

SP15 –Session SFM

La légionelle dans tous ses états

Intérêt du suivi des points d'eau par PCR

Mercredi 6 octobre 2021

XXXIème Congrès National de la SF2H

Dr C. LAWRENCE

PH hygiène

GHU Paris-Saclay, Hôpital R. Poincaré, APHP

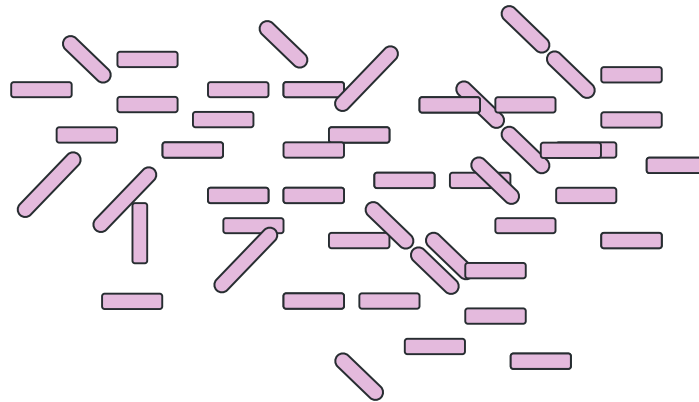
- Aucun

■ 1976 Philadelphie

- ▶ épidémie de pneumonies aiguës chez des vétérans de l'American Legion (182 malades, 29 décès)
- ▶ agent causal : *Legionella pneumophila*



bacilles gram -



**57 espèces
64 sérogroupes**

Legionella pneumophila
15 sérogroupes

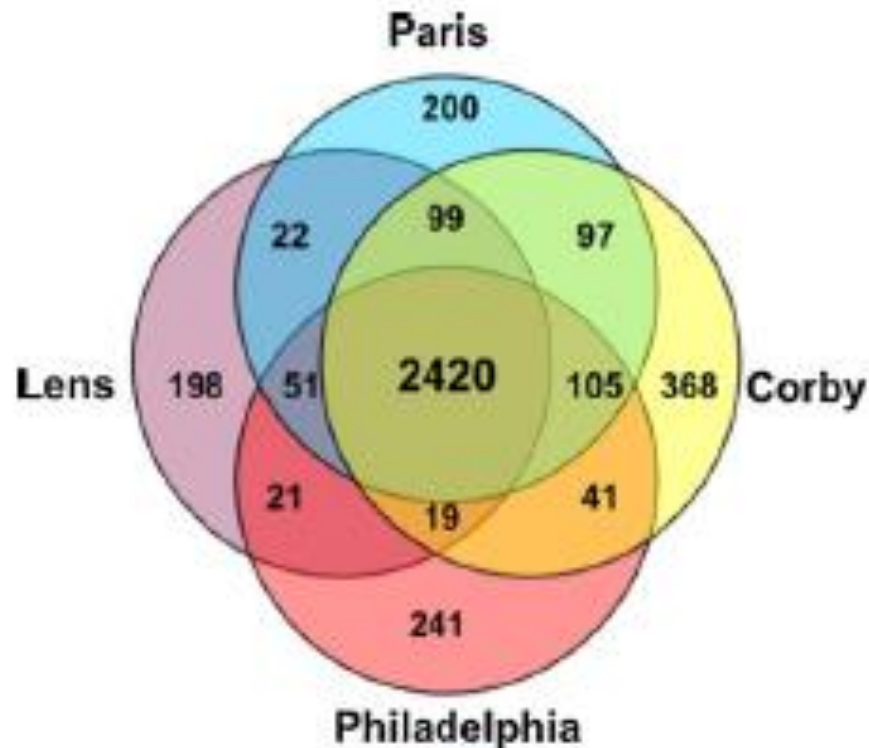
autres espèces

environnement

- toutes isolées au moins 1 fois
- Lp 1 : 30 %

homme

- 20 espèces isolées chez l'homme
 - *L. pneumophila* 98% des cas
 - *L. pneumophila* séroroupe 1 : 90% des cas
 - 2^{ème} espèce : *L. longbeachae*



Construction Puce à ADN avec plus de 500 sondes

- Gènes communs
- Gènes spécifiques
- Gènes de virulence
- Gènes du LPS

Fig. 2. Diagram showing the core genome and the unique gene complement of strains *L. pneumophila* Paris, Lens, Philadelphia and Corby. Orthologous genes were defined by reciprocal best-match FASTA comparisons. The threshold was set to a minimum of 80% sequence identity and a ratio of the length of 0.75–1.33.

Gomez-Valero 2009

■ Les cibles

- ▶ *Legionella* : gène de ARN 16S ou *ssrA*
- ▶ *L. pneumophila* : gène *mip*
- ▶ *L. pneumophila* SG 1 : gène *wzm*

Genes	<i>L. pneumophila</i>		Other species	Occurrence of the genes in <i>Lp</i>	
	Serogroup 1	Other serogroups		Sg1	Non-Sg1
				(total:151)	(total:66)
<i>lpp0814</i>				151	65
<i>hisF</i>				151	52
<i>hisH</i>				151	35
<i>neuA</i>				151	33
<i>neuB</i>				151	66
<i>neuC</i>				151	66
<i>lpp0820</i>				151	65
<i>lpp0821</i>				151	66
<i>rmlC</i>				151	66
<i>rmlD</i>				151	65
<i>rmlB</i>				151	66
<i>gpi</i>				151	66
<i>rmlA</i>				151	66
<i>lpp0827</i>				150	3
<i>wscA</i>				149	4
<i>lpp0830</i>				92	1
<i>lpp0831</i>				150	0
<i>lpp0832</i>				148	0
<i>lpp0833</i>				150	1
<i>lpp0834</i>				123	0
<i>lpp0835</i>				96	0
<i>lpp0836</i>				150	1
<i>wzm</i>				150	0
<i>mcc</i>				150	0
<i>lpp0839</i>				128	1
<i>lag-1</i>				94	0
<i>lpp0842</i>				150	3
<i>lpp0843</i>				150	3

Cazalet 2008

■ Des PCR ont été développées

- ▶ Bonne sensibilité (>86%)
- ▶ Bonne spécificité (>95%)
- ▶ Séquençage

- 3/5 et 2/2 = vrais positifs

TABLE 2. Results of samples tested by PCR for the detection of *Legionella*-specific DNA in patients with or without LD

Finding	No. of samples (n = 149) ^a			
	16S rRNA PCR		mip PCR	
	Positive	Negative	Positive	Negative
LD positive (n = 37)	32	5	34	3
LD negative (n = 112)	5	107	2	110

^a Samples were tested for *Legionella* sp. DNA in a 16S rRNA-based PCR and in an *mip* gene-based PCR. Estimated sensitivity, specificity, and overall percent agreement values of 86% (32 of 37; 95% CI = 72 to 95%), 95% (107 of 112; 95% CI = 90 to 98%), and 93% (139 of 149), respectively, were found for the 16S rRNA-based PCR and corresponding values of 92% (34 of 37; 95% CI = 78 to 98%), 98% (110 of 112; 95% CI = 93 to 100%), and 97% (144 of 149), respectively, were found for the *mip* gene-based PCR.

