



LE BEH NE PARAÎTRA PAS AU MOIS D'AOÛT, REPRISE LE 2 SEPTEMBRE (les 52 numéros sont publiés grâce aux volumes doubles)

## Caractérisation des souches cliniques et environnementales de *Legionella* en France, 2001-2002

Anne Doléans, Sophie Jarraud, Monique Reyrolle, Gérard Lina, Jérôme Etienne, Jean Freney

Centre national de référence des légionelles, Hôpital Edouard-Herriot, Lyon

### INTRODUCTION

Les légionelles sont responsables de pneumonies communautaires ou nosocomiales résultant de l'inhalation d'aérosols contaminés. Elles colonisent plus de 50 % des réseaux de distribution d'eau à usage sanitaire mais le taux d'attaque de la forme la plus classique de la maladie est faible (0,1 à 5 %) [1]. Les légionelles représentent un ensemble d'environ 50 espèces et de 64 sérogroupes. En France, comme dans la majorité des pays, l'espèce responsable de plus de 90 % des légionelloses est *Legionella pneumophila* et le sérotype 1 est retrouvé dans plus de 80 % des cas [1]. Peu de données de la littérature précisent la répartition en terme d'espèces et de sérogroupes des légionelles dans l'environnement. Afin de vérifier si la forte proportion de cas de légionellose à *L. pneumophila* sérotype 1 est en partie le reflet d'une prédominance environnementale de ces souches, nous avons comparé la répartition des espèces de légionelles présentes dans les réseaux de distribution d'eau français avec celles responsables de cas de légionellose.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans le cadre d'une surveillance épidémiologique nationale, le Centre national de référence des légionelles (CNRL) de Lyon recueille de manière exhaustive les souches d'origine humaine isolées en France. Entre le 28 juin 2001 et le 28 décembre 2002, 259 souches cliniques isolées dans 57 départements français ont été répertoriées.

Cette distribution a été comparée avec celle de deux collections de souches environnementales. La première collection était constituée de 2 747 souches environnementales isolées entre le 28 juin 2001 et le 28 décembre 2002 dans 66 départements français et envoyées au CNRL pour identification précise de l'espèce et du sérotype. La seconde consistait en 381 souches isolées de 554 échantillons d'eau analysés entre le 1<sup>er</sup> janvier 2001 et le 30 juin 2002 par le CNRL dans le cadre de la surveillance des réseaux d'eau et des tours aéro-réfrigérantes. Ces prélèvements ont été effectués au niveau de différents établissements et de différents points de prélèvements. Ils provenaient de quatre départements (Rhône, Ardèche, Savoie et Hérault) ; 52 % de ces prélèvements contenaient des légionelles.

Les prélèvements d'eau ont été analysés selon la norme ISO 11-731. Les souches ont été identifiées par méthode d'immunofluorescence directe à l'aide d'immun-sérums polyclonaux de lapin produits par le CNRL. Les souches *Legionella* non *pneumophila* présentant des réactions croisées en immunofluorescence ont été identifiées par la technique de « Random Amplified Polymorphic DNA » (RAPD) [2] ou par séquençage du gène *mip* [3].

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL.) (test statistique du  $\chi^2$ , résultats significatifs pour une valeur de *p* inférieure à 0,05).

Tableau 1

Comparaison de la répartition des 259 souches cliniques et des 2 747 souches environnementales de légionelles reçues au CNRL, 2001-2002

Espèces, sérogroupes	Souches cliniques (%)	Souches environnementales (%)	Test statistique ( $\chi^2$ , <i>p</i> < 0,05)	OR <sup>3</sup>
<i>L. pneumophila</i>	256 (99)	2 073 (75)	NC	NC
1	247 (95)	776 (28)	<i>p</i> < 0,05	52,63 (29,1-93,8)
2	1 (<1)	64 (2)	<i>p</i> < 0,05	0,16 (0,02-1,17)
3	3 (1)	296 (11)	<i>p</i> < 0,05	0,10 (0,03-0,30)
5	0	38 (1)	NS	NC
6	2 (1)	305 (11)	<i>p</i> < 0,05	0,06 (0,01-0,25)
8	0	79 (3)	<i>p</i> < 0,05	NC
Sérotype multiple <sup>1</sup>	3 (1)	436 (16)	<i>p</i> < 0,05	0,06 (0,02-0,19)
<i>L. anisa</i>	2 (1)	378 (14)	<i>p</i> < 0,05	0,05 (0,01-0,19)
<i>L. taurinensis</i>	0	78 (3)	<i>p</i> < 0,05	NC
<i>L. erythra</i>	0	42 (1)	<i>p</i> < 0,05	NC
<i>L. rubrilucens</i>	0	32 (1)	NS	NC
Autres <sup>2</sup>	0	183 (7)	NC	NC
<i>L. spp</i> <sup>4</sup>	1 (<1)	40 (1,5)	NC	NC
TOTAL	259 (100)	2 747 (100)	NC	NC

