



HAL
open science

Validation de l'identification de colonies présumptives de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* par spectrométrie de masse : comparaison avec une méthode de référence

Éléa Constantin

► To cite this version:

Éléa Constantin. Validation de l'identification de colonies présumptives de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* par spectrométrie de masse : comparaison avec une méthode de référence. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03209827

HAL Id: dumas-03209827

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03209827>

Submitted on 27 Apr 2021

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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2020

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 21 Février 2020

par

CONSTANTIN Eléa

Née le 26/02/1994 à EVREUX (27)

**Validation de l'identification de colonies présomptives de
Legionella spp et de *Legionella pneumophila* par
spectrométrie de masse : comparaison avec une méthode
de référence**

Président du jury : **Pr PESTEL-CARON, Martine**, *Docteur en Pharmacie, PU-PH*

Membres du jury : **Dr GOURICHON, Lise**, *Docteur en Pharmacie, Praticien Attaché*

Dr GROULT, Marie-Laure, *Docteur en Pharmacie, Maitre de conférences*

Dr RODRIGUES FERREIRA, Nuno, *Docteur en Pharmacie*

Remerciements

A Madame le Professeur Martine Pestel Caron, pour me faire l'honneur de présider cette thèse, et pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées durant mes années d'études. Je vous témoigne un profond respect et une grande reconnaissance,

A Madame le Docteur Lise Gourichon, pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer mon travail, et d'avoir permis qu'il se réalise dans les meilleures conditions. Je te remercie infiniment pour ta patience, tes précieux conseils, ta disponibilité, et pour le temps que tu m'as consacré au cours de la rédaction de cette thèse. Merci pour tout,

A Madame le Docteur Marie Laure Groult, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, et de m'accompagner dans cette ultime étape de mes études. Je vous remercie pour la bienveillance, la gentillesse, et l'empathie que vous m'avez témoignées tout au long de mes études,

A Monsieur le Docteur Nuno Rodrigues Ferreira, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, cela compte beaucoup pour moi. Je vous remercie aussi de m'avoir accordé votre entière confiance alors que je sortais tout juste de 6^{ème} année. C'est vous qui m'avez fait découvrir l'officine, et c'est vous qui m'avez offert mon premier emploi : « la boucle est bouclée ». Merci pour tout,

A Madame le Docteur Christine Chefson-Girault, merci de m'avoir accueillie dans le service pendant 6 mois, de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, et de ta bienveillance,

A toute l'équipe du service d'Hygiène Hospitalière du CHU de Rouen, merci pour votre accueil chaleureux lors de mon stage, votre patience, et pour tout ce que vous m'avez appris. Vous m'avez beaucoup apporté et je garderai un excellent souvenir de vous,

A l'équipe du service de Parasitologie du CHU de Rouen, merci de m'avoir permis de venir réaliser certaines de mes manipulations dans votre service,

A toi Maman, pour m'avoir soutenue du début jusqu'à la fin, pour avoir partagé mes peines et mes joies. Merci d'avoir pris le temps de relire mon travail. Je te dois tout, et sans toi rien n'aurait été possible,

A Ambre, ma petite sœur, merci d'être toujours à mes côtés malgré notre différence d'âge,

A Alizée, j'espère que tu aurais été fière de moi,

A Papa, pour m'avoir épaulée au cours de toutes ces années,

A Laura et Bénédicte, toujours présentes dans les bons comme dans les mauvais moments, je n'aurais jamais pu rêver meilleures amies que vous. Que notre petit trio ne soit jamais séparé,

A Lucie, Mathilde, Florian, Pierre, Victor, vous êtes comme la famille, c'est une chance de vous avoir. A tous les super moments passés ensemble, et à tous les autres à venir,

A Agathe, chaque jour avec toi est une nouvelle aventure. On forme une sacrée équipe,

A Diane, Alice, Virginie, et Justine merci pour votre précieuse amitié, vous êtes de belles personnes,

A Clémentine, Agathe, Marie-Hélène, Julia, Solenne, Claire, et Elsa, merci pour votre amitié, et tous les bons moments passés avec vous,

A Céline Brassier Gervais, Rachida, et Sophie, merci pour l'année que j'ai passée avec vous à la pharmacie, vous avez contribué à ma réussite,

A Nathalie, Barbara, Steffy, Muriel, Chantal, Angèle, Alexandre, Clarisse, et Lauralie, la super équipe de la pharmacie de Caër, c'est un plaisir de venir chaque jour travailler en votre compagnie, je ne m'en lasserai pas de sitôt,

A Arthur, merci pour ta patience et pour ton aide pour la relecture de mon travail. Je suis heureuse de partager ce moment avec toi,

A Joséphine, merci d'être une amie fidèle depuis si longtemps, je n'oublierai pas les moments, heureux comme difficiles, que nous avons traversés ensemble,

A Camille, j'aurais aimé que tu partages ce moment avec moi,

A tous les autres amis que j'ai rencontrés au cours de ces années d'études, et aux bons souvenirs tous ensemble.

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Agnès LIARD
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie

Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>sumombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CATANHEIRO	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice MOISAN	Virologie
M. Henri GONDÉ	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel MOUHAJIR	Parasitologie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ - Saint Julien Rouen

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Espèces et sous-espèces du genre Legionella, d'après « Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics », (Gomez-Valero et al., 2009).....	25
Tableau 2 : Sensibilité et Spécificité des différentes méthodes diagnostiques de la légionellose, d'après « Le risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).....	40
Tableau 3 : Stratégie du choix d'antibiotique d'après « Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte », (Afssaps, 2012).	42
Tableau 4 : Synthèse des concentrations seuils à respecter et leurs références, selon chaque type d'installation, d'après « Le risque lié aux légionelles - Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).	52

Liste des Figures

Figure 1 : Cycle répliatif des légionelles, d'après « Molecular and cell biology of Legionella pneumophila » (Bitar et al., 2004).....	27
Figure 2 : Etapes de maturation et de dispersion d'un biofilm, d'après « Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique », (Tremblay et al., 2014).	30
Figure 3 : Nombre de cas de légionellose notifiés en France de 1988 à 2018, d'après Santé Publique France.....	31
Figure 4 : Schéma du système de surveillance de la légionellose en France d'après « Risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).	49
Figure 5 : Une carte de réaction, d'après Réactifs de diagnostic Oxoid – Product Detail (Oxoid, 2019)	66
Figure 6 : Préparation et dépôt d'une souche sur une cible MALDI-TOF, d'après « Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales », (Sauget, 2016).	69
Figure 7 : Etapes de la préparation et du dépôt d'une souche sur cible de MALDI-TOF, d'après « Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of Escherichia coli pathotypes », (Clark et al., 2013).	70
Figure 8 : Fonctionnement du MALDI-TOF MS, d'après « Maldi-Tof comme outil d'identification de pathogènes alimentaires » (Polet et al. 2015).....	71
Figure 9 : Spectre de masse caractéristique obtenu avec le MALDI-TOF MS Bruker Daltonics®, d'après « Spectromètre de masse MALDI-TOF », (INRAE, 2009).....	72
Figure 10 : Résultats d'identification obtenus avec le système MALDI-Biotyper®, d'après « Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de typeMALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales. », (Bruker DaltonikGmbH, Bremen, Germany), (Sauget, 2016).....	73
Figure 11 : Méthode d'ensemencement, d'après « Milieux de culture et Techniques d'ensemencement » (Bensakhira, 2018).....	78

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ARS	Agence Régionale de Santé
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI	Brain Heart Infusion
BTS	Bacterial Test Standard
CNR-L	Centre National de Référence des Légionelles
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CPias	Centre d'appui pour la Prévention des infections associées aux soins
CSP	Code la Santé Publique
DGS	Direction Générale de la Santé
DO	Déclaration Obligatoire
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECS	Eau Chaude Sanitaire
EHPAD	Etablissement d'Hospitalisation pour Personnes Agées Dépendantes
ELDSNet	European Legionnaires' Disease Surveillance Network
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Assay
ESI	Electrospray Ionization
GVH	Graft Versus Host
GVPC	Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide
IBC	Institut de Biologie Clinique
IF	Immunofluorescence
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAR	Tour Aéroréfrigérante
UE	Union Européenne

Table des matières

Remerciements	2
Liste des Tableaux	15
Liste des Figures	16
Liste des abréviations	17
Table des matières	18
Introduction.....	21
Partie I : Généralités	23
1. Historique.....	23
2. Caractéristiques générales de l'agent pathogène	24
2.1. Taxonomie.....	24
2.2. Caractéristiques physiques et biochimiques.....	26
2.3. Croissance et multiplication	27
2.4. Ecologie	28
3. La légionellose	31
3.1. Epidémiologie.....	31
3.2. Mode de contamination et physiopathologie	32
3.3. Facteurs de risque	32
3.4. Diagnostic.....	34
3.4.1. Symptômes et Diagnostic clinique.....	34
3.4.2. Diagnostic biologique	35
3.4.2.1. Antigénurie – Recherche d'antigène soluble urinaire	35
3.4.2.2. Culture	36
3.4.2.3. Détection par amplification génique Polymerase Chain Reaction (PCR).....	38
3.4.2.4. Sérologie	39
3.5. Prise en charge et traitement	41

3.6.	Prévention	42
4.	Le système de surveillance en France	43
4.1.	Définition des différents cas de légionellose en France	43
4.1.1.	Cas confirmé et cas probable.....	43
4.1.2.	Cas nosocomial ou cas associé aux soins	44
4.1.3.	Cas communautaire.....	44
4.1.4.	Cas groupés	44
4.2.	Déclaration obligatoire	45
4.3.	Signalement des infections nosocomiales	46
4.4.	La surveillance bactériologique par le Centre National de Référence des Légionelles de Lyon 47	
4.5.	Le réseau européen	48
5.	Surveillance environnementale	50
5.1.	Réglementation	50
5.2.	Analyses environnementales.....	53
5.2.1.	Norme NF EN ISO/CEI 17025 : 2005 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.....	53
5.2.2.	Recherche et dénombrement de <i>Legionella</i> spp et de <i>Legionella pneumophila</i> selon la norme NFT90-431	54
5.2.2.1.	Mise en culture des prélèvements.....	54
5.2.2.2.	Confirmation des colonies présomptives.....	56
5.2.2.3.	Identification.....	57
5.2.2.4.	Méthodes alternatives.....	59
Partie II : Travaux personnels : Validation de la spectrométrie de masse pour l'étape d'identification de <i>Legionella</i> spp et de <i>Legionella pneumophila</i> – Comparaison avec une méthode de référence		
1.	Objectifs et principes.....	62
2.	Matériels et méthodes	65

2.1.	Agglutination au latex.....	65
2.2.	MALDI-TOF MS	67
2.3.	Validation selon le projet de norme NF T90-500	73
2.3.1.	Choix de l'étape d'application de la méthode	74
2.3.2.	Etude d'inclusivité et d'exclusivité.....	75
2.3.3.	Caractérisation de la méthode	76
2.3.3.1.	Répétabilité et reproductibilité.....	76
2.3.3.2.	Comparaison avec la méthode de référence	77
3.	Résultats.....	79
4.	Discussion.....	80
5.	Conclusion et perspectives.....	82
	Annexes.....	84
	Annexe 1 : Fiche de signalement des infections associées aux soins en établissement de santé (version 2017) à transmettre sans délai à l'ARS et au CPIas dont dépend l'établissement de santé, d'après « Signalement », (CPIas Réseau National, 2019).....	84
	Annexe 2 : Résultats obtenus lors de l'analyse des 150 souches de légionelles avec la méthode de référence (agglutination au latex), la méthode alternative (MALDI-TOF), et avec la PCR séquençage ARN 16S d'après « Travaux personnels ».	86
	Annexe 3 : Interprétation des résultats de la comparaison de l'identification de <i>Legionella pneumophila</i> par la méthode de référence (Agglutination au latex) et la méthode alternative (MALDI TOF).....	91
	Bibliographie	96

Introduction

La légionellose est une infection pulmonaire possiblement mortelle provoquée par la bactérie du genre *Legionella* qui est un germe ubiquitaire qui se développant majoritairement en milieu hydrique. Naturellement présent dans les milieux naturels, tels que les lacs ou les rivières, mais à faible concentration, il va surtout proliférer dans les réservoirs artificiels, notamment dans les réseaux collectifs de distribution d'eau mal entretenus ou dans des installations à risque comme les tours aérorefrigérantes (van Heijnsbergen et al., 2014). L'homme est alors susceptible de se contaminer en inhalant des gouttelettes d'eau essentiellement contaminées par *Legionella pneumophila*, sous forme d'aérosols (Joseph, 2002). Ce risque est particulièrement important lorsque les populations exposées sont vulnérables comme c'est le cas dans les établissements de santé. La prévention de la légionellose constitue donc un enjeu de santé publique important. A ce titre, la réglementation impose, outre la surveillance et l'investigation des cas de légionellose, la réalisation régulière de campagnes de prélèvements au niveau des installations à risque et des réseaux collectifs d'eau chaude sanitaire afin de s'assurer que la concentration en légionelles dans l'eau reste inférieure aux objectifs cibles définis pour la protection des populations. (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Afin de garantir la qualité des prélèvements et des analyses, la réglementation impose que ceux-ci soient réalisés selon la norme NF T90-431 par un laboratoire accrédité Cofrac.

Au CHU de Rouen, c'est le laboratoire d'Hygiène qui assure cette surveillance dans le cadre de ses missions de prévention des infections nosocomiales. Conformément à la législation, le

laboratoire est accrédité Cofrac et réalise les recherches et dénombrements de légionelles selon la méthode de référence décrite dans la norme NF T90-431.

Cette méthode comprend une étape d'identification des colonies confirmées comme *Legionella* qui peut être réalisée soit par immunofluorescence (IF) soit par agglutination au latex.

L'agglutination au latex est la technique préférentiellement utilisée par le laboratoire depuis de nombreuses années. Cependant, depuis 2016, le laboratoire rencontre ponctuellement des difficultés d'identification de certaines souches de *L. pneumophila* avec cette technique. C'est pourquoi, il envisage de mettre en place l'identification des colonies présomptives de *L. pneumophila* et de *Legionella spp* par spectrométrie de masse MALDI TOF.

Cette méthode n'étant pas la méthode de référence, elle doit faire l'objet d'une validation selon la norme NF T90-500 pour que le résultat des identifications puisse être rendu sous accréditation.

Le protocole de validation comporte une étape de comparaison de la méthode alternative avec la méthode d'identification de référence.

C'est sur cette comparaison de méthodes qu'a porté le travail présenté ici en deuxième partie, après une première partie portant sur l'état des connaissances relatives à la légionnelle, la légionellose, et à la réglementation associée.

Partie I : Généralités

1. Historique

La légionellose, ou maladie des légionnaires, a pour la première fois été décrite suite à une épidémie de pneumonie qui a eu lieu en Juillet 1976 à l'hôtel Bellevue-Stratford, lors du 58^{ème} congrès de l'American Legion. (Freney, 2011).

Au cours de cette épidémie, sur les 4400 légionnaires participants au congrès, on a dénombré 182 cas de légionellose, dont 29 morts.

Ce n'est que six mois plus tard, en janvier 1977, que Joseph McDade et son équipe ont identifié l'agent causal de cette épidémie : *Legionella pneumophila* (McDade et al., 1977).

A la suite de l'épidémie de 1976, en étudiant de nouveau leurs archives, les scientifiques ont découvert que cette bactérie était responsable d'un certain nombre de faits restés jusqu'alors inexplicables.