Diederer et al JCM2008

■ tests rapides unitaires ou multiplex en expansion

- PCR multiplex (Benitez JCM 2013)
- Biofire® / Genmark®... : PCR Syndromiques

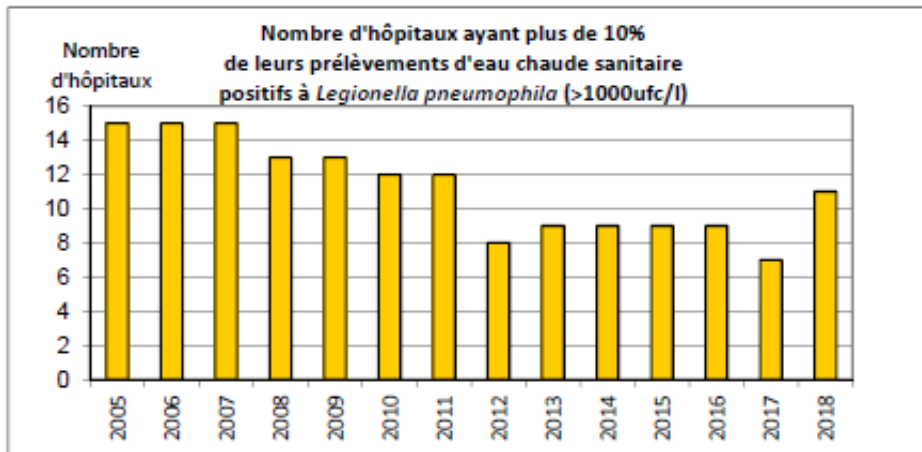
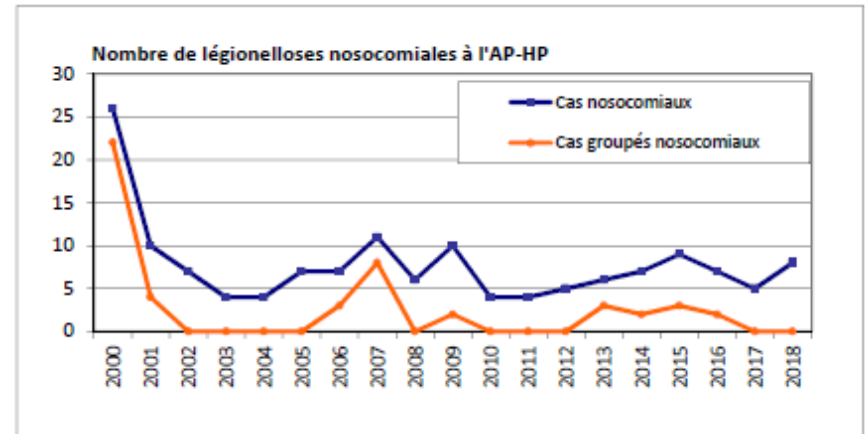
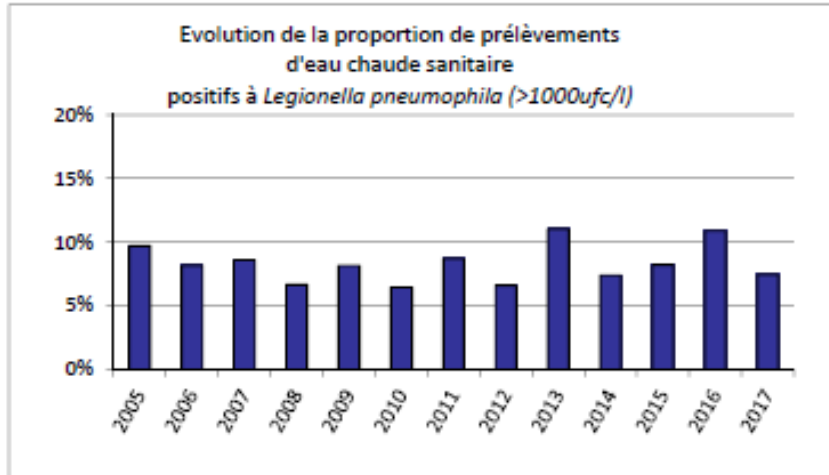
- Réseaux d'eau complexes
- Points d'eau dans presque chaque pièce
- Nombreux points de faible usage
 - ▶ Hygiène des mains
 - ▶ Modification destination locaux
- Patients immunodéprimés



- **Obligation de surveillance températures et légionelles dans ECS des établissements de santé (et autres établissements)**

- **Seuils d'action**
 - ▶ >1000 UFC/L *L. pneumophila*
 - ▶ < seuil de détection pour les patients particulièrement vulnérables définis par le CLIN

