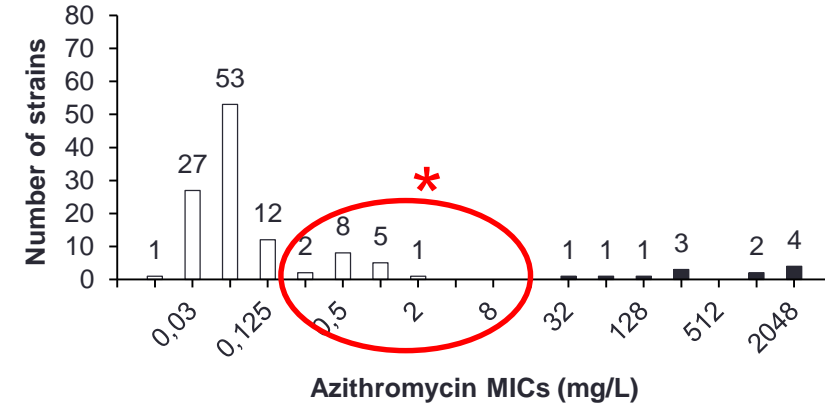
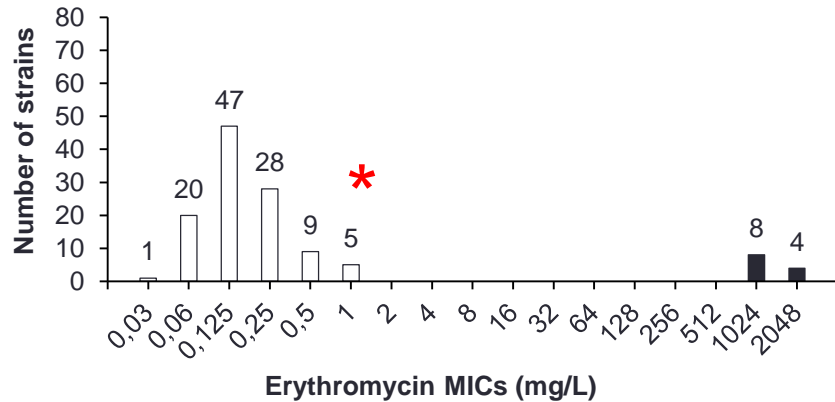


- 109 *L. pneumophila* clinical strains
- Antibiotic resistant strains selected *in vitro*

\* Epidemiological cut-off values (ECOFFs)