On peut citer l'événement de 1968, dans l'immeuble du Oakland County Health Department de la ville de Pontiac dans le Michigan, où 95% du personnel employé a présenté un syndrome respiratoire accompagné de fièvre qui a duré de 3 à 4 jours mais sans signe de pneumonie. Ce n'est qu'après l'épidémie de Philadelphie que l'on a attribué la responsabilité de la bactérie *L. pneumophila* à la survenue de ce syndrome respiratoire fébrile, renommé par la suite « fièvre de Pontiac » (Freney, 2011).

D'autres études rétrospectives ont permis de mettre en cause cette bactérie dans des épidémies nosocomiales ou communautaires en 1950 et 1960 (Thacker et al., 1978). D'autres cas ont ensuite été rapportés dans les années 1980.

2. Caractéristiques générales de l'agent pathogène

2.1. Taxonomie

Les légionelles appartiennent à la famille *Legionellaceae* dont le seul genre est *Legionella*. Actuellement, 60 espèces et sous-espèces (tableau 1) comprenant plus de 70 sérogroupes distincts ont été identifiés (Gomez-Valero et al., 2009).

Une vingtaine d'espèces de légionelles sont pathogènes pour l'homme (Muder et Yu, 2002).

Cependant, *Legionella pneumophila* est celle qui cause le plus de cas de légionellose dans le monde. Cette dernière comprend 16 sérogroupes différents mais c'est le séroroupe 1 qui est le responsable de 70% des cas en Europe (Joseph, 2002).

Tableau 1: Espèces et sous-espèces du genre Legionella, d'après « Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics », (Gomez-Valero et al., 2009).

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. feeleii</i>	<i>L. dresdenensis</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. drozanskii</i>
<i>L. hackelliae</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>

2.2. Caractéristiques physiques et biochimiques

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, non sporulés, non acidorésistants, non capsulés, de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. La plupart des espèces sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou latéral (Jarraud et al., 2013), (Jamilloux et al., 2012). La microscopie électronique met en évidence de nombreux pilis à leur surface. Ce sont des organismes à développement intra-cellulaire facultatif (Jarraud et al., 2013), (SPILF 2004). Ces bactéries sont caractérisées par une croissance lente et ont besoin, pour se développer, de L-cystéines et de fer.

Sur milieu gélosé, les colonies de légionelles sont des colonies plates, blanches, grises à violacées et ont un aspect en verre frité lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire. Certaines espèces, comme *Legionella anisa* et *Legionella bozemanii*, présentent une fluorescence lorsqu'elles sont analysées sous une lampe de Wood (Freney, 2011).

La lampe de wood, ou lumière noire, est un outil diagnostique produisant des rayonnements ultraviolets à une longueur d'onde de 365 nanomètres environ. Les colonies de *L. pneumophila* ne seront pas fluorescentes lors de cet examen. Dès cette étape d'identification, on peut donc obtenir une orientation diagnostique, et différencier les colonies de *L. pneumophila* des autres colonies (INRS et 3RB Réseau Ressource Risque Biologique, 2018).

Cependant, il existe des espèces de légionelles comme *Legionella nautarum*, *Legionella taurinensis* ou encore *Legionella londiniensis*, qui elles aussi ne seront pas fluorescentes lorsqu'elles sont analysées à la lampe de Wood.

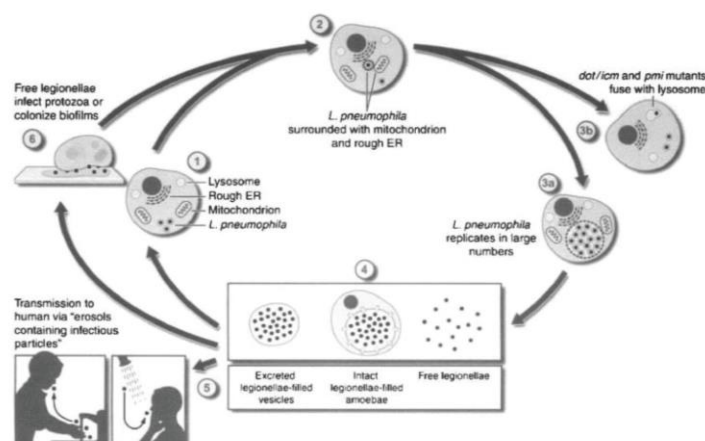
2.3. Croissance et multiplication

La majorité des légionelles sont des bactéries intracellulaires facultatives. Elles ont néanmoins la capacité de se développer à l'intérieur de certaines cellules eucaryotes comme les protozoaires, et en particulier les amibes qui sont les hôtes naturels pour les légionelles en milieu aquatique. C'est un phénomène d'endoparasitisme qui a été décrit pour la première fois par Robowtham en 1980 (Robowtham, 1980).

Pour survivre et se multiplier, les légionelles, pénètrent dans ces micro-organismes eucaryotes par encerclement de couches successives d'un seul pseudopode (qui est un prolongement cytoplasmique permettant la locomotion et la phagocytose), phénomène appelé « coiling phagocytosis », ou par phagocytose classique à 2 pseudopodes (Bozue et Johnson, 1996).

Après 36 à 48 heures d'infection, la vacuole de phagocytose remplit la majorité de la cellule hôte. Un nombre important de bactéries est contenue dans cette cellule hôte, et celles-ci vont être ensuite libérées dans l'environnement. C'est ainsi que les légionelles peuvent contaminer de nouveaux biofilms, des amibes ou l'homme. (Figure 1).

Figure 1 : Cycle réplcatif des légionelles, d'après « Molecular and cell biology of Legionella pneumophila » (Bitar et al., 2004).



En dehors de cette multiplication intra-amibienne, la croissance de ces bactéries, notamment dans l'eau, est directement liée à la température de celle-ci. De 15 à 25°C, elles survivent mais ne se développent pas. Leur température optimale de croissance est comprise entre 25°C et 37°C et elles peuvent se multiplier jusqu'à une température de 43°C (INRS, 2004).

Quant au pH, la bactérie est tolérante sur un large intervalle (5,5 – 8,5), bien que son pH optimum de croissance soit de 6,9 (Warren WJ et Miller RD, 1979).

Les conditions idéales au développement des légionelles sont les suivantes : des milieux riches en calcium, en magnésium, en fer, en cystéine, des concentrations élevées en résidus métalliques, ainsi que de certains matériaux tels que le caoutchouc, le silicone, le chlorure de polyvinyle et le polyéthylène (INRS, 2004). La présence de tartre, la corrosion, et la stagnation de l'eau sont d'autres éléments qui, ajoutés aux précédents, vont favoriser la formation de biofilms, et donc la multiplication des légionelles (Katz et Hammel, 1987), (Declerck, 2010), (Ohno et al., 2003).

2.4. Ecologie

Les légionelles sont des germes ubiquitaires qui ont pour habitat naturel l'eau. Les légionelles sont présentes dans la plupart des milieux aquatiques naturels, lacs ou rivières, mais à très faible concentration, indétectables par des méthodes de culture. La salinité de l'eau de mer est défavorable à leur survie dans ce milieu. Elles ont également été retrouvées dans des sols (terre humide, boue), ayant été en contact avec une eau contaminée par des légionelles (van Heijnsbergen et al., 2014).

C'est à partir de leurs réservoirs naturels que les légionelles vont venir contaminer les réservoirs artificiels, et s'y développer en conditions favorables. Les réservoirs artificiels, dans lesquels prolifèrent le plus les légionelles, sont majoritairement des installations d'eau chaude sanitaires (ECS) et les systèmes de refroidissement par voie humide associés à des tours aéroréfrigérantes (TAR). D'autres systèmes et installations peuvent également être colonisés, comme les réseaux d'eau collectifs, les fontaines décoratives, ou les bains bouillonnants (Papadakis et al. 2018).

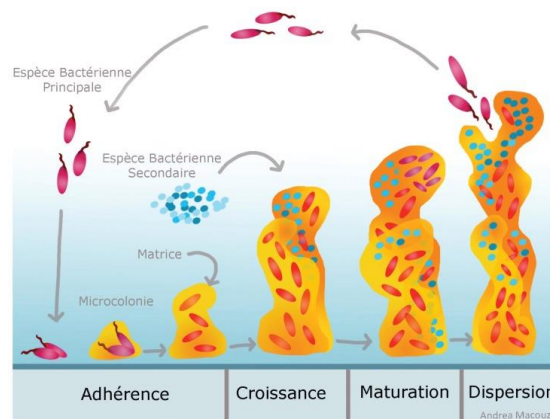
La colonisation des réservoirs artificiels par les légionelles est particulièrement favorisée par la présence de biofilm.

Un biofilm est un complexe symbiotique qui se compose d'un ou plusieurs microorganismes (bactéries, champignons, ou autres entités), qui adhèrent entre eux et se rattachent à une surface (biotique, comme les muqueuses d'un être vivant, ou abiotique, comme un plancher ou une canalisation). Ce complexe est également enrobé d'une matrice polymérique protectrice (Costerton et al., 1994).

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes (Figure 2). La première étape est l'adhésion des bactéries à la surface, grâce à certains de leurs éléments constitutifs comme les flagelles. Elles vont ensuite s'agglutiner et se multiplier pour former des colonies. Puis, elles vont synthétiser les éléments qui vont former la matrice polymérique protectrice (exopolysaccharide, protéines, acides nucléiques, agents tensioactifs, lipides...). La dernière étape est le détachement et la dissémination des cellules bactériennes, qui auront la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de former de nouveaux biofilms (Tremblay et al., 2014).

La capacité à former un biofilm est une caractéristique commune à de nombreux microorganismes. Il permet aux bactéries de se protéger, de survivre et même de se développer dans des conditions qui leur sont défavorables (Tremblay et al., 2014). Il leur permet aussi de résister aux traitement biocides et aux traitements utilisés pour la désinfection des circuits d'eau (Vianney, 2013).

Figure 2 : Etapes de maturation et de dispersion d'un biofilm, d'après « Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique », (Tremblay et al., 2014).



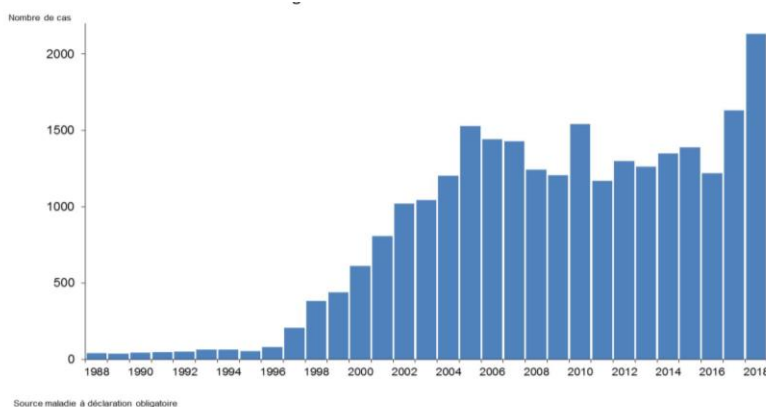
3. La légionellose

3.1. Epidémiologie

En France, en 2018, 2133 cas de légionellose ont été notifiés grâce au système de déclaration obligatoire, soit une incidence de 3,2 pour 100 000 habitants. Le nombre de cas de légionelloses en 2018 a été très nettement supérieur à celui recensé en 2017 (+31%), qui était de 1630 cas, selon Santé Publique France.

Depuis la mise en place du système de déclaration en 1988, le nombre de cas recensés en 2018 est un nombre de cas record (Figure 3). La recrudescence de ces cas s'expliquerait par les conditions météorologiques marquées par des intempéries fréquentes au cours du printemps 2018. Ces intempéries ont pu créer des conditions propices au développement des légionelles (taux d'humidité élevé et douceur des températures). La majorité des cas avait séjourné dans des gîtes, des hôtels ou des locations saisonnières, selon Santé Publique France.

Figure 3 : Nombre de cas de légionellose notifiés en France de 1988 à 2018, d'après Santé Publique France.



3.2. Mode de contamination et physiopathologie

Les protozoaires sont les hôtes naturels des légionelles, mais l'infection des cellules phagocytaires humaines et notamment des macrophages est un phénomène opportuniste. Le mécanisme d'infection des cellules phagocytaires humaines reste toutefois similaire à celui des amibes.

La contamination se fait par voie respiratoire mais il faut réunir plusieurs conditions pour contracter une légionellose :

- la contamination de l'eau par une souche pathogène de légionelles
- l'aérosolisation sous forme de gouttelettes de taille inférieure à 10 μm , voire 5 μm .
- l'exposition des personnes dans l'environnement d'une installation contaminée (inhalation de micro-gouttelettes).

Cependant, aucune contamination interhumaine n'a été recensée jusqu'à aujourd'hui (Prussin et al., 2017).

3.3. Facteurs de risque

Il existe plusieurs facteurs de risque individuels, temporaires ou permanents, qui induisent une plus grande sensibilité aux infections (Sopena et al., 2004), (Campese et al., 2011), (Viasus et al., 2013), (Sopena et al., 2007) :

- l'âge supérieur à 50 ans, sachant que l'incidence augmente avec l'âge
- le sexe masculin
- le tabagisme

- le diabète
- les pathologies chroniques, cardiaques et pulmonaires
- l'insuffisance rénale
- les traitements par anti-TNF
- les personnes immunodéprimées, à haut risque, ou « particulièrement

vulnérables » les personnes ayant un système immunitaire fortement diminué du fait d'une pathologie (hémopathie maligne, maladie du greffon contre l'hôte (GVH), cancers), d'un traitement immunosuppresseur, d'une transplantation ou d'une greffe d'organe, d'un traitement de corticothérapie prolongée. (Haut conseil de la santé publique, 2013)

En plus des facteurs de risque individuels, il existe des facteurs de risque collectifs comme les séjours en thalassothérapie, dans des complexes hôteliers, ou dans toute autre collectivité sont des facteurs de risque de contracter une légionellose. En effet ce type d'endroits comporte des systèmes qui produisent des aérosols (systèmes de climatisation, spas, bains à remous, piscine...) (Prussin et al., 2017)

La légionellose chez les personnes âgées de moins de 20 ans ainsi que chez la population pédiatrique est exceptionnelle.(Greenberg et al., 2006), (Shachor-Meyouhas et al., 2010)

3.4. Diagnostic

Théoriquement, on regroupe sous le terme légionellose les 3 tableaux cliniques suivants : la maladie des légionnaires, les formes extra-pulmonaires et la fièvre de Pontiac. Cependant, le terme de légionellose fait essentiellement référence à la maladie des légionnaires. C'est donc uniquement cette forme qui sera développée.

3.4.1. Symptômes et Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de la légionellose repose sur l'existence d'une pneumonie de gravité variable et confirmée radiologiquement.

La période d'incubation s'étend en général de 2 à 10 jours, et cet intervalle est officiellement reconnu en France et en Europe (Tablan et al., 2004).

Certains éléments d'orientation peuvent aider au diagnostic comme un voyage récent, une exposition récente à de l'eau en aérosols, une alerte épidémique locale ou régionale, ou l'échec d'un traitement antibiotique probabiliste par β -lactamines associé à une fièvre supérieure à 39°C. Ces deux derniers paramètres sur un tableau de pneumonie sont, en effet, significatifs d'une légionellose (Sopena et al. 2004), (Fernández-Sabé et al., 2003)

Le tableau clinique s'installe progressivement en 2 à 3 jours, est très évocateur de la maladie, et est présent dans près d'1/3 des cas.