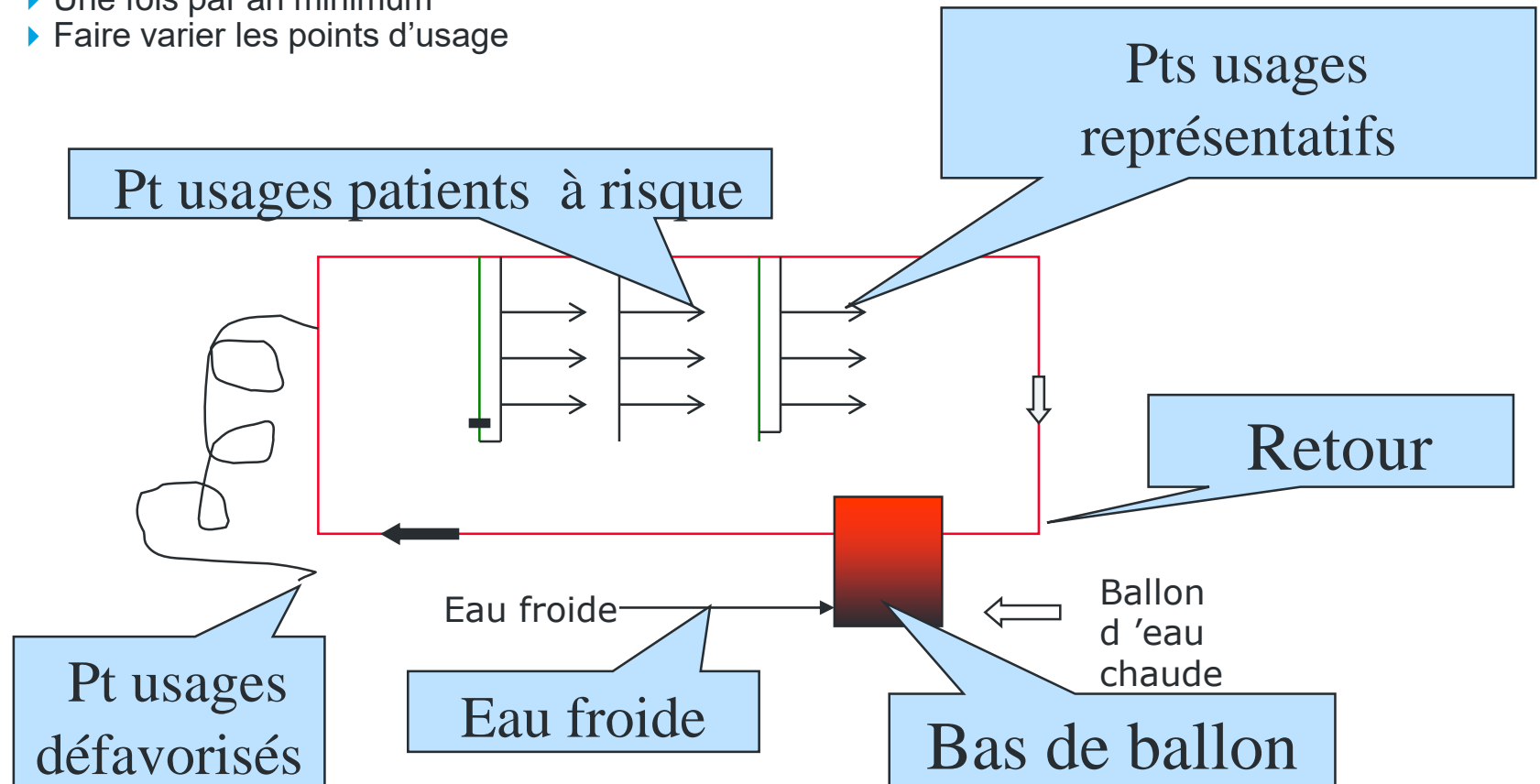
- **Accréditation COFRAC des laboratoires**
 - ▶ Analyse selon norme T90-431



2018 : 8 cas de légionellose nosocomiale à l'APHP

■ Pour chaque réseau d'eau chaude hospitalier

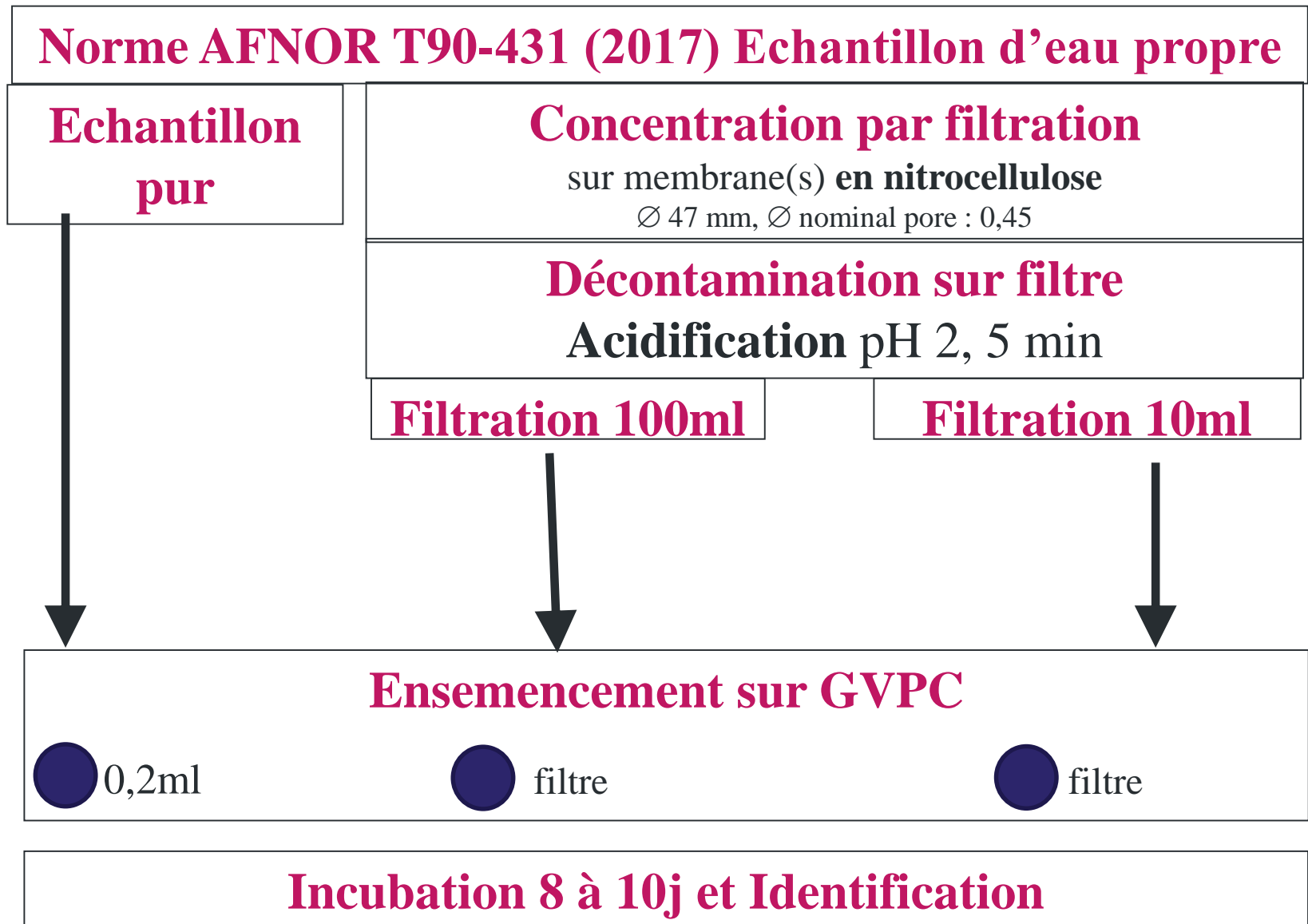
- ▶ Une fois par an minimum
- ▶ Faire varier les points d'usage