# Distribution des CMI : WT vs résistants sélectionnés *in vitro*

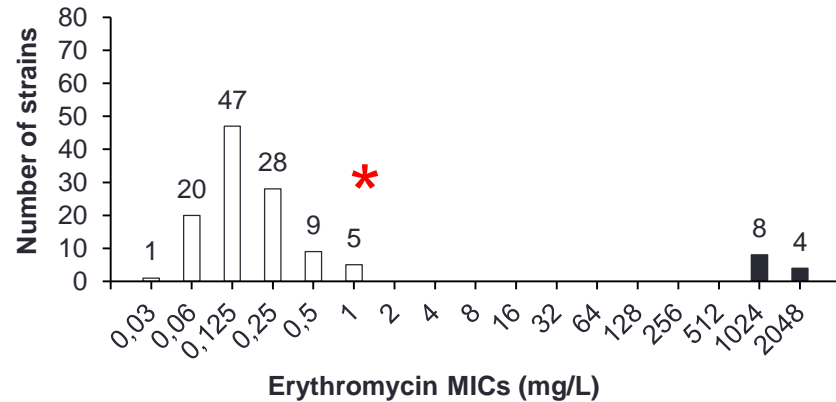
## Distribution bimodale



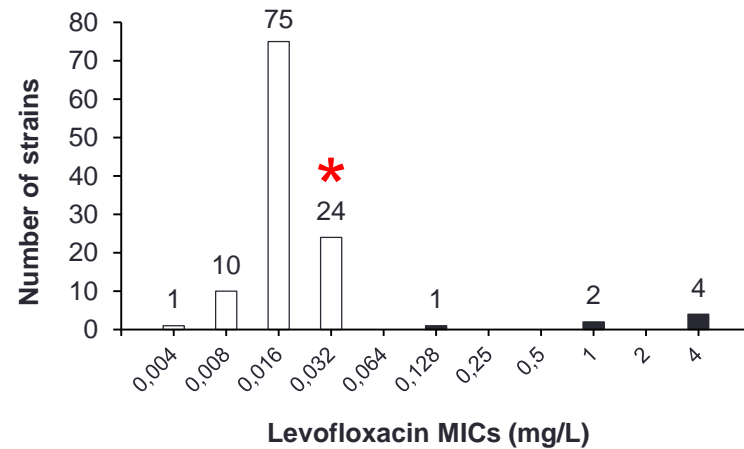
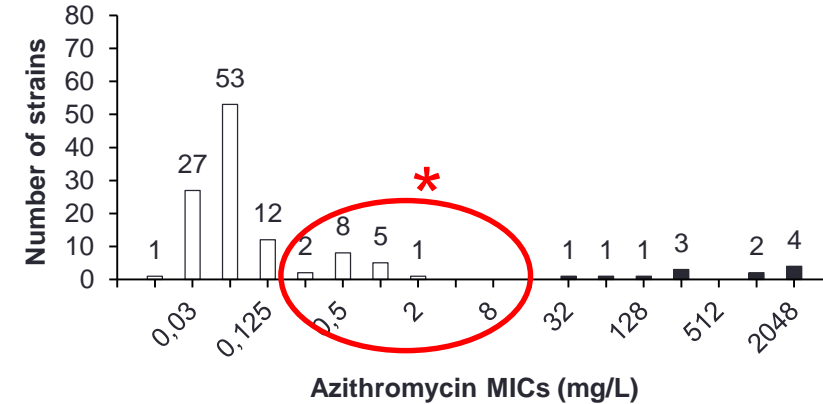
- 109 *L. pneumophila* clinical strains
- Antibiotic resistant strains selected *in vitro*

\* Epidemiological cut-off values (ECOFFs)

# Distribution des CMI : WT vs résistants sélectionnés *in vitro*



## Distribution bimodale



### Sensibilité diminuée

- ✓ Souches avec Pompe à efflux **LpeAB**
- ✓ **surexprimée** à des concentrations subinhibitrices de macrolide
- ✓ **ST1** ou **ST701/259** clusters

Massip *et al.*, JAC, 2017 ; Descours *et al.* AAC 2017

- 109 *L. pneumophila* clinical strains
- Antibiotic resistant strains selected *in vitro*

\* Epidemiological cut-off values (ECOFFs)

# Surveillance de la résistance aux antibiotiques basée sur le WGS de *L. pneumophila*

## Workflow

- Illumina WGS *Legionella* isolates
  - 2015-2021: ~3000 isolates
  - 2019-2021: All isolates (clinical, environmental)
- Read mapping on the 7 genes linked to antibiotic resistance (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, 23S rRNA, *rplD* (L4), *rplV* (L22), *rpoB*)
- Variant calling on position related to mutations linked to antibiotic resistance

# Surveillance de la résistance aux antibiotiques basée sur le WGS de *L. pneumophila*

## In 2021

- 8 Lp1 isolates harbor A2052G mutation in 23S rRNA
  - Mutation on the 3 copies of the rRNA
- All Lp1 were isolated from an hotel water network.
- High level of resistance toward macrolides (erythromycin and azithromycin) for the 8 isolates

# Surveillance de la résistance aux antibiotiques basée sur le WGS de *L. pneumophila*

In 2021

- 8 Lp1 isolates harbor A2052G mutation in 23S rRNA
  - Mutation on the 3 copies of the rRNA
- All Lp1 were isolated from an hotel water network.
- High level of resistance toward macrolides (erythromycin and azithromycin) for the 8 isolates



**These 8 strains are the first “naturally” highly resistant *L. pneumophila* ever described worldwide**

# En résumé

## ISOLATS

- ✓ 1 isolat clinique résistant aux fluoroquinolones
- ✓ 1 isolat environnemental (8 d'1 même réseau) résistant aux macrolides