En plus d'une fièvre élevée vers le 3^{ème} jour, on observe des myalgies, des frissons, des signes respiratoires tels que la toux, une sensation de constriction et des douleurs thoraciques.

Des troubles neurologiques (confusion, malaise), ainsi que des troubles digestifs comme la diarrhée, sont également observés au cours de la légionellose (Sopena et al., 2004), (Viasus et al., 2013).

L'infection peut dans certains cas se compliquer et mener à une insuffisance respiratoire, une insuffisance rénale aiguë et à une rhabdomyolyse (Haut conseil de la santé publique, 2013).

L'examen de référence pour confirmer le diagnostic d'une légionellose est la radiographie pulmonaire. Celle-ci montre une pneumonie systématisée avec un syndrome alvéolaire ou alvéolo-interstitiel. La pneumonie est bilatérale. Un épanchement pleural peut être observé chez 1/3 des patients. Toutefois, la radiographie ne permet pas de distinguer une légionellose d'une autre pneumonie bactérienne (Haut conseil de la santé publique, 2013) (SPILF Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, 2004).

3.4.2. Diagnostic biologique

Plusieurs méthodes existent, mais elles n'ont pas la même valeur diagnostique.

3.4.2.1. Antigénurie – Recherche d'antigène soluble urinaire

Ce n'est pas la méthode de référence du diagnostic biologique mais c'est la principale méthode utilisée actuellement. Ce test détecte une fraction spécifique du lipopolysaccharide de la paroi bactérienne par une méthode radio-immunologique, immuno-enzymologique, immuno-fluorescente ou immuno-chromatographique. Ce test est très sensible (plus de 80%) pour *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 et présente l'avantage d'être facilement accessible, et rapide à effectuer. En effet, son résultat peut être rendu en moins d'une heure

avec la technique immunochromatographique (15 minutes) contre 4 heures avec la technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). La sensibilité est par ailleurs améliorée si le test est effectué sur des urines concentrées. L'antigénurie urinaire peut être effectuée de manière précoce, car les antigènes apparaissent au bout de 2 à 3 jours après les premiers signes cliniques. L'antigénurie peut cependant rester positive même après un traitement antibiotique adapté puisque l'excrétion des antigènes peut persister 3 à 4 semaines, voire un an chez certains patients malgré un traitement adapté. Dans ce cas, la persistance d'antigénurie ne signifie en aucun cas l'échec thérapeutique (SPILF, 2004).

Les tests actuellement sur le marché ne détectent que *Legionella pneumophila* sérotype 1. Bien que cette dernière soit responsable de 90% des légionelloses, cela reste un inconvénient car il existe des faux négatifs qui peuvent faire éliminer à tort un diagnostic de légionellose. De plus, il ne permet pas de confirmer une épidémie par comparaison des souches entre malades et environnement.

Il reste le plus rapide à effectuer, mais on se dirigera préférentiellement vers la méthode de culture pour confirmer une légionellose (Haut conseil de la santé publique, 2013).

3.4.2.2. Culture

C'est la méthode de référence du diagnostic biologique. Elle permet d'identifier exactement tous les types de légionelles, les cas groupés et de préciser les sources de contamination. La recherche de *Legionella* par la mise en culture de prélèvements respiratoires bas est indispensable lorsque le test d'antigénurie urinaire s'est avéré positif (Haut conseil de la santé publique, 2013).

La culture pourra être réalisée notamment à partir de prélèvements respiratoires bas (aspiration trachéale, lavage broncho-alvéolaire).

Les expectorations sont rarement contributives à la recherche de légionelles. Elles sont sources d'erreur et sont contaminées par de la salive dans plus de la moitié des cas. On préférera les lavages broncho alvéolaires.

Le résultat de cette technique dépend de la qualité du prélèvement, de la rapidité du transport ainsi que de la prise en charge au laboratoire. L'absence de traitement antibiotique au préalable est également un élément qui jouera un rôle important dans la performance de cette technique.

Le délai d'acheminement des prélèvements ne doit pas excéder 2 heures à température ambiante, et leur conservation ne doit pas être supérieure à 72h à une température de 4°C.

La mise en culture des prélèvements se fait ensuite sur des milieux spécifiques. Sur gélose GVPC, la croissance de Legionella est favorisée par la présence de charbon actif qui capte le CO₂ et neutralise les inhibiteurs de croissance. La L-cystéine est utilisée pour la formation d'acides aminés et l' α -cétoglutarate sert de chélatant. Le pyrophosphate ferrique fournit le fer ; le pH de croissance optimal est ajusté par le tampon ACES. Parallèlement, la flore secondaire est largement inhibée par la présence de glycine et d'un mélange d'antibiotiques (vancomycine, polymyxine B et cycloheximide). On mettra également en culture les prélèvements sur un milieu de confirmation BCYE α , qui correspond au milieu GVPC, sans le supplément glycine + antibiotiques. Il contient tous les éléments nécessaires à la croissance des légionelles, sans les substances inhibitrices.

L'incubation se fera ensuite à 35°C dans un milieu enrichi en CO₂. (Haut conseil de la santé publique 2013) (SPILF Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, 2004).

Le délai de réponse de cette méthode est de 3 à 10 jours.

3.4.2.3. Détection par amplification génique Polymerase Chain Reaction (PCR)

Comme la mise en culture sur milieux sélectifs, la PCR sera réalisée sur des prélèvements bronchiques bas. C'est une méthode d'amplification génique, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN connue, à partir d'une très faible quantité initiale, grâce à l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase et d'amorces oligonucléotidiques. La méthode est sélective et vient du fait que les amorces nucléotidiques sont spécifiques du gène à identifier (Bej et al., 1991). Les gènes cibles les plus souvent utilisés sont les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 5S et 16S pour les techniques spécifiques du genre *Legionella*, et le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) pour les techniques spécifiques de l'espèce *L. pneumophila*. Le taux d'ADN de *Legionella* correspond à la sévérité de l'infection (Maurin et al., 2010), (Diederer et al., 2007)

La PCR permet d'obtenir un résultat rapide, en moins d'une journée, et permet la détection de l'ensemble des sérogroupes de *Legionella pneumophila*, et de l'ensemble des autres espèces de *Legionella*.

Cette technique moléculaire a d'excellentes sensibilité (80 à 100%) et spécificité (100%), et elle est retenue depuis 2011 dans les critères de définition des cas probables de légionellose. (Haut conseil de la santé publique 2013)

3.4.2.4. Sérologie

La sérologie est un examen du sérum, et permet d'étudier les anticorps correspondant à une affection spécifique (ici la légionellose). La présence de ces anticorps est un indicateur de la présence de la maladie dans l'organisme, et ils correspondent à des antigènes donnés.

Dans le cadre de la légionellose, cette méthode a pour inconvénient majeur son résultat tardif (entre 10 jours et 5 semaines). Il faut également confirmer le diagnostic par un second prélèvement, qui doit être effectué 3 à 4 semaines après le premier.

Les anticorps apparaissent généralement deux semaines après le début de l'infection, le pic étant atteint environ quatre à cinq semaines après le début de celle-ci. La mise en évidence d'un titre d'anticorps multiplié par quatre est significative.

Cette méthode n'a pas d'impact sur la prise en charge thérapeutique, et on l'utilise généralement pour des valeurs épidémiologiques (INRS, 2004), (Haut conseil de la santé publique, 2013).

3.4.2.5. Immunofluorescence directe

C'est la mise en évidence des antigènes de *Legionella pneumophila* dans les prélèvements. Cette méthode est basée sur le principe de la reconnaissance d'un antigène par son anticorps spécifique. Un fluorochrome est couplé à l'anticorps, qui émettra de la lumière en étant exposé à une certaine longueur d'onde. L'observation sera effectuée grâce à un microscope à fluorescence.

Cette méthode n'est pas très sensible, et elle est très peu utilisée en routine (SPILF, 2004).

Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des méthodes décrites précédemment, ainsi que leurs sensibilité et spécificité.

La spécificité d'une méthode diagnostique est quant à elle la probabilité que le résultat soit négatif alors que le patient est bien malade (faux négatifs).

Tableau 2 : Sensibilité et Spécificité des différentes méthodes diagnostiques de la légionellose, d'après « Le risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Méthodes	Délai de résultats	Echantillon	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Avantages	Inconvénients
Ag soluble urinaire	< 1 h.	Urine	58-80 (80 si on considère Lp1)	> 99	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnostic rapide et précoce - Une concentration des urines avant analyse est recommandée. - Reste positif même sous traitement 	- Ne permet la détection fiable que de Lp1
Culture	3 à 10 jours	Respiratoire	10-80	100	<ul style="list-style-type: none"> - Permet un diagnostic de certitude - Détecte toutes les espèces et sérogroupe - Indispensable pour les enquêtes épidémiologiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode lente et peu sensible - Négativisation sous traitement
		Sang	< 10	100		
PCR (Polymerase Chain Reaction)	24 h.	Respiratoire	80-100	> 90	<ul style="list-style-type: none"> - Détecte toutes les espèces et sérogroupe - Technique rapide 	- Laboratoires spécialisés
		Sérum	30-50			
		Urine	46-86			
Sérologie	3 à 10 semaines	Sérum	60-80	> 95	<ul style="list-style-type: none"> - Identification des sérogroupe et de certaines autres espèces 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu d'intérêt en aigu - Doit être interprétée avec précaution - Diagnostic rétrospectif (pas toutes les espèces)
Immunofluorescence directe (IFD)	< 4 h.	Respiratoire	25-70	> 95	<ul style="list-style-type: none"> - Technique rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Laboratoires spécialisés - Peu utilisée en pratique

3.5. Prise en charge et traitement

Le choix de l'antibiotique doit être rationnel et lié au fait que les légionelles sont des bactéries à développement intra-cellulaire. Il doit en plus prendre en compte la sévérité de la maladie, le terrain sous-jacent, la sécurité de l'emploi de l'antibiotique, et le bon usage des antibiotiques pour éviter tout risque d'antibiorésistance (Haut conseil de la santé publique 2013). Le choix de l'antibiotique doit également tenir compte de l'inefficacité des β -lactamines dans le cadre d'une légionellose.

Les antibiotiques qui peuvent être utilisés sont :

- les macrolides, qui sont le traitement historique et de référence de la légionellose,
- les fluoroquinolones,
- la rifampicine, utilisée en association,

La voie d'administration (voie orale ou voie injectable (IV)) dépend de la gravité de la maladie ; l'existence de troubles digestifs pouvant faire recourir à la voie injectable. On distingue des formes graves, qui seront prises en charge en urgence dans un service de soins intensifs ou de réanimation, des formes non graves qui seront quant à elles prises en charge en ambulatoire (Gacouin et al., 2002). Les formes graves concernent également les patients immunodéprimés.

Pour les formes graves, on privilégiera les fluoroquinolones ou une association de 2 antibiotiques parmi les fluoroquinolones, les macrolides disponibles par voie IV et la rifampicine. La durée du traitement dans ce cas est de 21 jours.

Pour les formes non graves, on choisira en première intention une monothérapie par macrolide, dont la durée sera de 14 jours.

Les différentes stratégies du choix d'antibiotiques selon la gravité de la maladie et le terrain du patient sont décrites dans le tableau ci-après.

Tableau 3 : Stratégie du choix d'antibiotique d'après « Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte », (Afssaps, 2012).

Gravité de la légionellose / terrain sous-jacent	Choix antibiotique
Légionellose non grave : Patient ambulatoire ou hospitalisé dans un service d'urgences ou en médecine	Monothérapie par Macrolide⁽¹⁾ : Azithromycine ⁽²⁾ ou clarithromycine ou roxithromycine ou josamycine ou spiramycine ou érythromycine
Légionellose grave : Patient hospitalisé dans un service de soins intensifs ou de réanimation, et/ou Patient immunodéprimé	Soit monothérapie par Fluoroquinolone⁽¹⁾ : lévofloxacine ou ofloxacine ou ciprofloxacine Soit association⁽³⁾ de 2 antibiotiques au sein des 3 familles d'antibiotiques suivantes : - Macrolide disponible par voie IV⁽⁴⁾ : spiramycine ou érythromycine (en cas d'indisponibilité de la spiramycine) - Fluoroquinolone^(1,4) : lévofloxacine ou ofloxacine ou ciprofloxacine - Rifampicine

[1] Substances actives listées au sein de chaque famille par ordre de préférence, basé selon le rapport bénéfice-sécurité d'emploi de chaque antibiotique dans cette indication.

[2] Recommandée dans la légionellose cette indication, hors-AMM dans la pneumonie

[3] Les associations comportant la rifampicine ne sont pas à privilégier.

[4] Les fluoroquinolones doivent être utilisées avec prudence notamment en institution en raison (i) du risque d'émergence de souches résistantes, (ii) du risque accru de tendinopathie, notamment chez les sujets âgés ou chez les sujets sous corticothérapie par voie générale, et (iii) des interactions avec les macrolides (effet potentialisateur sur l'allongement de l'intervalle QTc).

La moxifloxacine administrée par voies orale et intraveineuse, du fait de son profil de risques, étant réservée au traitement des pneumonies communautaires lorsqu'aucun autre antibiotique ne peut être utilisé, et ne pouvant pas être associée aux macrolides administrés par voie IV, est exclue de la stratégie thérapeutique à privilégier en cas de légionellose documentée.

3.6. Prévention

Il n'existe pas de traitement prophylactique, la prévention repose principalement d'une part sur la surveillance et l'investigation des cas de légionelloses, et d'autre part sur la maîtrise et le contrôle des installations à risque telles que les réseaux d'eau chaude, les circuits des tours aérofrigorantes, les bains à bulle et les humidificateurs. Une installation dite à « risque » concerne celles qui exposent des personnes à des aérosols inférieurs à 5µm de diamètre (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 2001).

4. Le système de surveillance en France

Il existe actuellement en France plusieurs systèmes complémentaires qui permettent la surveillance et l'investigation des cas confirmés ou probables de légionellose, en fonction de leur caractère nosocomial ou communautaire. Il s'agit notamment la déclaration obligatoire (DO), le signalement des infections nosocomiales, ou encore la surveillance bactériologique par le Centre National de Référence des Légionelles (CNR-L) (Campèse et al. 2015) (Haut conseil de la santé publique 2013).

4.1. Définition des différents cas de légionellose en France

4.1.1. Cas confirmé et cas probable

Ces deux situations concernent toute personne qui présente une pneumopathie. S'il s'agit d'un cas confirmé, cette pneumopathie doit s'accompagner d'au moins des signes suivants (Haut conseil de la santé publique, 2013) :

- isolement de *Legionella spp.* dans un prélèvement clinique ;
- augmentation des anticorps à un taux 4 fois supérieur à la normale, avec un 2^{ème} titre minimum mesuré de 128 ;
- présence d'antigènes solubles urinaires.

S'il s'agit d'un cas probable, la pneumopathie doit s'accompagner des signes suivants :

- titre(s) d'anticorps supérieur ou égal à 256 ;
- PCR positive.

4.1.2. Cas nosocomial ou cas associé aux soins

On considère un cas de légionellose comme un cas nosocomial certain lorsque le patient atteint de la maladie a séjourné dans l'établissement de santé de façon continue pendant la période présumée d'exposition (10 jours) (Haut conseil de la santé publique, 2013).

4.1.3. Cas communautaire

Un cas est considéré comme communautaire lorsque l'on ne retrouve pas d'exposition dans un établissement de santé pendant la période présumée d'exposition (Haut conseil de la santé publique, 2013).