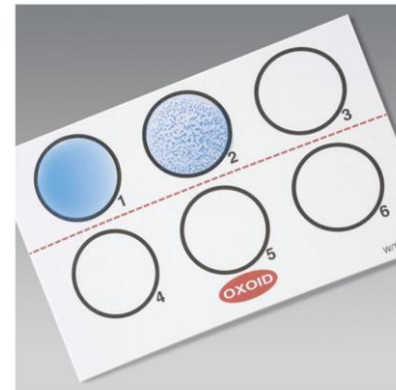
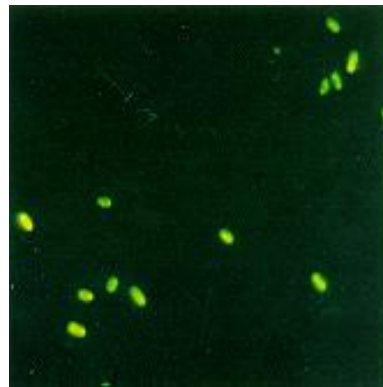
Circulaire n°2002/243 du 22 avril 2002

- Ensemencement direct de l'échantillon en milieu sélectif
- Concentration
 - ▶ Eaux propres : concentration en membrane en nitrate (ou ester) de cellulose et décontamination par traitement acide





Identification *Legionella* caractères cultureux et immunologiques



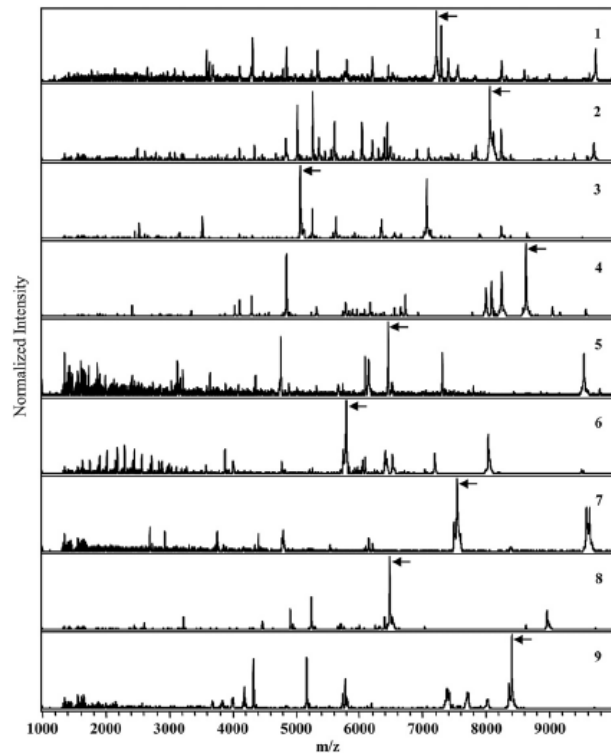


Figure 2. MALDI-TOF mass spectra obtained from nine ATCC strains of *Legionella* species. The samples in lanes 1-9 were nine ATCC type strains. Lane 1, *L. pneumophila*; lane 2, *L. anisa*; lane 3, *L. bozemanii*; lane 4, *L. dumoffii*; lane 5, *L. feeleii*; lane 6, *L. gormanii*; lane 7, *L. jordanis*; lane 8, *L. longbeachae*; and lane 9, *L. micdadei*. The most intense signals of each strain are indicated by arrows.

Identification au niveau de l'espèce après extraction :