<sup>1</sup> *L. pneumophila* sérotype multiple : sérotype non identifié en raison de réactions croisées en immunofluorescence directe entre les différents sérotypes de légionelles. Pour les souches cliniques, on retrouve des *L. pneumophila* sérotype 3-6.

<sup>2</sup> Ces autres légionelles sont *L. pneumophila* sérotype 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 (79 souches), *L. bozemanii* (1 souche), *L. brunensis* (1 souche), *L. dumoffii* (16 souches), *L. feeleii* (9 souches), *L. geestiana* (2 souches), *L. gormanii* (14 souches), *L. jordanis* (4 souches), *L. londinensis* (13 souches), *L. maceacherni* (8 souches), *L. micdadei* (16 souches), *L. moravica* (3 souches), *L. oakridgensis* (9 souches), *L. quinlivanii* (4 souches), *L. saintheleis* (3 souches), *L. spiritensis* (1 souche).

<sup>3</sup> OR : Odds-ratio. En parenthèse sont notées les valeurs de l'intervalle de confiance à 95 % des OR.

<sup>4</sup> *L. spp* : légionelles d'espèce non identifiée, NC : non calculé, NS : non significatif.

### RÉSULTATS

La distribution des souches cliniques a été comparée avec celles de deux échantillons de souches environnementales (tableaux 1 et 2). Cette analyse a montré que la répartition en terme d'espèces et de sérotypes des 259 souches cliniques n'était pas superposable à celle retrouvée pour les deux groupes de souches environnementales constitués respectivement de 2 747 souches pour le groupe des légionelles envoyées au CNRL pour identification et de 381 pour celui des souches isolées des 554 prélèvements d'eau. Une différence significative a particulièrement été mise en évidence pour l'espèce *L. pneumophila* sérotype 1 (*p* < 0,05). En effet, ce sérotype représentait 95 % des légionelles isolées de prélèvements pathologiques alors qu'il ne constituait que 28 % des souches environnementales analysées pour identification et 29 % des souches environnementales isolées des prélèvements d'eau. De plus, une plus grande diversité de légionelles a été isolée des prélèvements environnementaux. Ainsi, l'espèce *L. pneumophila* majoritairement isolée de prélèvements pathologiques (99 %), ne représentait que 75 % des souches environnementales. *L. anisa*, *L. pneumophila* sérotypes 6 et 3 ont été retrouvées en pourcentage non négligeable dans les eaux de distribution (respectivement 14 %, 11 % et 11 %) alors que ces légionelles n'ont été isolées que lors de 3 cas de légionellose (1 % des souches cliniques) (tableaux 1 et 2).

Tableau 2

**Comparaison de la répartition des 259 souches cliniques et des 381 souches de légionelles isolées au CNRL dans 554 prélèvements d'eau, 2001-2002**

Espèces, sérogroupes	Souches cliniques (%)	Souches des prélèvements d'eau (%)	Test statistique ( $\chi^2$ , $p < 0,05$ )
<i>L. pneumophila</i>	256 (99)	288 (76)	NC
1	247 (95)	111 (29)	$p < 0,05$
2	1 (<1)	6 (2)	NS
3	3 (1)	64 (17)	$p < 0,05$
5	0	18 (5)	NS
6	2 (1)	15 (4)	NS
8	0	0	NC
Sérogroupe multiple <sup>1</sup>	3 (1)	74 (19)	$p < 0,05$
<i>L. anisa</i>	2 (1)	61 (16)	$p < 0,05$
<i>L. taurinensis</i>	0	13 (3)	NS
<i>L. erythra</i>	0	6 (2)	NS
<i>L. rubrilucens</i>	0	0	NS
Autres <sup>2</sup>	0	7 (2)	NC
<i>L. spp</i> <sup>3</sup>	1 (<1)	6 (2)	NC
<b>TOTAL</b>	<b>259 (100)</b>	<b>381 (100)</b>	NC