4.1.4. Cas groupés

On parle de cas groupés lorsqu'au moins deux cas de légionellose sont survenus dans un intervalle de temps et d'espace susceptibles d'impliquer une source commune de contamination.

Ces intervalles sont à préciser selon chaque situation. Ainsi, on peut rechercher tout autre cas qui serait apparu dans les jours, mois, ou semaines précédant le cas signalé. On évite cependant les recherches dans un intervalle de temps supérieur à deux ans précédant le cas signalé. En ce qui concerne l'espace géographique, il convient de cibler les établissements recevant du public (hôtels, campings, établissement thermal, établissements d'hébergement pour les personnes âgées (EHPAD), spas, etc...), et les zones géographiques proches (agglomération, quartier, commune, etc...) (Haut conseil de la santé publique, 2013).

4.2. Déclaration obligatoire

La déclaration de la légionellose est obligatoire en France depuis 1987, et a été mise en place afin de suivre l'évolution de l'incidence, de détecter les cas groupés et de guider les mesures de prévention. En 2003, ce système de déclaration obligatoire est actualisé avec la mise en place de deux étapes successives, le signalement et la notification afin de rendre le système plus opérationnel, et d'assurer une meilleure protection de l'anonymat des patients. En 2011, une nouvelle fiche de déclaration obligatoire a été publiée, intégrant la possibilité du diagnostic par PCR. (Haut conseil de la santé publique 2013).

Ainsi, selon l'article R. 3113-4 du Code de la Santé Publique (CSP), les médecins et les biologistes qui diagnostiquent un cas de légionellose doivent effectuer un signalement sans délai au médecin de l'Agence Régionale de Santé (ARS) rattachée à leur lieu d'exercice, et ce par tout moyen approprié (Haut conseil de la santé publique 2013), (Santé Publique France, 2019), (ARS Grand Est, 2019).

Ce signalement est suivi d'une notification. Celle-ci est réalisée au moyen d'une fiche spécifique qui permettra 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 les mesures environnementales appropriées (articles R. 3113-1 à 3 du Code de la Santé Publique).

Les ARS transmettent ensuite les signalements à Santé publique France, qui sera chargée d'établir ensuite un suivi épidémiologique au niveau national (Santé Publique France, 2019).

4.3. Signalement des infections nosocomiales

Le signalement des infections nosocomiales est un dispositif réglementaire d'alerte mis en place depuis 2001 (articles L1413-14 et R 6111-12 à 17 du Code de la Santé Publique). Il permet d'identifier les événements particulièrement significatifs ou « sentinelles » (rares, graves, inhabituels, évitables, potentiellement révélateurs d'un dysfonctionnement). Ces derniers auront un rôle d'alerte et permettront par la suite de mettre en place des mesures correctives locales ou générales pour améliorer le niveau de sécurité sanitaire des établissements de santé (CPias Réseau National, 2019).

Si elle survient, une infection nosocomiale fait d'abord l'objet d'un signalement interne. L'établissement de santé transmet ensuite les fiches de signalement (Annexe 1) relevant d'un ou plusieurs critères simultanément au Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins (CPias) et à l'Agence Régionale de Santé (ARS). Cette transmission se réalise au moyen de l'application e-SIN, rendue obligatoire depuis le 1^{er} mars 2012 selon l'instruction N°DGOS/PF2/DGS/RI3/2012/75 du 13 février 2012, et est effectuée par un professionnel de santé responsable du signalement. Ce responsable du signalement, ainsi que son suppléant, sont désignés après l'avis de la commission médicale d'établissement dans les établissements de santé publics, selon l'article R61111-15 du Code de la Santé Publique (CPias Grand-Est, 2019), (Santé Publique France, 2019).

4.4. La surveillance bactériologique par le Centre National de Référence des Légionelles de Lyon

Le Centre National de Référence des Légionelles de Lyon (CNR-L) a un rôle d'expertise biologique, et contribue au diagnostic et à la surveillance épidémiologique des infections humaines causées par *Legionella*, en liaison avec Santé Publique France.

Il réalise quotidiennement des analyses de prélèvements (sérums, prélèvements pathologiques) provenant de laboratoires d'analyses publics ou privés, pour établir un diagnostic de première intention ou pour confirmer un diagnostic. Il reçoit également des souches cliniques et environnementales pour une identification précise et un typage moléculaire. En effet, les laboratoires sont dans l'obligation d'envoyer systématiquement les souches d'origine clinique au CNR-L.

Le CNR-L entretient une collection bactérienne et une sérothèque, ce qui permet d'évaluer la distribution et l'évolution des souches en France, d'identifier et d'alerter sur le caractère groupé des cas, grâce au typage moléculaire systématique des souches d'origine clinique.

De plus, le CNR-L a d'autres missions telles que l'amélioration du diagnostic des légionelloses par le développement et l'évaluation de nouvelles techniques de diagnostic, et leur diffusion au moyen de formations et d'informations auprès de biologistes et de techniciens sous forme de cycle de formations.

Le CNR-L a aussi un rôle d'alerte auprès de Santé Publique France par le signalement de l'identification de souches présentant le même profil génomique.

Enfin, le CNR-L participe également au réseau européen de surveillance des légionelloses, le réseau European Legionnaires Disease Surveillance Network (ELDSNet), lui-même coordonné par l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDPC).

4.5. Le réseau européen

En 1986, un groupe de travail, l'European Working Group for Legionella Infection (EWGLI) est mis en place afin de permettre une collaboration entre les pays européens sur la surveillance de la légionellose. Ce groupe a ensuite créé le programme européen de la légionellose associée aux voyages, l'European Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease, connu sous le nom de EWGLINET. Ce programme est coordonné par le laboratoire national de bactériologie de Stockholm en Suède, et est financé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) depuis 1993. Il change de nom en 2010 pour devenir l'European Legionnaires Disease Surveillance Network (ELDSNet), et est coordonné depuis par l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 35 pays en sont membres.

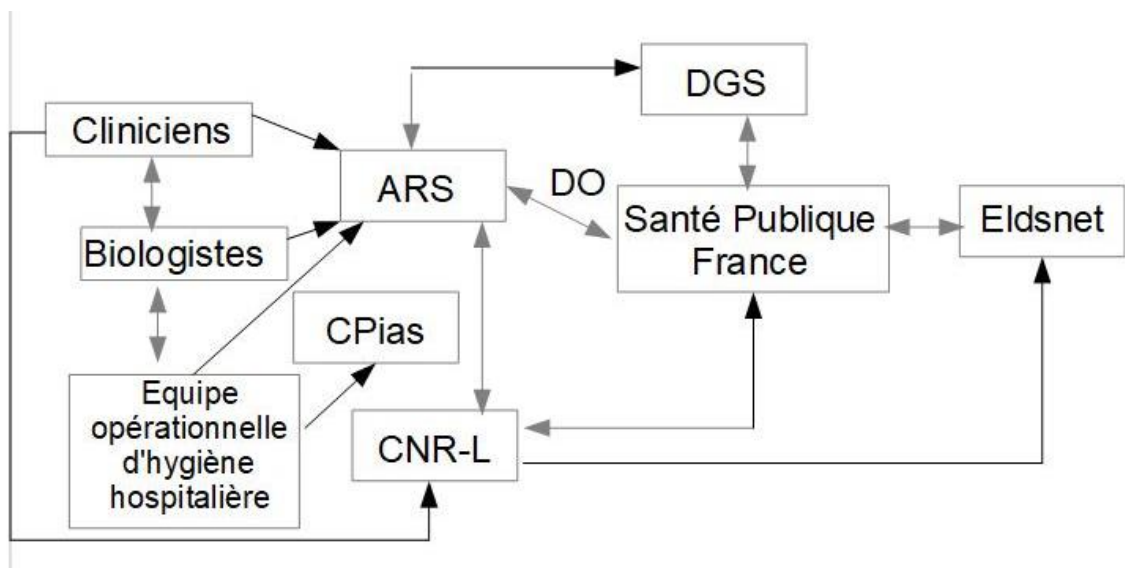
Les procédures de fonctionnement de ce programme dans l'Union Européenne (UE) ont été actualisées en 2017 (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019).

L'objectif du réseau ELDSNet est de maîtriser le risque de légionellose associé aux voyages et d'identifier les cas groupés, appelés « Cluster Eldsnet », c'est-à-dire au moins deux cas de patients ayant séjourné dans un même établissement de tourisme dans une période de deux ans. Une légionellose liée au voyage concerne tout patient ayant voyagé pendant les 10 jours précédant le début de la maladie. Lorsqu'un touriste européen contracte une légionellose lors d'un voyage, son pays d'origine envoie une notification à l'European Centre

for Disease and Control (ECDC). On recherche alors d'autres cas qui pourraient être liés. S'il s'agit d'un cas isolé, seul le pays dans lequel la source est suspectée est averti. En revanche, si deux cas de légionellose sont survenus dans un même établissement touristique dans les deux dernières années, tous les pays membres du programme ELDSNet sont prévenus. De plus, le pays dans lequel la source est suspectée devra entreprendre une investigation ainsi que des mesures correctives (Haut conseil de la santé publique, 2013), (Delarras 2014).

La figure 4 résume système actuel de surveillance de la légionellose en France, ainsi que les liens entre les différents acteurs de cette surveillance.

Figure 4 : Schéma du système de surveillance de la légionellose en France d'après « Risque lié aux légionelles – Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).



5. Surveillance environnementale

La surveillance environnementale est aussi un élément de prévention important. En effet, les sources de contamination humaine par les légionelles sont d'origine environnementale. La concentration en légionelles dans les installations à risque, c'est-à-dire celles exposant les personnes à des aérosols de diamètre inférieur à 5 µm doit donc être contrôlée régulièrement, comme cela est recommandé dans de nombreux pays d'Europe (Lee et al., 2002).

5.1. Réglementation

En France, la surveillance des installations à risque vis-à-vis de la présence de légionelles est règlementée (tableau 4). Elle impose notamment la réalisation régulière de prélèvements et analyses pour la recherche de légionelles dans les réseaux d'eaux chaudes sanitaires (ECS) des établissements recevant du public, des établissements de santé, dans les réseaux d'eaux thermales, ou encore dans les tours aérorefrigérantes (TAR) (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Les résultats des analyses permettent d'évaluer s'il existe ou non un risque d'exposition aux légionelles. Ils sont comparés à des seuils de concentrations maximales admissibles. Toutefois, un résultat seul, hors de son contexte, ne permet pas de juger d'un risque d'exposition. Il convient d'interpréter ce résultat en regard de d'autres éléments tels que le risque d'exposition (nombre et état de santé des personnes exposées), le type et l'état de l'installation concernée, les antécédents sur cette installation, et la survenue ou non d'événements comme des travaux ou une panne. Ces informations évaluées dans leur

ensemble permettront d'apprécier plus précisément le risque d'exposition (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Les concentrations seuils en légionelles à respecter diffèrent d'une installation à l'autre, comme indiqué dans le tableau 4 suivant, qui récapitule l'ensemble des concentrations seuils à respecter selon chaque type d'installation. Les installations qui exposent des personnes particulièrement sensibles (patients immunodéprimés, patients de services de réanimation, etc.) au risque de légionelle auront ainsi une concentration seuil admissible en légionelles moins élevée que d'autres installations exposant des populations en bonne santé.

Tableau 4 : Synthèse des concentrations seuils à respecter et leurs références, selon chaque type d'installation, d'après « Le risque lié aux légionelles - Guide d'investigation et d'aide à la gestion », (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Type d'installation	Concentrations seuils à respecter et références
Réseau ECS (dans des ERP)	D'après l'arrêté du 1 ^{er} février 2010 : 1 000 UFC de Lp / L au niveau de tout point d'usage à risque.
Réseau ECS exposant des patients « particulièrement vulnérables au risque de légionellose » dans les établissements de santé	D'après l'arrêté du 1 ^{er} février 2010, la circulaire du 22 avril 2002 et la circulaire du 21 décembre 2010 : <ul style="list-style-type: none"> • Concentration inférieure au seuil de détection + • Absence au niveau de tout point d'usage à risque.
Réseau d'eau thermale	D'après arrêté et circulaire du 19 juin 2000 : <ul style="list-style-type: none"> • Absence (concentration inférieure au seuil de détection de la méthode normalisée) pour Legionella spp et L.pneumophila
Bain à remous ou à jet	D'après la circulaire du 27 juillet 2010 : La réglementation des piscines non réservées à l'usage personnel d'une famille s'applique, les Lp ne doivent pas être détectées.
Autre installation à risque	D'après la circulaire du 22 avril 2002 : - Concentration en Lp inférieure au seuil de détection.
Tar	D'après les arrêtés du 14 décembre 2013 : <ul style="list-style-type: none"> • Seuil d'action : 1 000 UFC L.pneumophila/L (ou présence d'une flore interférente) • Seuil d'arrêt : 100 000 UFC L.pneumophila/L

La traçabilité de ces analyses doit être impérativement tenue à jour et mise à disposition des autorités sanitaires.

Lorsqu'une concentration seuil supérieure aux concentrations admises par la réglementation est détectée sur une installation à risque, la priorité est de protéger les utilisateurs de cette installation soit en condamnant l'usage de l'installation, soit en équipant les points d'usage avec des filtres terminaux « anti-légionelles ». Des actions correctives sont ensuite mises en place pour éliminer la contamination, comme l'augmentation des soutirages par l'ouverture des robinets à plein débit, le réglage des températures au-delà de 55°C ou encore la désinfection (Haut conseil de la santé publique, 2013).

En complément de ces actions correctives mises en place, d'autres mesures doivent être envisagées. Il faut notamment rechercher les cas liés à la source d'exposition, et proposer

des actions de maintenance telles que des travaux pour améliorer l'état du réseau (modification de la configuration du réseau, rénovation partielle ou totale). La réglementation impose également des relevés de températures aux points à risque, ainsi que la réalisation d'analyses complémentaires à distance afin de s'assurer de l'efficacité des actions correctives (Haut conseil de la santé publique, 2013).

5.2. Analyses environnementales

La réglementation impose que les prélèvements et analyses pour la recherche de légionelles soient réalisés selon la norme NF T90-431 par un laboratoire accrédité par le Comité Français d'Accréditation (Cofrac) ou équivalent. Cette obligation réglementaire permet, en effet, de garantir le niveau de compétence du laboratoire choisi pour pratiquer les analyses (Groupe AFNOR, 2005).

5.2.1. Norme NF EN ISO/CEI 17025 : 2005 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais

En France, le Cofrac est l'unique instance autorisée à délivrer des accréditations. Pour être accrédités, c'est-à-dire pour que leurs compétences soient formellement reconnues, les laboratoires d'étalonnage et d'essais doivent respecter la norme NF EN ISO/CEI 17025. Ce référentiel, applicable à l'ensemble des laboratoires d'étalonnage et d'essais, à l'exception des laboratoires de biologie médicale, définit en effet l'ensemble des exigences à satisfaire pour apporter la preuve qu'un laboratoire gère un système de management qualité et qu'il est techniquement compétent et capable de produire des résultats fiables. Elle couvre les

essais et/ou les étalonnages effectués au moyen de méthodes normalisées ou non, ou grâce à des méthodes développées par le laboratoire (Cofrac 2019), (Groupe AFNOR, 2005).

5.2.2. Recherche et dénombrement de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* selon la norme NFT90-431

En France, la méthode de référence pour la recherche et le dénombrement de *Legionella spp.* et de *Legionella pneumophila* est la mise en culture telle que décrite dans la norme NF T90-431 en vigueur (AFNOR, 2017). Elle comporte plusieurs étapes, avec un ensemencement direct, suivi d'une concentration par filtration ou de centrifugation associés à différents traitements en fonction du type d'eau à analyser.