Pas prévu dans la norme T90-431

Fujinami 2010

■ Rendement dépend

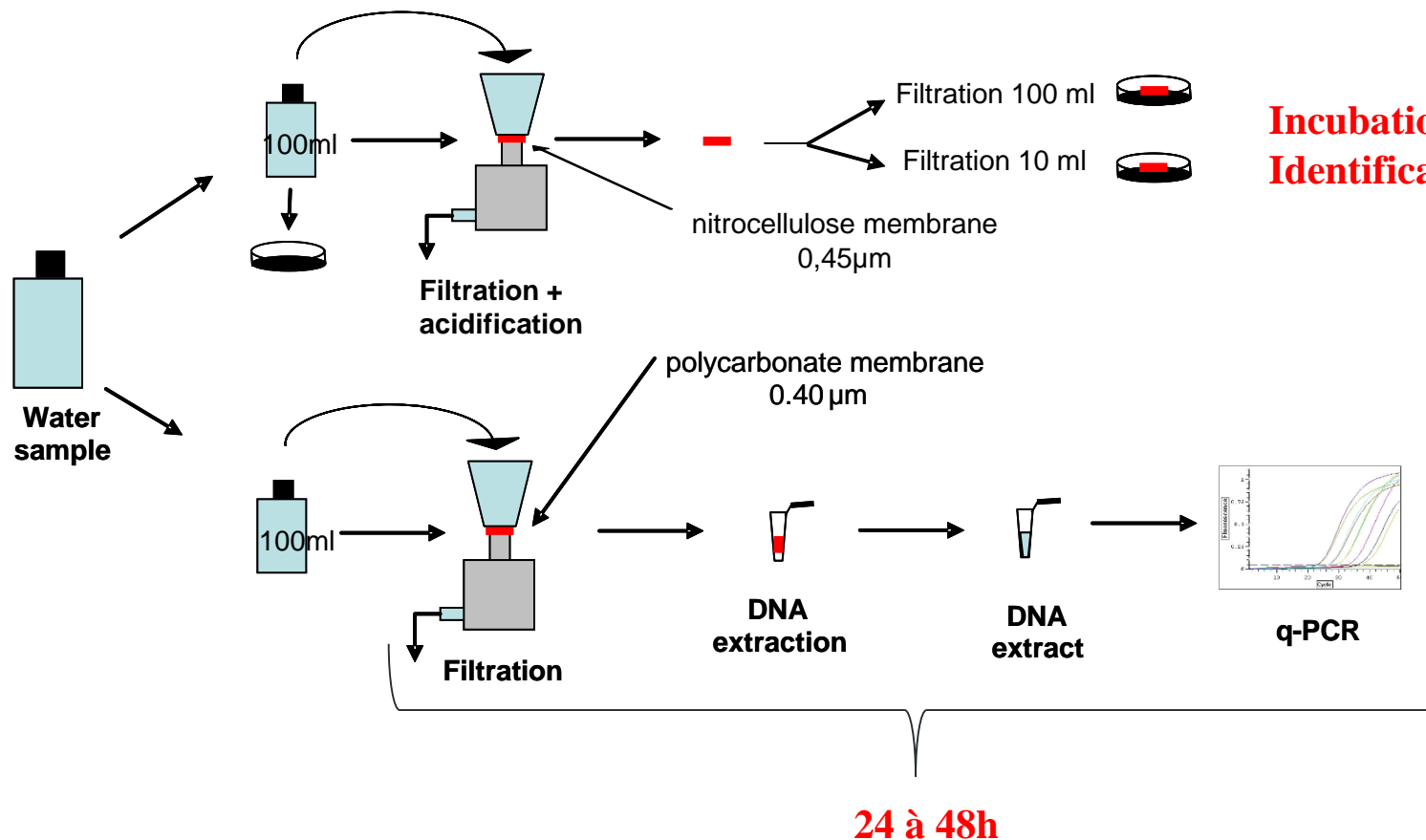
- ▶ du niveau de contamination (rendement meilleur pour ensemencement direct)
- ▶ de la présence ou non d'une flore interférente

■ Absence de mise en évidence des bactéries "stressées" ou non cultivables sur milieu gélosé (VBNC)

■ Inversement, un technicien peu entraîné peut surestimer le nombre de colonies de légionelles en comptant des colonies d'autres espèces bactériennes.



Incubation 10j
Identification



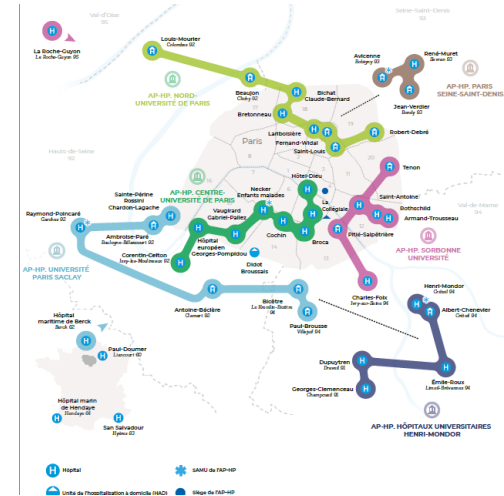
Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples^{▽†}

N. Mérault,^{1,2} C. Rusniok,¹ S. Jarraud,³ L. Gomez-Valero,¹ C. Cazalet,¹ M. Marin,¹ E. Brachet,¹ P. Aegerter,⁴ J. L. Gaillard,² J. Etienne,³ J. L. Herrmann,² the DELPH-I Study Group,[‡] C. Lawrence,^{2*} and C. Buchrieser^{1*}

Echantillonnage des prélèvements d'ECS

► 209 prélèvements provenant de 14 hôpitaux de l'AP-HP

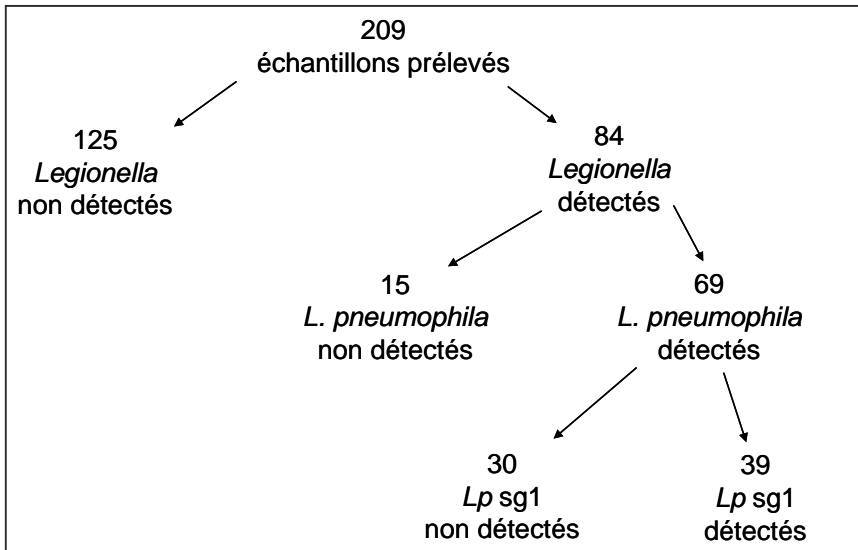
- 20 bâtiments choisis selon un plan d'échantillonnage (établi par un questionnaire envoyé aux hôpitaux participants)
 - Bâtiments contaminés ou non, chlorés ou non, récents ou vétustes...
- 10 prélèvements par bâtiment
 - 3 points d'usage représentatifs, 4 défavorisés, départ et retour de boucle, et un point d'eau froide