- ✓ Monde entier
- ✓ ++ années de recherche

# En résumé

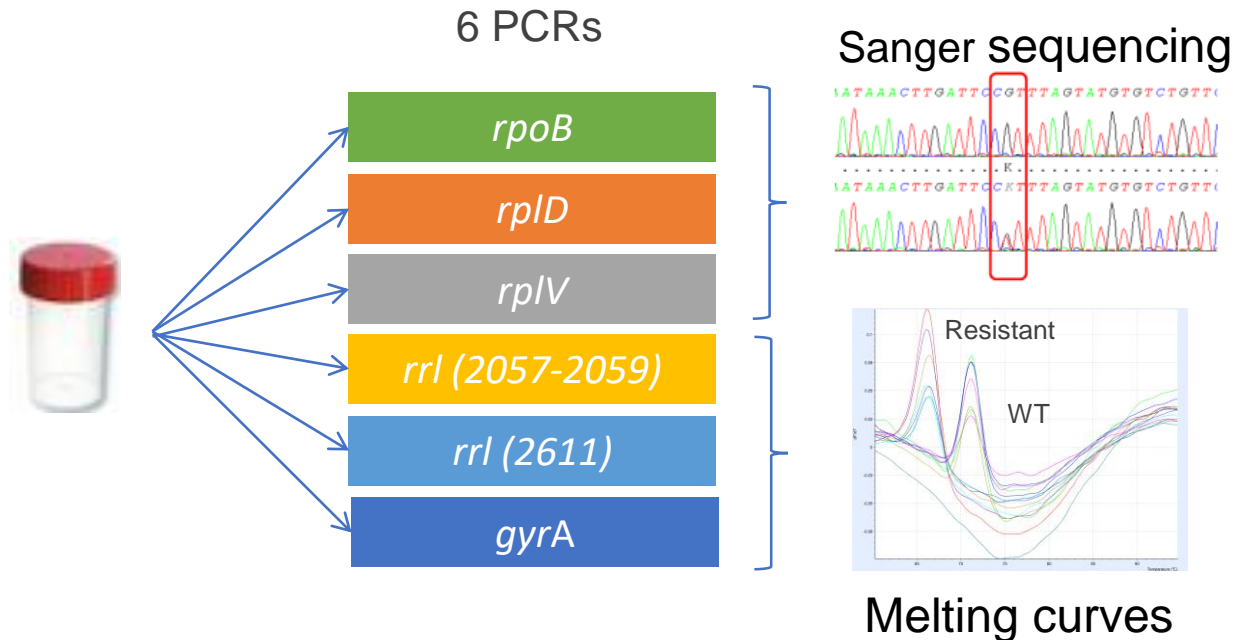
## ISOLATS

- ✓ 1 isolat clinique résistant aux fluoroquinolones
- ✓ 1 isolat environnemental (8 d'1 même réseau) résistant aux macrolides

- ✓ Monde entier
- ✓ ++ années de recherche

Sous-estimation de la résistance ? Isolats cliniques disponibles dans  $\approx 25\%$  des cas

A partir d'échantillons pulmonaires ?



ou NGS sur le produit de PCR

# Molecular mechanism of resistance: NGS PCR-based Assay



- 2 cases by NGS of *gyrA* QRDR (Shadoud *et al.*, EBioM., 2015)

	Day of sampling (D0= diagnosis)	% of <i>gyrA</i> 83 mutant alleles
Patient #2	D0	2.9 %
	D4	94 %
Patient #4	D0	1.05 %
	D3	75 %
	D5	85 %



# Conclusion -1

- Incidence des légionelloses associée aux conditions climatiques
- Quel est l'impact direct sur le mode / sources de contamination
- Quel rôle des contaminations à domicile ?
  
- Favoriser la détection de toutes les légionelles → apport de la PCR
- Favoriser la culture : analyses phylogénétiques

# Conclusion -2

- Résistance de *Legionella* aux antibiotiques : exceptionnnelle
- 1 cas résistance quinolones / 1 environnement aux macrolides
- Pas de relation entre évolution péjorative et résistance aux antibiotiques
- Nécessité de surveillance +++
  - Apport du whole genome sequencing
  - Apport de méthode standardisée en microdilution
  - Étude directement sur prélèvement (en absence de souches)

# Remerciements



**Christine CAMPESE**



**Ghislaine DESCOURS**

**Christophe GINEVRA**

Laetitia BERAUD

Camille ALLAM

Joëlle CHASTANG

Noémie FESSY

Lucie CHAVEROT

Marielle SIFFERT

Isabelle ROYET

Jérémy REBOULET

Aurélie MARIE



Clémence MASSIP

...