5.2.2.1. Mise en culture des prélèvements

Les échantillons destinés à être analysés sont prélevés dans des récipients stériles spécifiques contenant un neutralisant, et sont acheminés le plus rapidement possible au laboratoire. Tous les ensemencements sont effectués le même jour, au plus tard le lendemain des prélèvements.

On distingue les eaux « propres » des eaux « sales ». 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 (spas) (Haut conseil de la santé publique, 2013).

Les eaux sales correspondent quant à elles aux eaux industrielles, aux eaux de surface, aux eaux naturelles, et aux eaux des Tours Aéro Réfrigérantes (TAR). Les eaux sales ont pour particularité de contenir des dépôts. Ces derniers peuvent colorer la membrane utilisée pour filtrer les échantillons, ce qui peut empêcher le repérage de certaines colonies de *Legionella*. Certaines eaux propres contiennent elles aussi des dépôts, et doivent dans ce cas être considérées et traitées comme des eaux sales (Haut conseil de la santé publique 2013).

Qu'il s'agisse d'une eau propre ou d'une eau sale, on réalise en premier lieu un ensemencement direct. Il est exécuté sur un milieu sélectif GVPC (Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide), qui a pour base le milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), et contient du charbon activé, de l'extrait de levure, de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer. Le milieu GVPC contient plusieurs antibiotiques : la polymyxine B qui est active sur les bactéries à Gram négatif, la vancomycine, de la famille des glycopeptides, qui est active sur un grand nombre de bactéries à Gram positif et le cycloheximide, qui inhibe les levures et les moisissures (Zhang et al. 2013).

Selon la norme, pour les eaux propres, on va ensuite réaliser une concentration par filtration, qui est effectuée sur une membrane en nitrate ou en esters de cellulose. Cette membrane est traitée avec un tampon acide (pH = 2,2), puis rincée avec de l'eau purifiée stérile. Elle est enfin transférée sur le milieu de culture sélectif GVPC.

Concernant les eaux sales, le protocole est différent. Il faut préparer un concentrât et deux techniques sont possibles pour le réaliser : la filtration sur membrane de polycarbonate ou la centrifugation.

Après cette étape de concentration par filtration ou de concentration par centrifugation, une partie du concentrât récupéré est ensemencée sur milieu GVPC.

Le volume de concentrât restant sera ensuite divisé en trois parties, qui seront traitées de trois manières différentes : la première par un traitement acide (pH 2), la deuxième par un traitement thermique (chaleur), et la troisième par un traitement associé (acide et thermique). Ces trois parties serontensemencées sur un milieu sélectif GVPC.

Les milieuxensemencés sont ensuite mis à incuber dans une enceinte thermostatée à $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, pendant une période de huit à onze jours. Les géloses sont examinées à au moins à trois reprises entre le troisième jour et le dernier jour d'incubation.

5.2.2.2. Confirmation des colonies présumptives

A l'issue de cette période d'incubation, le nombre de colonies caractéristiques présentes dans les différentes boites est évalué avant d'être confirmé.

Les colonies caractéristiques présentent un aspect en verre fritté à la loupe binoculaire avec une coloration grise ou blanche. Les colonies présentes sur membrane auront un aspect plus bombé que celles obtenues par ensemencement direct. Certaines colonies seront fluorescentes sous la lampe de Wood, et on doit considérer les colonies qui apparaissent sur les boites avec membrane comme étant de type différent de celles qui apparaissent sur les boitesensemencées en direct.

De plus, de manière générale, les colonies de *Legionella spp* auront une croissance plus lente que les colonies de *Legionella pneumophila*.

Ces colonies caractéristiques sont repiquées dans un ordre spécifique, tout d'abord sur une gélose BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract) sans L-cystéine, puis sur une gélose BCYE α

avec L-cystéine. Les boîtes sont ensuite placées en enceinte thermostatée à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, et lues à partir de 48h d'incubation.

Toute colonie caractéristique qui pousse uniquement sur gélose BCYE α avec L-cystéine est considérée comme appartenant au genre *Legionella*. L'identification au rang d'espèce est ensuite effectuée selon une des méthodes de référence préconisée par la norme NF T90-431 (AFNOR, 2017).

5.2.2.3. Identification

Selon la norme NF T90-431, toutes les colonies repiquées confirmées comme *Legionella*, et non fluorescentes sous la lampe de Wood, doivent être testées en vue de la confirmation de *Legionella pneumophila*. Deux méthodes sont actuellement considérées comme méthodes de référence : l'immunofluorescence et l'agglutination au latex en présence d'anticorps *anti-L. pneumophila*, ces deux techniques reposant sur le même principe de méthode (réaction antigène-anticorps).

La méthode par immunofluorescence directe nécessite l'utilisation d'un réactif de coloration qui contient des anticorps marqués avec un colorant qui vont réagir avec une protéine présente dans la membrane externe de tous les sérogroupes connus de *L. pneumophila*. Les colonies à identifier sont mises en présence de ce réactif, puis observées sous microscope à fluorescence où les *L. pneumophila* apparaissent sous forme de bacille ou coccobacille fluorescent vert pomme (Bio-Rad, 2009).

L'immunofluorescence directe est une méthode fiable, mais la manipulation est longue du fait des différentes étapes de rinçage et de fixation (Bio-Rad, 2009). De plus, l'immunofluorescence ne permet pas de différencier les différents sérogroupes de légionelles, et est une technique relativement coûteuse.

La technique d'agglutination au latex pour l'identification des légionelles est une agglutination dite passive car les anticorps normalement solubles sont rendus particuliers par association avec des particules de latex.

Les colonies à identifier sont soit prélevées directement (test direct), soit émulsionnées au préalable (méthode en tube, recommandée en cas de consistance filamenteuse des souches), et sont ensuite mélangées avec une goutte des différents latex sensibilisés dirigés contre les antigènes spécifiques de la paroi des espèces prédominantes des légionelles. Si l'antigène recherché est présent, on observera une agglutination. En revanche, s'il est absent, aucune réaction n'apparaîtra (Delarras, 2014).

Cette méthode permet de différencier les différents sérogroupes de *Legionella pneumophila* (séro groupe 1, séro groupe 2-14, ou 2-15 selon les kits utilisés), et certaines *Legionella spp.*

Cette technique présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre à température ambiante ; elle est simple d'utilisation, et permet une lecture à l'œil nu ainsi qu'un résultat rapide (Darani et al., 2010). Cependant, elle présente plusieurs limites. Des réactions croisées peuvent ainsi se produire entre certains sérogroupes, et si les colonies analysées sont trop anciennes, il peut se produire des réactions filamenteuses rendant le test difficilement interprétable (Oxoid, 2019). Enfin, cette méthode nécessite un certain temps de réalisation, et l'inconvénient majeur est une inhibition de la réaction par excès

d'antigènes (si on met un volume trop important d'échantillon à analyser, la réaction ne fonctionne pas). Un autre inconvénient est un coût relativement élevé.

5.2.2.4. Méthodes alternatives

Depuis sa révision en 2017, la norme NF T90-431 ouvre également la possibilité, sous réserve de validation appropriée, de mettre en œuvre des méthodes alternatives pour l'identification et la confirmation des colonies présomptives de *L. spp* et *L. pneumophila*. Des techniques comme la Polymerase Chain Reaction (PCR) temps réel ou comme la spectrométrie de masse (MALDI TOF) peuvent ainsi être mises en œuvre.

La polymerase chain reaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier une séquence d'ADN connue après extraction grâce à l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase et d'amorces oligonucléotidiques. La méthode est sélective. Cette sélectivité résulte de la spécificité des amorces nucléotidiques de la séquence à amplifier (Bej et al., 1991) (Wellinghausen et al., 2001). Dans le cas de la PCR en temps réel, l'ADN amplifié est détecté grâce à l'ajout dans le milieu réactionnel des sondes spécifiques marquées par un fluorochrome qui émet de la fluorescence seulement après hybridation aux copies d'ADN. L'évolution de la fluorescence est mesurée à chaque cycle d'amplification par le lecteur optique d'un thermocycleur, ce qui permet d'obtenir une cinétique complète de la réaction de polymérisation, et de déterminer la quantité initiale d'ADN cible (unités génome) par comparaison avec des échantillons de concentration connue (Wilson et al., 2003), (Wellinghausen et al., 2001).

Cette méthode particulièrement sélective vis à vis de l'identification de *L. pneumophila*, présente l'avantage d'exister sous forme de kits commerciaux certifiés AFNOR pour leur conformité à la norme NF T90-471.

Cela signifie que les performances de la méthode ont été vérifiées en amont par le fabricant et que le laboratoire utilisateur peut se contenter d'une vérification simplifiée (selon le protocole décrit dans l'annexe F de la norme NF T90-431) pour pouvoir rendre un résultat d'identification sous accréditation.

Cependant, la mise en œuvre de cette méthode d'identification est délicate et le coût des coffrets reste important (AFNOR Association Française de Normalisation, 2017), (Bio-Rad, 2020), (Carbonnelle et Nassif, 2011).

L'application de la spectrométrie de masse à l'identification des germes et autres microorganismes est apparue dans les années 1970 (Anhalt et Fenselau, 1975). La spectrométrie de masse MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) est quant à elle mise au point en 1985 par deux chercheurs allemands, Franz Hillenkamp et Michael Karas, à l'université de Francfort (Karas et al., 1985).

Avec cette méthode d'identification, les microorganismes à analyser sont d'abord ionisés, puis les molécules ainsi produites sont séparées et détectées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). On obtient alors différents spectres de masse. C'est en comparant les spectres obtenus avec ceux d'une banque de spectres que l'on peut identifier le microorganisme recherché.

Le succès grandissant de cette technique est lié à sa rapidité, sa précision, son efficacité, son moindre coût, et sa simplicité d'utilisation (Carbonnelle et Nassif, 2011).

Contrairement à la qPCR, il n'y a malheureusement à ce jour aucune certification AFNOR pour l'identification de *Legionella pneumophila* par spectrométrie de masse. Cependant, il est possible de rendre sous accréditation des résultats d'identification obtenus avec cette méthode, si celle-ci est validée en amont selon les exigences de la norme NF T90-500. Le travail est très conséquent, mais cette méthode d'identification présente beaucoup d'avantages. C'est pourquoi, il a été décidé de valider cette méthode alternative d'identification en laboratoire, notamment afin de palier certaines insuffisances rencontrées avec les méthodes de référence.

Partie II : Travaux personnels : Validation de la spectrométrie de masse pour l'étape d'identification de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* – Comparaison avec une méthode de référence

1. Objectifs et principes

La surveillance du risque Légionelle est une des missions principales du laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen. En effet, environ 450 à 500 prélèvements et analyses sont réalisés tous les ans pour le CHU lui-même ou pour des clients extérieurs dans le cadre de cette surveillance. Conformément à la réglementation, le laboratoire est accrédité Cofrac selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour les prélèvements et analyses des eaux de réseaux et de tours aérofrigorantes, en vue de la recherche de *Legionella pneumophila* et *Legionella spp*. Les prélèvements et analyses sont effectués selon la norme NF T90-431 et les résultats associés sont rendus sous accréditation.

L'étape d'identification des colonies présomptives est actuellement réalisée grâce à la technique d'agglutination au latex, mais au cours des années 2016 et 2017, le laboratoire a rencontré plusieurs difficultés d'identification avec le kit commercial utilisé pour réaliser les agglutinations. En effet, à plusieurs reprises, des souches connues comme étant des souches de *L. pneumophila* ont été identifiées à *L. spp* avec certains lots de kit d'agglutination.

Ces souches étaient issues de prélèvements de contrôle effectués au niveau de réseaux ou de points d'usage initialement contaminés par *L. pneumophila*. Le fait de retrouver uniquement des souches de *L. spp* dans ces prélèvements a donc alerté le laboratoire qui a

alors mis en œuvre des techniques complémentaires d'identification, comme l'immunofluorescence, qui sont venues confirmer ses doutes puisqu'il s'agissait bien de souches de *L. pneumophila*.

Ce problème étant récurrent, le laboratoire a donc demandé et obtenu une extension de sa portée d'accréditation pour pouvoir rendre sous accréditation les résultats des identifications effectuées par immunofluorescence (Cofrac, 2017).

L'immunofluorescence est une technique fiable pour l'identification des légionelles, mais les kits commerciaux disponibles restent onéreux et la technique est relativement longue à mettre en œuvre. Le laboratoire a donc envisagé la possibilité de mettre en œuvre une méthode alternative pour pouvoir identifier plus facilement les souches problématiques.

La PCR en temps réel a été dans un premier temps envisagée du fait de l'existence sur le marché de kits commerciaux certifiés AFNOR pour leur conformité à la norme NF T90-471. La certification tierce partie facilite, en effet, considérablement le travail de validation nécessaire à l'accréditation de cette technique. Cependant, en routine, la PCR temps réel reste assez délicate à mettre en œuvre et le coût des coffrets est non négligeable.

Le laboratoire d'hygiène a donc finalement décidé de retenir comme alternative aux méthodes de référence, l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ; le département de microbiologie étant équipé d'un spectromètre MALDI-TOF MS.

En effet, le MALDI TOF MS, est une méthode d'identification de microorganismes en plein essor dans les laboratoires de microbiologie qui présente l'avantage de pouvoir être facilement utilisée par l'ensemble de l'équipe technique. De plus, elle est plus précise que les techniques classiques utilisées, et est très rapide car elle peut rendre des résultats en moins d'une heure, voire en quelques minutes. Enfin, le coût d'une identification est

moindre comparé à celui d'autres méthodes, aujourd'hui pratiquées en routine (Carbonnelle et Nassif, 2011).

Pour pouvoir mettre en œuvre cette méthode et rendre une identification de *Legionella pneumophila* ou *Legionella spp* sous accréditation, le laboratoire doit effectuer une validation préalable, complète selon la norme XP T90-500, comme indiqué dans la norme NF T90-431. En effet, il n'existe pas actuellement de certification tierce partie de cette méthode sur le marché. C'est donc sur cette validation de l'identification de *Legionella pneumophila* et de *Legionella spp* par spectrométrie de masse qu'a porté le travail présenté ci-après, et plus particulièrement sur la comparaison de cette méthode avec la méthode d'agglutination au latex.

2. Matériels et méthodes

2.1. Agglutination au latex

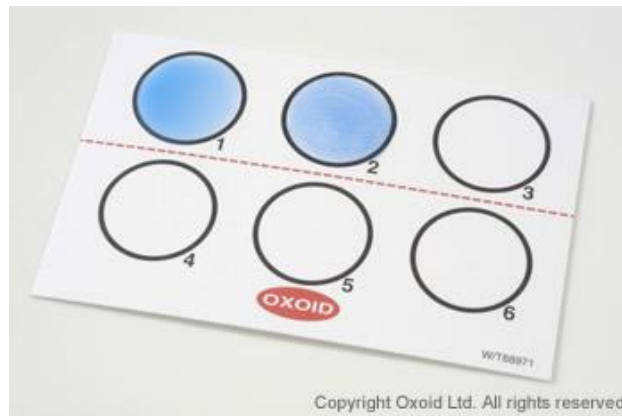
Selon la norme NF T90-431, L'agglutination au latex est une des deux méthodes de référence pour l'identification des légionelles. Au laboratoire d'hygiène hospitalière du CHU de Rouen, ce sont des coffrets de Legionella Latex Test® commercialisés par Oxoid® qui sont utilisés.