<sup>1</sup> *L. pneumophila* sérogroupe multiple : sérogroupe non identifié en raison de réactions croisées en immunofluorescence direct entre les différents sérogroupes de légionelles. Pour les souches cliniques, on retrouve des *L. pneumophila* sérogroupe 3-6. Pour les souches provenant des 554 prélèvements d'eau, on retrouve des *L. pneumophila* de sérogroupe 6-12, 6-3, 4-5-10-13, 4-5-10-14, 4-8-10-14, 4-5-8-10-14, 4-5-8-10-12-14, 5-8-14, 5-8-10, 5-10-14, 5-8-10-14.

<sup>2</sup> Ces autres légionelles sont *L. dumoffii* (1 souche), *L. feeleeii* (1 souche), *L. londiniensis* (1 souche), *L. moravica* (4 souches).

<sup>3</sup> *L. spp* : légionelles d'espèce non identifiée, NC : non calculé, NS : non significatif.

Afin de vérifier la représentativité des échantillons des souches environnementales analysées, nous avons comparé leur distribution en terme d'espèces et de sérogroupes (tableau 3). Cette comparaison a révélé des différences statistiquement significatives pour 3 sérogroupes de *L. pneumophila* (sérogroupes 3, 6 et 8). Dans ces 2 populations de souches environnementales, *L. pneumophila* sérogroupe 1 représentait moins de 30 % de l'ensemble des légionelles.

Afin de quantifier le risque de légionellose associée à la présence des différentes espèces et sérogroupes de légionelles dans les prélèvements environnementaux, nous avons utilisé la distribution des souches environnementales comportant le plus grand effectif, soit les 2 747 envoyées au CNRL pour identification. Un odds-ratio a été calculé pour chacune des légionelles. Le risque d'apparition d'une légionellose est 50 fois plus important (OR = 52,6) si les eaux de distribution sont colonisées par *L. pneumophila* sérogroupe 1 en comparaison à la colonisation par les autres espèces et sérogroupes de légionelles (tableau 1).

Tableau 3

**Comparaison de la répartition des 381 souches de légionelles isolées dans les 554 prélèvements d'eau et des 2 747 légionelles environnementales reçues au CNRL pour identification, 2001-2002**

Espèces, sérogroupes	Souches des prélèvements d'eau (%)	Souches environnementales (%)	Test statistique ( $\chi^2$ , $p < 0,05$ )
<i>L. pneumophila</i>	288 (76)	2 073 (75)	NC
1	111 (29)	776 (28)	NS
2	6 (2)	64 (2)	NS
3	64 (17)	296 (11)	$p < 0,05$
5	18 (5)	38 (1)	NS
6	15 (4)	305 (11)	$p < 0,05$
8	0	79 (3)	$p < 0,05$
Sérogroupe multiple <sup>1</sup>	74 (19)	436 (16)	NS
<i>L. anisa</i>	61 (16)	378 (14)	NS
<i>L. taurinensis</i>	13 (3)	78 (3)	NS
<i>L. erythra</i>	6 (2)	42 (1)	NS
<i>L. rubrilucens</i>	0	32 (1)	NS
Autres <sup>2</sup>	7 (2)	183 (7)	NC
<i>L. spp</i> <sup>3</sup>	6 (2)	40 (1,5)	NC
<b>TOTAL</b>	<b>381 (100)</b>	<b>2 747 (100)</b>	NC

N.B: Dans les tableaux 1, 2 et 3, les proportions de chaque espèce et sérogroupe d'un échantillon (calculées en fonction du nombre total de souches dans chaque échantillon) sont comparées aux proportions des mêmes espèces et sérogroupes d'un second échantillon. Il en est de même pour les odds-ratios du tableau 1.

## DISCUSSION

La répartition des souches de légionelles isolées en clinique diffère fortement de celle retrouvée pour les souches environnementales, puisqu'en clinique, *L. pneumophila* sérogroupe 1 représente 95 % des souches alors que le pourcentage de cette espèce est inférieur à 30 % dans l'environnement. Le taux de *Legionella* non *pneumophila* est faible en clinique (1 %), alors ces espèces sont significativement présentes dans l'environnement (25 %).