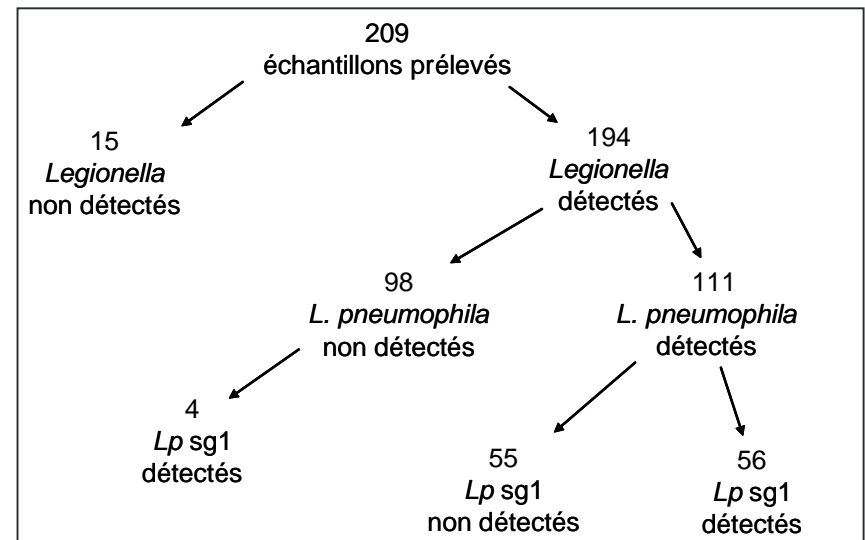
culture (méthode AFNOR T90-431 2003)
 kit Biorad qPCR *Legionella sp.*
 kit Biorad qPCR *L. pneumophila* (tous Sg)
 qPCR *Lp Sg1* maison

4 bât. indemnes en PCR *Lp*
 8 bât. indemnes en PCR *Lp1*

Résultats par culture



Résultats par qPCR



(% de plt positifs)	culture	qPCR
<i>Legionella sp.</i>	40 %	93 %
<i>L. pneumophila</i>	33 %	53 %
<i>L. pneumo sg1</i>	19 %	29 %

6 faux-neg PCR *Lp*
 6 faux-neg PCR *Lp1*

ORIGINAL ARTICLE

Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples

S. Collins^{1,2}, F. Jorgensen², C. Willis² and J. Walker¹

- Technique maison
- Essais de reproductibilité, inclusivité, exclusivité
- Comparaison à culture selon ISO11731 (1998)

Table 3 Comparison of the detection of *Legionella* spp. (*ssrA*), *Legionella pneumophila* (*mip*) and *Leg. pneumophila* *sg1* (*wzm*) by qPCR relative to culture

	qPCR	Culture +	Culture –
<i>Legionella</i> spp. (<i>ssrA</i>)	+	38	62
	–	0	100
<i>Leg. pneumophila</i> (<i>mip</i>)	+	31	13
	–	0	156
<i>Leg. pneumophila</i> <i>sg1</i> (<i>wzm</i>)	+	16	3
	–	0	25

Culture and PCR positive (+) results are those >LOQ, whereas culture and qPCR-negative (–) results are those <LOQ. Results for *Leg. pneumophila* *sg1* are for the 44 samples positive by *mip* PCR only.

L. pneumophila SG1 en fonction du type d'eau

TABLE 8. Distribution of positive *L. pneumophila* Sg1 water samples (by culture or qPCR) with respect to building and sample characteristics

Characteristic	Total no. of samples	Positive samples				P (culture vs qPCR) ^a	No. (%) of samples positive by Sg1-qPCR but negative by Sg1 culture
		By Sg1 culture		By Sg1-qPCR			
		No. (%)	P ^b	No. (%)	P ^b		
Size of the building							
Principal	109	20 (18)	NS	31 (28)	NS	0.02	14 (13)
Secondary	100	19 (19)		29 (29)			13 (13)
Age of the water supply system							
>30 yr	109	20 (18)	NS	31 (28)	NS	0.02	15 (14)
<30 yr	100	19 (19)		29 (29)			12 (12)
Production of hot water							
Instantaneous	149	30 (20)	NS	47 (32)	NS	0.02	21 (14)
Storage	60	9 (15)		13 (22)			6 (10)
Type of sample							
Hot water							
Representative	65	9 (14)	NS	21 (32)	NS	0.01	13 (20)
Disadvantaged	81	19 (23)		25 (31)			9 (11)
Outset	21	1 (5)		4 (19)			3 (14)
Return loop	21	5 (24)		6 (29)			2 (10)
Cold water							
	21	5 (24)		4 (19)			0 (0)
Temp							
>23°C and <55°C	129	28 (22)	NS	37 (29)	NS	<0.01	13 (10)
<23°C or >55°C	80	11 (14)		23 (29)			14 (18)
Chlorination							
Yes	108	27 (25)	<0.01	43 (40)	<0.01	<0.01	20 (19)
No	101	12 (12)		17 (17)			7 (7)

^a Determined by the chi-square test. NS, not significant.

^b Determined by a stratified McNemar test.

Mérault et al, 2011

Essais de corrélation PCR/ culture

■ Pas de normes réglementaires pour la PCR en France

- ▶ Propositions avis de l'ANSES – rapport d'expertise collective non retenues (avril 2011)

■ Collins 2015

- ▶ Très faible corrélation linéaire

➡ Pas de seuil d'action pour la PCR

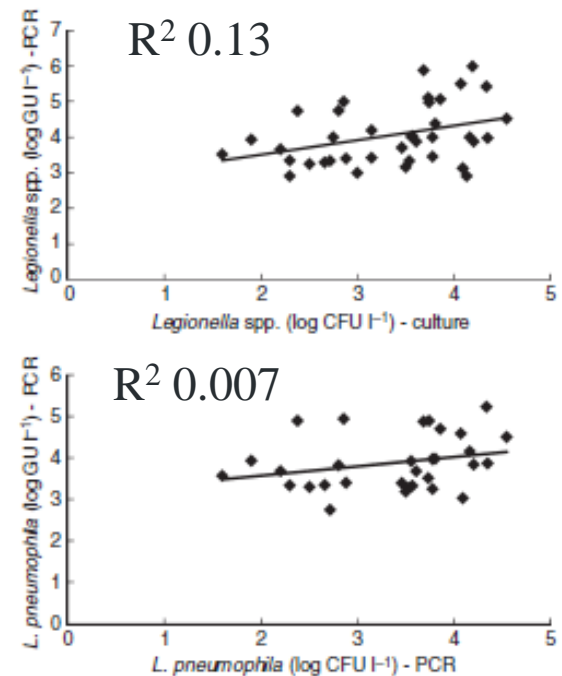


Figure 2 Comparison of *Legionella* culture and qPCR results (*ssrA* and *mip* genes) for 200 water samples. Only pairs of results with readings above the quantification limit of culture and qPCR are shown (for *ssrA* $n = 38$, for *mip* $n = 31$). Low R^2 values (0.13 and 0.07 for *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* respectively) indicate very weak linear correlation between culture and qPCR. For the comparison of culture vs *Leg. pneumophila* (*mip*) qPCR, samples yielding non-*Leg. pneumophila* legionellae by culture have been omitted.