Ils sont constitués :

- d'un réactif pour *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 constitué particules de latex bleu sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant avec l'antigène *Legionella pneumophila* séro groupe 1.
- d'un réactif pour *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14, constitué de particules de latex bleu sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant avec l'antigène *Legionella pneumophila* séro groupe 2-14,
- d'un réactif pour *Legionella spp.*, constitué de particules de latex bleu sensibilisées par des anticorps de lapin spécifiques réagissant avec les antigènes des légionelles des espèces et sérotypes suivants : *L. longbeachae* 1 & 2, *L. bozemanii* 1 & 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*.

Ces coffrets contiennent également des suspensions de contrôles positif et négatif qui permettent de vérifier le bon fonctionnement des réactifs latex à chaque utilisation du coffret. Un test latex de contrôle permet de s'assurer que les souches à identifier ne sont pas autoagglutinables (Oxoid, 2019).

Figure 5 : Une carte de réaction, d'après Réactifs de diagnostic Oxoid – Product Detail (Oxoid, 2019).



Le coffret étant conservé dans une enceinte réfrigérée, il faut d'abord laisser les réactifs à température ambiante et les homogénéiser avant de les utiliser.

Pour réaliser un test d'agglutination, une goutte des trois réactifs (*Legionella pneumophila* de sérotype 1, et de sérotype 2-14, et *Legionella spp*) est déposée sur le bord de chacun des trois cercles de la carte de réaction, ainsi qu'une goutte de solution tampon en veillant à ce que les réactifs et la solution ne se touchent pas à cette étape de l'opération. La colonie à identifier est ensuite prélevée à l'aide d'une oese, puis dissoute dans la solution tampon jusqu'à obtenir une suspension homogène. Enfin, le réactif et la suspension sont mélangés. L'opération est répétée pour les trois réactifs sur cette même colonie. Lorsque les mélanges des réactifs et des suspensions sont effectués, la carte est soumise à un mouvement rotatif pendant une minute. La réaction est positive si une agglutination des particules de latex bleu apparaît dans un des cercles en une minute. Cela indique la présence des antigènes du sérotype de *Legionella* correspondant dans la colonie testée (Oxoid, 2019).

2.2. MALDI-TOF MS

La spectrométrie de masse est utilisée dans l'identification de microorganismes depuis les années 1970, mais c'est avec l'apparition de techniques comme le MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight*) ou l'ESI (*electrospray ionisation*) qu'elle s'est de plus en plus imposée comme une alternative de choix dans les laboratoires d'analyses et de recherche (Karas et Hillenkamp 1988), (Gonçalves et al. 2007).

C'est une méthode analytique qui permet l'ionisation des molécules. Ces molécules ainsi produites seront séparées, puis détectées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Un spectromètre va pouvoir ainsi mesurer la masse des molécules isolées.

Un spectromètre se divise principalement en quatre parties : un système d'introduction, une source ou chambre d'ionisation, un analyseur, et un détecteur.

Le système d'introduction permet d'introduire l'échantillon à analyser directement dans l'appareil soit sous forme gazeuse, liquide, ou solide, de dépôt sur une plaque, etc., ou par addition à une autre méthode séparative (chromatographie sur couche mince par exemple).

La source d'ions, ou chambre d'ionisation, quant à elle, sépare les molécules les unes des autres, et les ionise dans un champ magnétique ou électrique, c'est-à-dire qu'elles passent d'un état condensé à un état gazeux. Il existe de nombreuses sources d'ionisation mais deux sources d'ionisation sont principalement utilisées pour identifier des peptides ou des protéines dans un milieu biologique : le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) et l'ESI (Electrospray Ionization). LE MALDI permet notamment la formation d'ions chargés +1, alors que l'ESI permet la formation d'ions multichargés (+2, +3, +4, +5) (Sellier, 2002).

L'analyseur sépare ensuite les ions selon le rapport m/z (masse/charge). Pour l'étude des protéines, les analyseurs les plus employés sont des analyseurs haute résolution comme la trappe ionique (Orbitrap), l'analyseur à temps de vol (TOF, time of flight) ou le quadripôle (Q) (Fenselau, 2013).

Enfin, le détecteur permet de compter les ions en transformant un signal ionique en signal électrique. Ce signal est amplifié par ce même détecteur pour qu'il puisse être traité informatiquement. Différents spectres de masse sont alors obtenus. C'est en comparant ces spectres avec ceux d'une banque de spectres que l'on parvient à identifier les molécules recherchées (Polet et al., 2015).

Le département de microbiologie du CHU de Rouen est équipé d'un spectromètre de masse MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) Bruker Daltonics®. Cette technique rapide s'est récemment imposée dans les laboratoires, et permet l'identification des microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce (Moliner et al., 2010).

Le principe général repose sur la dégradation des bactéries et l'ionisation des protéines bactériennes qui peuvent ensuite être séparées en fonction de leur masse. Pour chaque germe à identifier, on obtient ainsi une série de pics (ou spectre).

Chaque espèce ayant ses propres protéines, le profil de pics obtenu est caractéristique d'une espèce. A partir de la comparaison, à l'aide d'un logiciel, avec une banque de profils, on peut ainsi déterminer le nom de la souche recherchée avec plus ou moins de certitude selon l'indice de fiabilité entre les profils (Polet et al., 2015).

Les souches à identifier par MALDI-TOF sont préparées à partir de cultures bactériennes fraîches obtenues dans les mêmes conditions de croissance (temps, température, milieux),

ces paramètres étant indispensables pour obtenir des résultats fiables et reproductibles (Polet et al., 2015). Les échantillons à analyser sont ensuite déposés sur une plaque cible en métal constituée de puits, une souche par puits, puis recouverts d'une couche de matrice, comme le décrivent schématiquement les figures 6 et 7. Cette matrice BTS (Bacterial Test Standard), permet une co-cristallisation de l'échantillon à analyser. Elle assure également la protection de l'échantillon contre le contact direct du faisceau ionisant tout en absorbant l'énergie provenant de celui-ci pour permettre la vaporisation en ions (Polet et al., 2015), (Moliner et al., 2010),(Carbonnelle et Nassif, 2011).

Figure 6: Préparation et dépôt d'une souche sur une cible MALDI-TOF, d'après « Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales », (Sauget, 2016).

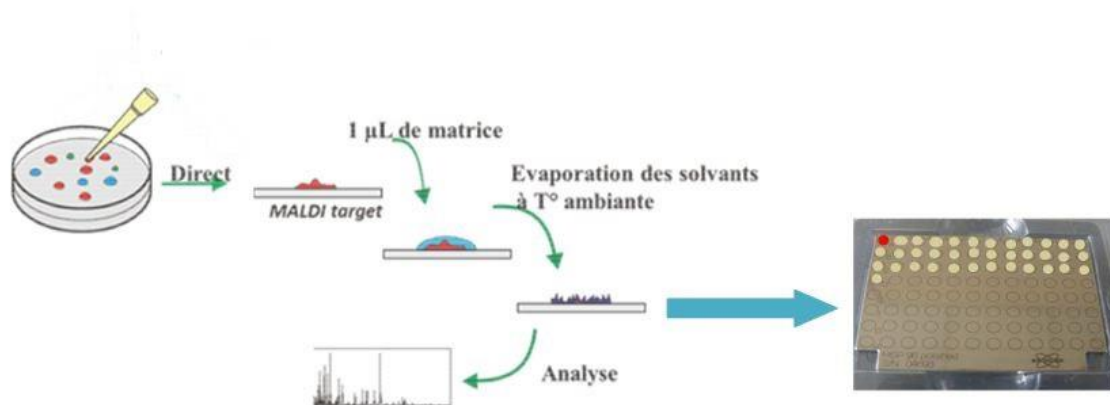
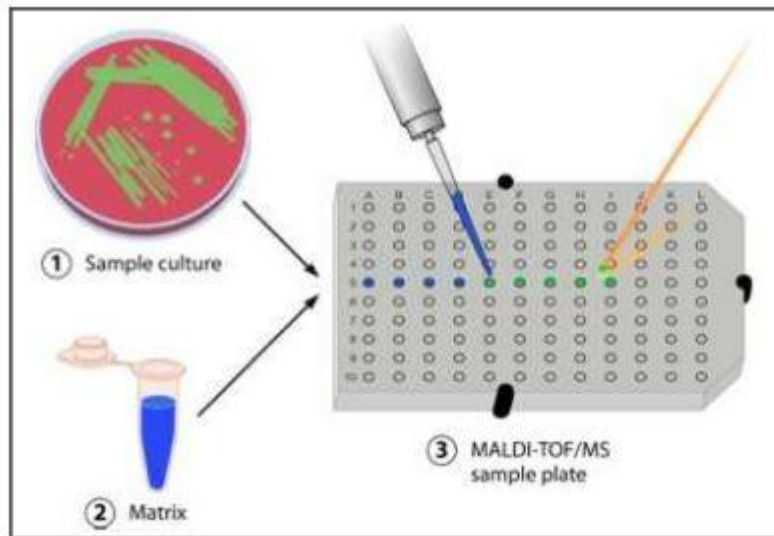


Figure 7 : Etapes de la préparation et du dépôt d'une souche sur cible de MALDI-TOF, d'après « Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of Escherichia coli pathotypes », (Clark et al., 2013).



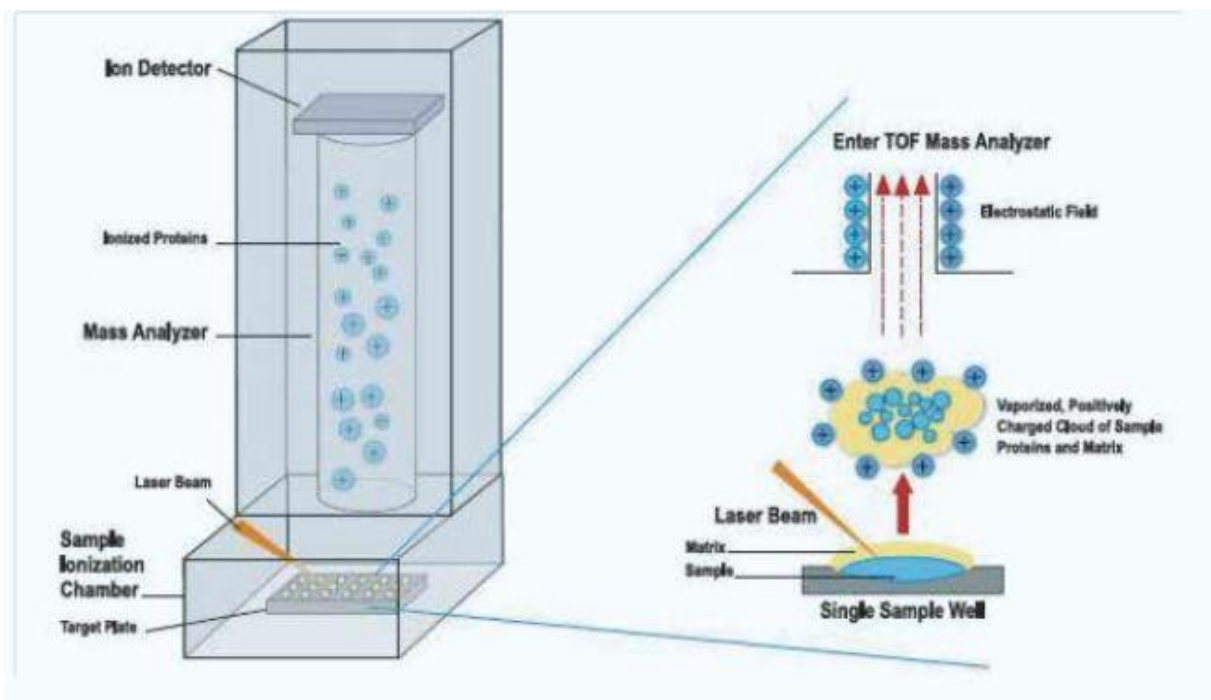
La plaque cible métallique ainsi préparée est placée dans le spectromètre. Les dépôts sont alors tous soumis à l'action du faisceau UV laser. La matrice va ensuite absorber l'énergie du laser UV et la transférer aux protéines bactériennes qui vont alors s'ioniser positivement. Ces ions ainsi formés, chargés (+1) et de masse différente sont alors mis en mouvement sous l'action d'un champ électrique (Polet et al., 2015), (Carbonnelle et Nassif, 2011).

Après ce passage dans le champ électrique, les ions atteignent l'analyseur (TOF) qui sépare les ions selon le rapport masse sur charge (m/z). Les ions traversent ensuite plusieurs grilles d'extraction avant d'atteindre le tube de vol au bout duquel est situé le détecteur.

Les différents ions sont alors séparés selon leur temps de vol (time of flight) ; les ions de petite taille atteignant en premier le détecteur, les plus gros mettant plus de temps à se

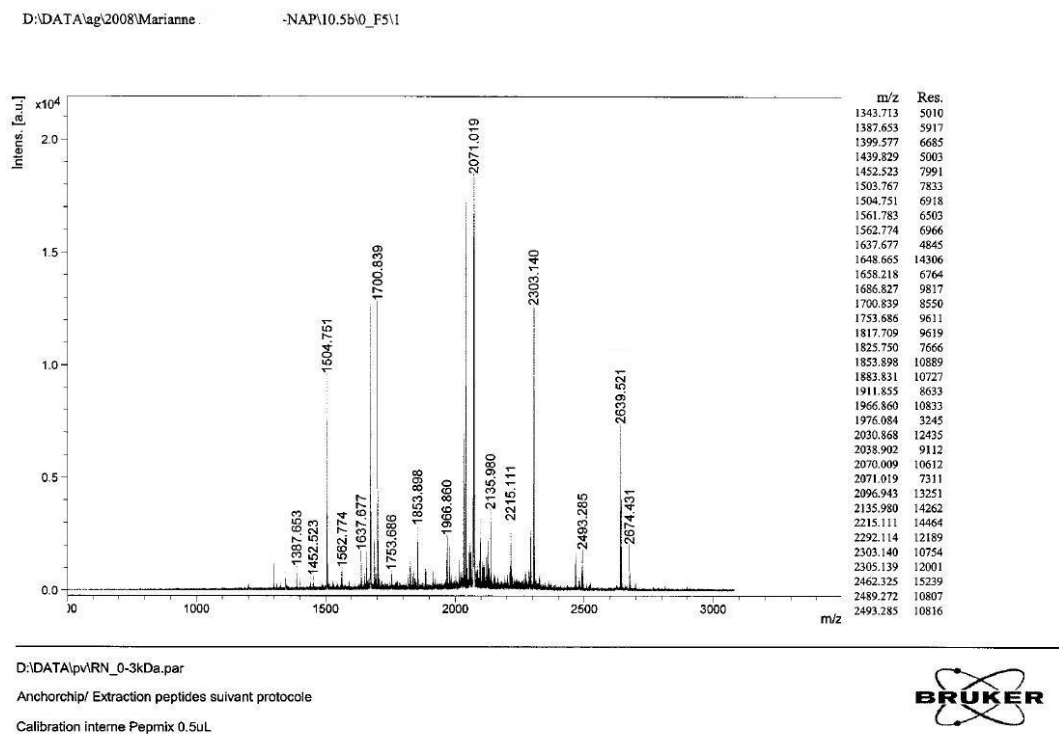
déplacer. Le temps de vol est donc fonction de la masse de chaque particule et c'est la somme de tous les ions analysés qui va permettre l'établissement du spectre caractéristique de l'échantillon (Polet et al., 2015), (Carbannelle et Nassif, 2011), (Moliner et al., 2010). La figure ci-après résume schématiquement le fonctionnement du MALDI-TOF.