La distribution en terme d'espèces et de sérogroupes de notre échantillon de souches cliniques est représentative des souches isolées de prélèvements pathologiques en France, un envoi au CNRL de chaque souche clinique isolé étant systématiquement effectué. Du fait de la non exhaustivité du recueil des souches colonisant les réseaux d'eau en France, deux échantillons de souches environnementales d'origines différentes ont été analysés. Le premier échantillon comprenait des souches environnementales envoyées au CNRL pour une identification précise. La détermination de *L. pneumophila* sérogroupe 1 est facilement réalisable à l'aide de réactifs commercialisés. Elle ne nécessite donc pas d'envoi systématique au CNRL. Cette identification aisée a pu entraîner une sous-estimation de la représentativité de *L. pneumophila* sérogroupe 1 parmi les souches environnementales reçues. Le second échantillon de souches environnementales constitué de 381 souches isolées de 554 prélèvements d'eau pouvait comporter lui aussi des imperfections, notamment en raison de l'origine géographique restreinte des prélèvements. Cependant, l'étude de la répartition des souches appartenant à ces deux échantillons confirme le faible pourcentage de *L. pneumophila* sérogroupe 1 dans l'environnement, puisque dans les deux cas, le pourcentage de cette espèce était inférieur à 30 %.

La différence observée entre les répartitions des souches cliniques et environnementales pourrait être due à l'existence d'espèces plus pathogènes que d'autres comme cela semble être le cas avec *L. pneumophila* sérogroupe 1 [4]. Comme le montre l'odds-ratio, la présence de *L. pneumophila* sérogroupe 1 dans l'environnement constitue un facteur de risque plus important pour la survenue de cas de légionellose par rapport à celle d'autres espèces ou sérogroupes de légionelles. Notons qu'il ne s'agit que d'une estimation de risque car les prélèvements d'eau d'où sont issues les souches environnementales, bien que reflétant la colonisation en France, n'ont pas de rapport direct avec les cas de légionellose. *L. pneumophila* sérogroupe 1 pourrait posséder des facteurs de virulence spécifiques rendant ces légionelles plus pathogènes et donc plus fréquentes en clinique [4]. Ces espèces pourraient par exemple se multiplier plus facilement dans les macrophages humains d'où leur pathogénicité accrue [5]. La discordance entre la répartition des souches cliniques et environnementales pourrait également être liée à l'état des légionelles dans l'eau (légionelles intra-amibiennes, planctoniques ou adhérentes) [6]. *L. pneumophila* sérogroupe 1 pourrait se rencontrer plus fréquemment sous forme intra-cellulaire ou engluée dans un biofilm. Cette espèce serait alors moins détectable au cours de la surveillance des réseaux d'eau et son taux dans l'environnement serait sous-estimé. Nous soulignons également que notre analyse était qualitative et ne prenait donc pas en compte les concentrations de chaque espèce dans les canalisations d'eau. Enfin, des traitements plus fréquents voire continus des réseaux de distribution des eaux, instaurés à la suite de la circulaire DGS n°98/771 ont pu provoquer des modifications de la distribution des légionelles dans l'environnement, entraînant une baisse des taux de *L. pneumophila* sérogroupe 1 au profit d'autres espèces plus résistantes aux méthodes de désinfection.

## CONCLUSION

La prédominance de *L. pneumophila* sérogroupe 1 en pathologie humaine (95 % des souches isolées en clinique) ne semble pas être uniquement le reflet d'une prédominance de ces souches dans l'environnement puisque *L. pneumophila* 1 ne représente que 30 % des souches environnementales isolées en France. L'existence de facteurs de virulence spécifiques ou d'un « fitness » particulier semble donc favoriser la pathogénicité de *L. pneumophila* sérogroupe 1. Afin d'améliorer la prévention de la légionellose, il apparaît à présent nécessaire de s'intéresser à l'étude de ces facteurs.

## RÉFÉRENCES

- Jarraud S, Reyrolle M, Etienne J. *Legionella* et légionellose. In : Précis de bactériologie clinique, J Freney, F Renaud F., W Hansen, C Bollet C. (eds), éditions ESKA, Paris, 2000, p 1389-405.
- Lo Presti F, Riffard S, Jarraud S, Le Gallou F, Richet H, Vandenesch F, Etienne J. Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. J Clin Microbiol 2000;38:3128-30.
- Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mpf* gene. J Clin Microbiol 1998;36:1560-7.
- Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med 1997;337:682-7.
- Joshi AD, Swanson MS. Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. Infect Immun 1999;67:4134-42.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. Appl Env Microb 1994;60:1842-51.