■ ADN bactéries mortes

- ▶ Ethidium monoazide (EMA) ou Propidium monoazide (PMA) (*Inoue et al 2014*)
 - *Pénétration dans les cellules mortes + traitement UV*
- ▶ traitement enzymatique :
 - *destruction ADN libre (Biorad)*
- ▶ RT PCR (*Boss et al 2018*)
 - *Détection ARNm produit par cellules vivantes*

■ Faut-il vraiment s'affranchir de cette information?



Article

Comparison of Updated Methods for *Legionella* Detection in Environmental Water Samples



Daniela Toplitsch , Sabine Platzer, Romana Zehner, Stephanie Maitz, Franz Mascher and Clemens Kittinger 

Table 4. Predictive values of qPCR for *L. pneumophila* and *L. pneumophila* sg 1 culture results, established from the *L. pneumophila* qPCR for the *mip* gene and the *L. pneumophila* sg 1 qPCR for the *wzm* gene, in comparison with the culture for samples with a low and high burden of the accompanying microbial flora.

qPCR	Predictive Value in %			
	Culture		Culture	
	<u>Low Burden of Accompanying Microbial Flora (n = 46)</u>	<u>High Burden of Accompanying Microbial Flora (n = 18)</u>	<u>Low Burden of Accompanying Microbial Flora (n = 46)</u>	<u>High Burden of Accompanying Microbial Flora (n = 18)</u>
	PPV ¹	NPV ²	PPV ¹	NPV ²
<i>Legionella pneumophila</i> (<i>mip</i>)	75.00	82.22	40.00	100.00
<i>Legionella pneumophila</i> sg1 (<i>wzm</i>)	not predictable	100.00	17.00	100.00

¹ Positive Predictive Value; ² Negative Predictive Value.

Int. J. Environ. Res. Public Health 2021, 18, 5436. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105436>

FA162903

ISSN 0335-3931

norme française

NF T 90-471

Avril 2010

Indice de classement : T 90-471

ICS : 07.100.20

Qualité de l'eau

**Détection et quantification
des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila*
par concentration et amplification génique
par réaction de polymérisation en chaîne
en temps réel (RT — PCR)**

- Séquences cibles, amorces et sondes libres
- Nécessité d'utiliser une gamme d'étalon externe et calibrée et témoin interne d'amplification, calibrage complexe (raccord étalon primaire)
- Résultats en Unité Génome (UG)
- Liste d'inclusivité : comprend 21 espèces de *Legionella* et les 15 sérogroupes de *L. pneumophila*
- Liste d'exclusivité minimale : 16 espèces non *Legionella*
- ISO/TS 12869: 2012

Avantage / inconvénients

	Avantages	Inconvénients
culture	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode de référence • Accréditation COFRAC • Comparaison souches • Identification des SG 	<ul style="list-style-type: none"> • Longue et complexe • Faible sensibilité pour <i>Legionella non pneumophila</i> • Inhibition par flore interférente • VBNC (Viable but non cultivable) non détectées
PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide (mais reste complexe) • Détection objective • Plus sensible notamment pour <i>Legionella sp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Non reconnue par législation française (Ar. 01/02/2010) • Nécessite appareil PCR temps réel et courbe étalonnage • Risque d'inhibition PCR • Détection de VBNC, bactéries lésées ou mortes • Non corrélée avec la culture

Autres techniques

	Avantages	Inconvénients
culture par la méthode du nombre le plus probable	<ul style="list-style-type: none"> • Facile à mettre en œuvre (pas de filtration) • Obtention souches pour comparaison moléculaire • Bonne spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite scelleuse • Lecture à 7jours • Incubateur
Séparation par billes immuno-magnétiques et détection enzymatique (IMS)	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide • Matériel simple • automatisable 	<ul style="list-style-type: none"> • Nombreuses étapes (concentration par filtration) • Possible détection des VBNC
Immuno-chromatographie	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité faible (concentration par filtration) • Non quantitatif • Spécifique de L. pneumophila SG1