Figure 8 : Fonctionnement du MALDI-TOF MS, d'après « Maldi-Tof comme outil d'identification de pathogènes alimentaires » (Polet et al. 2015).



Sur un spectre caractéristique, l'axe des abscisses correspond au rapport m/z tandis que celui des ordonnées correspond à l'intensité du signal, comme le montre la figure 9 (Carbannelle et Nassif, 2011).

Figure 9 : Spectre de masse caractéristique obtenu avec le MALDI-TOF MS Bruker Daltonics®, d'après « Spectromètre de masse MALDI-TOF », (INRAE, 2009)



Le système fourni par Bruker Daltonics® associé au spectromètre le logiciel Biotyper®. Il permet l'identification des bactéries, mycobactéries, champignons, et échantillons d'hémocultures positives (Jamal et al., 2013), (Panda et al., 2013), (Pinto et al., 2011), (Seng et al., 2009). La position, la fréquence des pics et leur intensité sont les différents paramètres pris en compte pour l'analyse des données des spectres. Ces derniers sont ensuite comparés à une banque de données issue de répétitions spectrales de souches de

référence. Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est obtenu. Il détermine ainsi le classement des résultats. Un score compris entre 2,33 et 3 correspond ainsi à une très probable identification d'espèce. Un score plus faible, compris entre 2 et 2,32 indique une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce. Enfin, un score affiché entre 1,7 et 1,999 est synonyme d'une probable identification de genre, mais nécessitant d'autres tests. Les scores inférieurs à 1,699 ne permettent pas d'identification et l'échantillon doit donc être repassé ou soumis à d'autres tests. La figure 11 montre comment se présente un résultat d'identification obtenu avec le système MALDI-Biotyper® (Sauget, 2016).

Figure 10 : Résultats d'identification obtenus avec le système MALDI-Biotyper®, d'après « Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales. », (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), (Sauget, 2016).

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

2.3. Validation selon le projet de norme NF T90-500

Le projet de norme, le NF T90-500 « Qualité de l'eau – Validation de méthode de confirmation et d'identification » (AFNOR, 2016), a été rédigé pour répondre à la demande des laboratoires qui souhaitent mettre en place des méthodes alternatives innovantes comme le MALDI TOF par exemple, pour confirmer et/ou identifier des micro-organismes. Il

définit les différentes étapes et critères à respecter pour valider une méthode de confirmation et/ou d'identification alternative. Il est ainsi nécessaire de déterminer l'étape d'application de la méthode d'identification, de réaliser une étude d'inclusivité et d'exclusivité et enfin de caractériser la méthode en terme de répétabilité, reproductibilité et de comparaison avec la méthode de référence décrite dans la norme analytique de référence (AFNOR, 2016).

2.3.1. Choix de l'étape d'application de la méthode

Selon la norme de validation, la méthode alternative de confirmation et d'identification doit pouvoir être mise en œuvre dès l'obtention d'un résultat positif présumé de la méthode de référence. Dans le cas de l'analyse des légionelles, il est possible de réaliser soit directement une confirmation et une identification par spectrométrie de masse à partir de colonies caractéristiques isolées sur gélose GVPC, soit uniquement une identification sur des colonies confirmées sur gélose BCYE avec cystéine. C'est cette deuxième possibilité qui a été retenue pour la réalisation de ce travail.

2.3.2. Etude d'inclusivité et d'exclusivité

L'étude de ces deux paramètres permet d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la méthode.

Pour étudier l'inclusivité, il faut tester au moins 75 souches positives du microorganisme cible (*Legionella*), ce nombre comprenant à la fois des souches de référence (30 si possible) et des souches issues de l'environnement et préalablement caractérisées.

Pour étudier l'exclusivité, il convient de tester un minimum de 100 souches négatives vis-à-vis du microorganisme cible (*Legionella*) ; Il s'agit d'étudier des souches proches phylogénétiquement, et si possible de tester également des souches habituellement analysées par le laboratoire. De plus, si l'objectif est d'identifier une espèce en particulier (ici *Legionella pneumophila*), il est nécessaire de tester les autres espèces du genre.

Cette étude n'a pas pu être réalisée lors de ce travail, faute de temps et de moyens. Durant l'été 2018, le fabricant du MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics®, a été contacté afin de savoir si cette étude d'inclusivité et d'exclusivité avait été réalisée en regard du projet de norme NF T90-500, et si une certification était envisagée. Devant sa réponse négative, il conviendra de réaliser ultérieurement cette étude, pour pouvoir rendre un dossier de validation complet.

2.3.3. Caractérisation de la méthode

2.3.3.1. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité et la reproductibilité sont des paramètres qui permettent de définir la fidélité d'une méthode.

La répétabilité définit l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus avec la même méthode effectuée par un même opérateur, un même équipement, dans un même laboratoire, et dans un intervalle de temps très court (Grappin, 1976), (AFNOR, 2006).

La reproductibilité définit l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus avec une même méthode mais dans des conditions différentes. Par conditions différentes, on entend opérateurs différents, laboratoires différents, époques différentes, ou encore équipements différents, (Grappin, 1976), (AFNOR, 2006).

Selon le projet de norme NF T90-500, un minimum de cinq répétitions de la méthode doit être effectuée sur les 30 souches de référence pour évaluer la répétabilité. Le même résultat (au rang de genre et au rang d'espèce) doit être obtenu pour toutes les répétitions effectuées. La reproductibilité intermédiaire (série analytique différente, même souche cible), est évaluée quant à elle, en effectuant dix essais sur une souche de référence ainsi que sur une souche issue de l'environnement. Ces dix essais doivent également donner le même résultat (AFNOR, 2016).

Ces étapes de répétabilité et de reproductibilité n'ont pas été effectuées dans le cadre de ce travail.

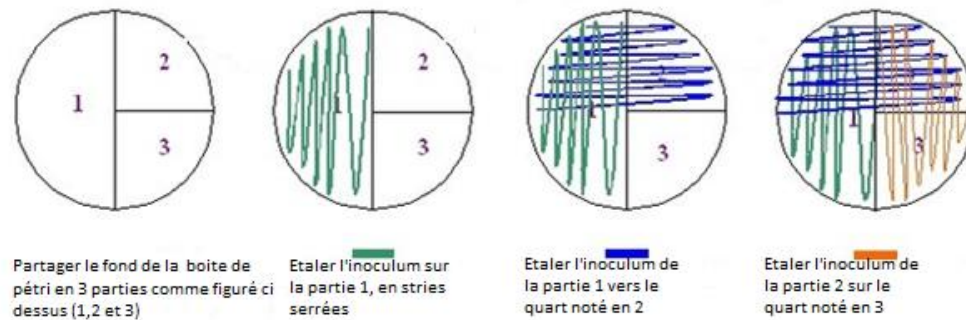
2.3.3.2. Comparaison avec la méthode de référence

D'après le projet de norme NF T90-500, un minimum de 100 souches de *Legionella* issues de l'environnement doit être testé avec la méthode d'identification de référence et la méthode alternative à valider. La valeur de comparaison doit être correspondre à un taux >98% (2/100) au rang de genre, et à un taux >95% (5/100) au rang d'espèce.

Dans le cadre de ce travail, 150 souches de *Legionella* issues de l'environnement ont été testées : 100 souches de *Legionella pneumophila*, et 50 souches de *Legionella spp*, toutes issues de prélèvements d'eau réalisés par le laboratoire d'hygiène dans différents bâtiments du CHU ou dans des établissements extérieurs. Elles étaient donc déjà préalablement identifiées selon les préconisations de la norme NF T90-431. Les souches environnementales sont conservées au laboratoire par congélation en milieu Brain Heart Infusion (BHI) (BD, 2013).

Pour réaliser l'isolement des colonies sur milieu solide, un ensemencement a donc été effectué à partir des bouillons Brain Heart Infusion (BHI), sur les milieux de confirmation BCYE α avec et sans cystéine, en utilisant la technique d'isolement par cadran décrite par la figure 11. Les milieux ont ensuite été mis à incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 48h.

Figure 11 : Méthode d'ensemencement, d'après « Milieux de culture et Techniques d'ensemencement » (Bensakhira, 2018).



A l'issue de ce délai, les colonies récupérées sur milieux BCYE α avec cystéine ont été identifiées d'une part avec le kit d'agglutination au latex, et d'autre part avec le MALDI-TOF. Ces essais se sont déroulés sur plusieurs semaines durant l'été 2018 ; les souches à tester étant regroupées par séries de 5 à 15.

3. Résultats

Au total, 150 souches de légionelles issues de l'environnement ont été identifiées par la méthode de référence (agglutination au latex), et par la méthode alternative (MALDI TOF MS).

Concernant les souches de *Legionella pneumophila*, les résultats sont concordants pour les 100 souches testées comme le montre le tableau détaillé des résultats situé en annexe 2.

Concernant les souches de *Legionella spp.*, les résultats sont concordants pour 36 des 50 souches testées. La majorité a été identifiée à *Legionella anisa* (30/50), mais d'autres espèces ont également été retrouvées comme *Legionella birminghamensis* (1/50), *Legionella bozemanii* (4/50) et *Legionella rubrilucens* (1/50).

En revanche, les résultats sont discordants pour les 14 souches restantes. En effet, l'identification par la méthode alternative n'a pas permis d'obtenir le résultat attendu (au moins au rang de genre) alors que les colonies étaient toutes confirmées comme étant des légionelles. Les souches ont donc été transmises au laboratoire de bactériologie afin d'obtenir une identification par PCR et séquençage du gène ARN 16S. Les espèces *Legionella taurinensis* et *Legionella nautarum* et *Legionella londiniensis* ont ainsi pu être mises en évidence alors que le MALDI TOF MS n'a rendu aucun résultat interprétable (annexe 2).

Au total, les résultats de la comparaison entre les deux méthodes sont concordants pour 136 des 150 souches environnementales testées, toutes espèces confondues, ce qui donne un pourcentage de corrélation de 90,66% pour le genre et l'espèce. Cela ne correspond donc pas aux critères requis par le projet de norme NF T90-500 pour la validation d'une méthode alternative.

4. Discussion

Pour valider la comparaison entre la méthode alternative et la méthode de référence, les résultats doivent être corrélés à 98% pour le genre (*Legionella*), et à 95% pour l'espèce, ce qui n'est pas le cas ici. Les résultats discordants associés à certaines souches de *Legionella spp.* peuvent s'expliquer par le fait qu'il n'existe pas de spectre de référence dans la base de données du MALDI TOF pour l'ensemble des espèces du genre *Legionella*. Cependant, la norme analytique de référence (NF T90-431), n'impose pas l'identification au rang d'espèce pour les espèces autres que *Legionella pneumophila*. Dans la mesure où la comparaison des méthodes d'identification est réalisée à partir de colonies confirmées de *Legionella*, il est possible de considérer qu'un résultat incohérent ou absent avec la méthode alternative est équivalent à une absence d'identification avec la méthode de référence. Les résultats initialement discordants deviennent alors concordants (tableau des résultats interprétés en annexe 3), et le pourcentage de corrélation peut être ramené à 100%, ce qui permet de valider la comparaison entre les deux méthodes. Cette interprétation ne serait évidemment pas valable si l'étude de comparaison des deux méthodes avait porté sur la confirmation et l'identification de colonies caractéristiques isolées sur géloses GVPC.

Depuis la réalisation de ce travail, le projet de norme NF T90-500 est paru dans sa version expérimentale, XP T90-500, en octobre 2019 (AFNOR, 2019). Cette version reprend globalement les critères de validation définis dans le projet de norme, mais quelques modifications ont été apportées, notamment en ce qui concerne l'évaluation de la répétabilité (simplification), ou encore le nombre de souches à tester pour l'étude d'inclusivité. Concernant l'étude de comparaison avec la méthode de référence, des exigences supplémentaires ont été ajoutées en terme de caractérisation des souches

environnementales testées. Lors de ce travail, seules les quatorze souches discordantes ont fait l'objet d'une caractérisation à l'aide d'une méthode standard (séquençage 16S). Il conviendra donc de compléter cette étude de comparaison par la caractérisation des autres souches testées.

5. Conclusion et perspectives

La légionellose est une pathologie grave dont l'origine est environnementale puisque la bactérie responsable de cette maladie se développe principalement en milieu hydrique, lorsque les conditions lui sont favorables. Les principales sources de contamination humaine sont notamment les réseaux collectifs de distribution d'eau chaude sanitaire mal entretenus. Afin de prévenir le risque de prolifération de légionelle dans ce type d'installation, la réglementation impose qu'une surveillance environnementale régulière soit réalisée par un laboratoire accrédité, selon les exigences définies par la norme NF T90-431. Au CHU de Rouen, c'est le laboratoire d'Hygiène qui est chargé de réaliser cette surveillance. La méthode de recherche et dénombrement de *Legionella spp* et *Legionella pneumophila* décrite par la norme NF T90-431 comprend une étape d'identification qui peut être effectuée soit par agglutination, soit par immunofluorescence, ou encore par une méthode alternative telle que la PCR temps réel ou la spectrométrie de masse, sous réserve de validation adaptée. Après avoir utilisé la technique d'agglutination pendant de nombreuses années, et suite à certains problèmes rencontrés, le laboratoire souhaite maintenant pouvoir s'orienter vers la spectrométrie de masse MALDI TOF pour identifier les colonies présomptives de *Legionella*. Il doit donc présenter un dossier de validation établi selon le protocole défini par la norme XP T90-500. Ce protocole de validation comprend une étape de comparaison de la méthode alternative à la méthode de référence. Cette étude de comparaison menée sur 150 souches de *Legionella* issues de l'environnement a permis de démontrer que la méthode alternative (MALDI TOF) et la méthode de référence (agglutination au latex) sont comparables vis-à-vis de l'identification de *Legionella pneumophila*. L'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF présentant de

nombreux avantages comme la rapidité, la fiabilité, la précision, et la facilité d'utilisation par tout le personnel. Il sera donc intéressant pour le laboratoire de pouvoir l'utiliser en routine. Pour cela, le dossier de validation de méthode devra être complétée par la caractérisation de l'ensemble des souches environnementales testées et la réalisation des études d'inclusivité, d'exclusivité, de répétabilité et de reproductibilité exigées par la norme XP T90-500.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de signalement des infections associées aux soins en établissement de santé (version 2017) à transmettre sans délai à l'ARS et au CPIas dont dépend l'établissement de santé, d'après « Signalement », (CPIas Réseau National, 2019).

Fiche de signalement des Infections Associées aux Soins en ES (version 2017) à transmettre sans délai à l'ARS et au CPIas dont dépend votre établissement

Rappel : Selon le décret n° 2017-129 du 3 février 2017 relatif à la prévention des infections associées aux soins, certains cas d'infections associées aux soins doivent être signalés conjointement à l'ARS et au CPIas dont dépend votre établissement. L'épisode qui doit être signalé peut être constitué de plusieurs cas d'infections associées aux soins, notamment lorsque les caractéristiques ou modalités de survenue du ou des premiers cas ne permettent pas d'emblée de répondre aux critères énoncés ci-dessous.
Une copie de cette fiche doit être insérée dans le dossier médical du (des) patient(s) concerné(s).