■ Etude du microbiome de l'eau hospitalière

▶ Essai en cours

- 3 bâtiments chlorés
- 2 bâtiments non chlorés

▶ Prélèvements ECS même point d'eau une fois par mois

▶ Impact de facteurs physico-chimiques sur le microbiome

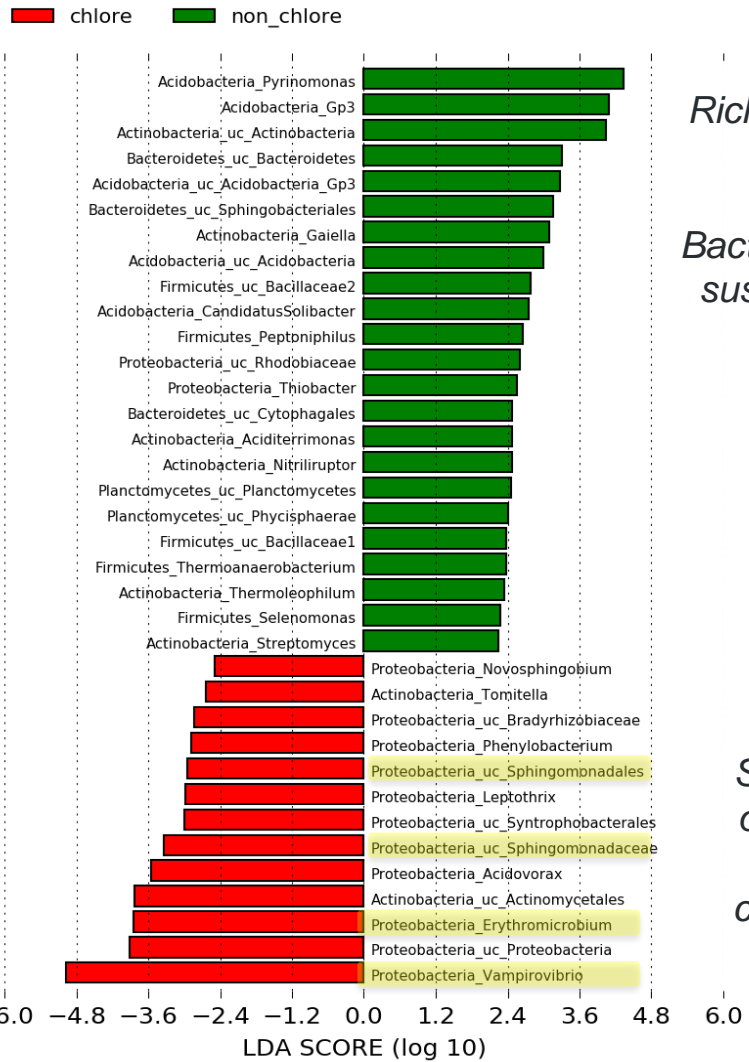


Dr Laura Gomes-Valero
Institut Pasteur

What are these differences in bacterial composition regarding extrachlorination? (RDP)

Gomez-Valero
Unpublished data

The machine learning algorithm LEfSe was used to identify significant taxa associated with the condition studied

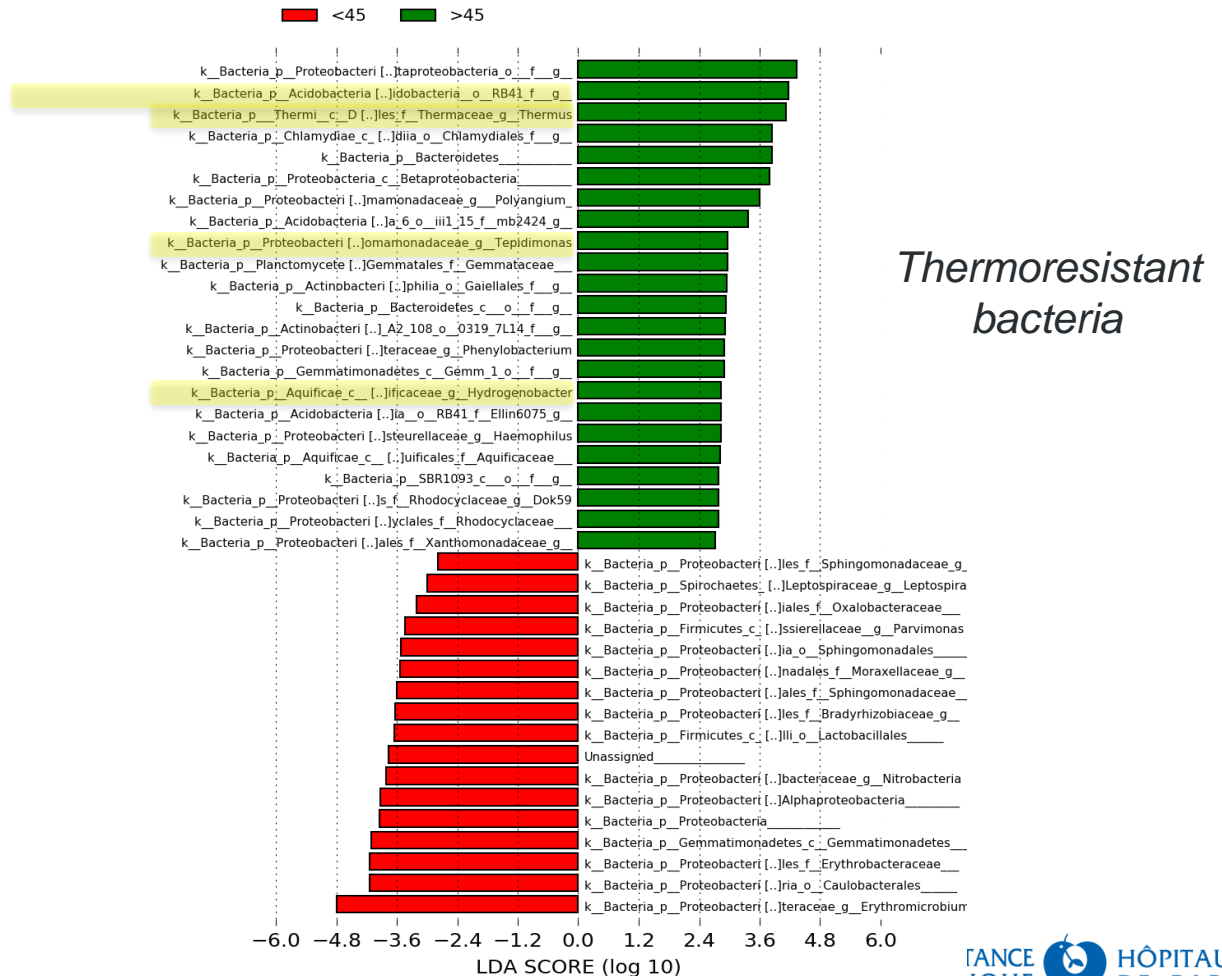


Richer in Acidobacteria, Planctomycetes, Firmicutes and Bacteroidetes → probably susceptible to chlorine disinfection

Richer in proteobacteria as Sphingomonadaceae or Acidovorax known to be resistant to chlorine (Vaz-Moreira et al. 2011)

What are these differences in bacterial composition regarding temperature? (RDP)

Gomez-Valero
Unpublished data



■ 56 souches humaines comparées à des souches environnementales 2019

▶ Profils identiques dans 45 cas

- *ECS 8 hôpitaux, 6 maisons de retraite, 12 domiciles, 10 etab. de tourisme 9 autres etab. accueillant du public*
- *Pas de lien avec TAR*

=> Ne serait pas possible uniquement avec les techniques de PCR

- Meilleure sensibilité : détection des légionelles non cultivables mais aussi ADN de bactéries mortes
- Plus rapide (24 à 48h)
- Utilisation en screening ou sur points sentinelles

Mais

- Pas de réelle corrélation quantitative ($r < 0.5$)
- Pas de seuils réglementaires
- Pas de souches pour comparer à des souches cliniques

Merci de votre écoute