❶ Données administratives

Etablissement de santé :	Personne responsable du signalement : (si différente du praticien en hygiène)
Code FINESS Etablissement : ...	Nom/Prénom :
Adresse :	Fonction :
.....	Tel :
Code postal :	Fax :
Ville :	Courriel :
Statut : <input type="checkbox"/> Public <input type="checkbox"/> Privé	Praticien en hygiène (ou à défaut représentant de l'EOHH)
<input type="checkbox"/> Privé d'intérêt collectif	Nom/Prénom :
Type : <input type="checkbox"/> CHR/CHU <input type="checkbox"/> CH/CHG <input type="checkbox"/> H. Local <input type="checkbox"/> CHS/Psy	Fonction :
<input type="checkbox"/> MCO <input type="checkbox"/> SSR <input type="checkbox"/> SLD <input type="checkbox"/> HIA	Tel :
<input type="checkbox"/> CLCC <input type="checkbox"/> HAD <input type="checkbox"/> Autre	Fax :
Date du signalement :	Courriel :

❷ Critères de signalement (à cocher obligatoirement, une ou plusieurs cases)

1. Infection associée aux soins, inattendue ou inhabituelle, du fait :
- 1.a. De la nature, des caractéristiques ou du profil de résistance aux anti-infectieux de l'agent pathogène en cause
Agent pathogène envoyé à un CNR ou laboratoire expert Non Oui
Si Oui, date : | | | | | | | | | | Quel CNR ou laboratoire expert :
 - 1.b. De la localisation de l'infection ou des circonstances de survenue de l'infection chez les personnes atteintes
2. La survenue de cas groupés d'infections associées aux soins
Précisez :
3. L'infection associée aux soins a provoqué un décès
4. L'infection associée aux soins fait également l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire en application de l'article R. 3113-2
D.O. faite pour cette maladie : Non Oui Date : | | | | | | | | | |
- **Lien avec les vigilances :** déclaration faite pour ce cas Non Oui, précisez alors type(s) et date :
- bio- cosméto- hémo- matério- pharmaco- réacto-vigilance Date : | | | | | | | | | |
 - EIG (portail des signalements) Date : | | | | | | | | | |

❸ Description de l'évènement

Evènement n° - (1)
A la date du signalement : Nombre de cas : dont décédés :
Date du 1er cas : Si plusieurs cas, date du dernier cas connu :
A la clôture du signalement : Nombre total de cas : dont décédés : date du dernier cas connu :
Cet évènement se rapporte-t-il à un évènement déjà signalé ? <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Si oui, date de signalement :

(1) : AAAA-X, où et AAAA est l'année et X le X^{ème} évènement signalé par l'établissement depuis le début de l'année.

- **Cas groupés ou épidémie :** Non Oui
- **Type de cas :** Infection(s) Colonisation(s)
- **Population concernée :** Patient(s) Personnel(s)
- **Caractère associé aux soins :** Certain Probable Possible
- **Origine du (des) cas :** Acquis dans l'établissement Importé(s)
- Autre(s) établissement(s) concerné(s) : Non Oui Si oui, le(s)quel(s) :
-
- **Site(s) anatomique(s) :**
-
- **Microorganisme(s) en cause :**
-
- Profil de résistance (joindre l'antibiogramme si besoin, notamment si critère 1a) :
-
- **Spécialité(s) du (des) service(s) concerné(s) :**
-

④ Investigations réalisées à la date du signalement

- Non Oui En cours

- Précisez :

.....

- **Hypothèse sur la cause de l'évènement :** Non Oui

- Précisez :

.....

- **Actions d'amélioration :**

Prises à la date de signalement Non Oui Sans objet

A programmer : Non Oui Ne sait pas Sans objet

- Précisez :

.....

- **Besoin d'expertise extérieure :** Non Oui

- Précisez :

.....

- **Pensez-vous que l'évènement soit maîtrisé :** Non Oui En cours Sans objet

- Précisez :

.....

⑤ Informations complémentaires (joindre tout document utile, établi par l'établissement et rendu anonyme)

Justification des critères de signalement, description de l'évènement

(éléments de gravité, potentiel épidémique, caractère exceptionnel, n° de fiche vigilance éventuel, etc.) :

.....

.....

Commentaires additionnels du praticien en hygiène (ou à défaut d'un représentant de l'EOHH)

.....

.....

Fait à : le : | | | | | | | | | | Signature :

Annexe 2 : Résultats obtenus lors de l'analyse des 150 souches de légionelles avec la méthode de référence (agglutination au latex), la méthode alternative (MALDI-TOF), et avec la PCR séquençage ARN 16S d'après « Travaux personnels ».

Souches	Identification Initiale	Résultats de l'identification		
		Agglutination au latex	MALDI TOF	Séquençage ARN 16 S
3634-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Gordonia bronchialis</i>	<i>Legionella taurinensis</i>
3686	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella birminghamsis</i>	
4060	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Arthrobacter pyridinolis</i>	<i>Legionella taurinensis</i>
1330-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Lactobacillus vini</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1532-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Lactobacillus vini</i>	<i>Legionella londiniensis</i>
2172-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2336-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Raoultella omithinolytica</i>	<i>Legionella nautarum</i>
2549-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
20171080-6	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
20171919	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Legionella nautarum</i>
2294-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>Legionella londiniensis</i>
2715-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1555-5	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1718	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1774	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1829	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1910	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2278	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella rubrilucens</i>	
2794	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1025-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
326-5	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
876	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1020-4	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella bozemanii</i>	
1100-7	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella bozemanii</i>	
1101-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
1101-4	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
3278-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella bozemanii</i>	
3276-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2140-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2140-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2140-5	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2141-5	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2201-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2201-6	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2273-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	
2273-4	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella anisa</i>	

Souches	Identification Initiale	Résultats de l'identification		
		Agglutination au latex	MALDI TOF	Séquençage ARN 16S
2273-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2275-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2563-6	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella bozemanii</i>	
2786-7	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2786-8	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2786-9	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2786-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
36-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1225-5	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1324-2	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
1329	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Arthrobacter pyridinolis</i>	<i>Legionella nautarum</i>
2336-1	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Arthrobacter luteolus</i>	<i>Legionella nautarum</i>
2548-3	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
2549-4	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella</i> spp	<i>Legionella a nisa</i>	
3860	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
3974-7	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
4077-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
4077-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
4077-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-7	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-8	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-9	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-11	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1069-11	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1134-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1134-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1190-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1190-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1329-9	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1392-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	

Souches	Identification Initiale	Résultats de l'identification		
		Agglutination au latex	MALDI TOF	Séquençage ARN 16S
1703-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1702-7	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2047-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2047-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2047-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2047-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2078-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2078-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2078-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2078-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2102-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2102-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2102-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2102-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2103-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2103-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2172-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2261-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2261-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2261-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2261-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2548-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2548-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2547-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
1318-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1384-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1462-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1607-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1607-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1607-7	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1673-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1691	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1700-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1700-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1782-3	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	

Souches	Identification Initiale	Résultats de l'identification		
		Agglutination au latex	MALDI TOF	Séquençage ARN 16S
1783-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1924-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
1930-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1976	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
1985	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2050-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2050-6	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2184	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2222-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2222-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2222-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2292-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2332-4	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2103-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2104	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2162-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2329-2	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2329-5	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2330-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2428	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
2429-1	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
2242	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S131	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S132	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S133	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S134	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S135	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S136	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S137	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S138	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S139	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S140	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S141	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S142	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 1	<i>Legionella pneumophila</i>	
S143	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S144	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	

Souches	Identification Initiale	Résultats de l'identification		
		Agglutination au latex	MALDI TOF	Séquençage ARN 16S
S145	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S146	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S147	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S148	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S149	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	
S150	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i> sérotype 2 14	<i>Legionella pneumophila</i>	

Annexe 3: Interprétation des résultats de la comparaison de l'identification de *Legionella pneumophila* par la méthode de référence (Agglutination au latex) et la méthode alternative (MALDI TOF).

Souches	Identification Initiale	Identification <i>L. pneumophila</i>		Interprétation
		Méthode de référence : identification par agglutination au latex	Méthode alternative : Identification par MALDI TOF	
3634-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
3686	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
4060	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1330-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1532-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2172-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2336-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2549-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
20171080-6	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
20171919	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2294-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2715-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1555-5	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1718	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1774	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1829	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1910	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2278	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2794	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1025-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
326-5	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
876	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1020-4	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1100-7	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1101-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1101-4	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
3278-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
3276-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2140-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2140-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2140-5	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2141-5	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2201-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2201-6	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2273-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2273-4	<i>Legionella spp</i>	-	-	1

Sous-tes	Identification Initiale	Identification <i>L. pneumophila</i>		Interprétation
		Méthode de référence : identification par agglutination au latex	Méthode alternative : Identification par MALDI TOF	
2273-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2275-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2563-6	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2786-7	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2786-8	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2786-9	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2786-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
36-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1225-5	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1324-2	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
1329	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2336-1	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2548-3	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
2549-4	<i>Legionella spp</i>	-	-	1
3860	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
3974-7	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
4077-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
4077-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
4077-4	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-4	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-6	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-7	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-8	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-9	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-11	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1069-11	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1134-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1134-4	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1190-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1190-6	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1329-9	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1392-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1

Souches	Identification Initiale	Identification <i>L. pneumophila</i>		Interprétation
		Méthode de référence : identification par agglutination au latex	Méthode alternative : Identification par MALDI TOF	
1703-6	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1702-7	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2047-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2047-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2047-4	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2047-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2078-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2078-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2078-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2078-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2102-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2102-4	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2102-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2102-6	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2103-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2103-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2172-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2261-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2261-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2261-5	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2261-6	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2548-2	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2548-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
2547-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1318-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1384-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1462-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1607-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1607-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1607-7	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1673-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1691	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1700-1	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1700-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
1782-3	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1

Souches	Identification Initiale	Identification <i>L. pneumophila</i>		Interprétation
		Méthode de référence : identification par agglutination au latex	Méthode alternative : Identification par MALDI TOF	
1783-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
1924-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
1930-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
1976	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
1985	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2050-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2050-6	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2184	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2222-2	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2222-4	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2222-5	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2292-4	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2332-4	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2103-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2104	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2162-2	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2329-2	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2329-5	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2330-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2428	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2429-1	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
2242	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S131	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S132	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S133	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S134	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S135	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S136	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S137	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S138	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S139	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S140	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S141	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S142	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S143	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1
S144	<i>Legione lla pneumophila</i>	+	+	1

Souches	Identification Initiale	Identification <i>L. pneumophila</i>		Interprétation
		Méthode de référence : identification par agglutination au latex	Méthode alternative : Identification par MALDI TOF	
S145	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
S146	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
S147	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
S148	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
S149	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1
S150	<i>Legionella pneumophila</i>	+	+	1

Interprétation : 1 = résultats concordants

Bibliographie

- AFNOR. Norme ISO 3534 1 & 2. 2006.
- AFNOR. Projet de norme PR NF T90-500 « Qualité de l'eau : Validation de méthode de confirmation et d'identification ». 2016.
- AFNOR. Norme NF T90-431 Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* — Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. 2017.
- AFNOR. XP T90-500 « Qualité de l'eau : Validation de méthode de confirmation et d'identification », version expérimentale. 2019.
- Afssaps. Mise au point : Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte. Actualisation. juill 2012;
- Anhalt J, Fenselau C. Identification of Bacteria Using Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1 févr 1975;47:219-25.
- ARS Grand Est. Légionelles [Internet]. 2019 [cité 11 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.grand-est.ars.sante.fr/legionelles-2>
- BD. Mode d'emploi milieux en boîte de pétri prêts à l'emploi - BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar. 2013.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol*. févr 1991;57(2):597-600.
- Bensakhira A. Milieux de culture et Techniques d'ensemencement » Magazine Science [Internet]. Magazine Science. 2018 [cité 30 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.magazinescience.com/biologie/milieux-de-culture-techniques-densemencement/>
- Bio-Rad. Fiche technique Monofluo™Kit. 2009.
- Bio-Rad. Kits PCR en temps réel iQ-Check® *Legionella* | Food Science | Bio-Rad [Internet]. 2020. Disponible sur: <https://www.bio-rad.com/fr-fr/product/iq-check-legionella-real-time-pcr-kits?ID=LS5I7MLPT>
- Bitar DM, Molmeret M, Abu Kwaik Y. Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2004;
- Bozue J, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun*. 1996;
- 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*. janv 2011;15(1):e30-37.
- Campèse C, Descours G, Lepoutre A, Beraud L, Maine C, Che D, et al. Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect*. mars 2015;45(3):65-71.

- Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci (Paris)*. 1 oct 2011;27(10):882-8.
- Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, McCorrister SJ, Chong P, Wylie J, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Methods*. sept 2013;94(3):180-91.
- Cofrac. Annexe technique - Attestation d'accréditation N° 1-1980 rév. 6 [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/annexes/sect1/1-1980.pdf>
- Cofrac. Qu'est-ce que l'accréditation ? [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/quest-ce-que-laccreditation/>
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Gestion du risque lié aux légionelles [Internet]. 2001. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_du_CSHPF_de_novembre_2001_relatif_a_la_gestion_du_risque_lie_aux_legionelles.pdf
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. avr 1994;176(8):2137-42.
- CPias Grand-Est. Modalités de signalement [Internet]. 2019. Disponible sur: <http://www.cpias-grand-est.fr/index.php/secteur-sanitaire/signalement/modalites-de-signalement/>
- CPias Réseau National. Signalement [Internet]. 2019. Disponible sur: <http://www.cpias.fr/ES/signalement/signalement.html>
- Darani HY, Ahmadi F, Zabardast N, Yousefi HA, Shirzad H. Development of a Latex Agglutination Test as a Simple and Rapid Method for Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010;2(1):63-6.
- Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol*. mars 2010;12(3):557-66.
- Delarras C. Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier. 2014.
- Diederer BMW, Bruin JP, den Boer JW, Peeters MF, Yzerman EPF. Sensitivity of *Legionella pneumophila* DNA detection in serum samples in relation to disease severity. *J Med Microbiol*. sept 2007;56(Pt 9):1255.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eldsnet>
- Fenselau C. Rapid characterization of microorganisms by mass spectrometry - What can be learned and how? *J Am Soc Mass Spectrom*. août 2013;24(8):1161-6.
- 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*. 15 août 2003;37(4):483-9.

- Freney J. Historique. In: Legionella. Tec & Doc. 2011. p. 1-12.
- Gacouin A, Tulzo YL, Camus C, Thomas R. Légionelloses graves en réanimation. /data/revues/16240693/v0012i03/03000434/ [Internet]. 2002 [cité 1 déc 2019]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/16329>
- Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C. Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics. Infect Genet Evol. sept 2009;9(5):727-39.
- Gonçalves A, Bertucci F, Birnbaum D, Borg J-P. Profiling protéique SELDI-TOF et cancer du sein - Applications cliniques potentielles. Med Sci (Paris). 1 mars 2007;23:23-6.
- Grappin R. Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyses de routine. Lait. 1976;56(559-560):608-21.
- Greenberg D, Chiou CC, Famigilletti R, Lee TC, Yu VL. Problem pathogens: paediatric legionellosis-- implications for improved diagnosis. Lancet Infect Dis. août 2006;6(8):529-35.
- Groupe AFNOR. Norme NF EN ISO/CEI 17025 - Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais. 2005.
- Haut conseil de la santé publique. Le risque lié aux légionelles Guide d'investigation et d'aide à la gestion. 2013.
- van Heijnsbergen E, de Roda Husman AM, Lodder WJ, Bouwknecht M, Docters van Leeuwen AE, Bruin JP, et al. Viable Legionella pneumophila bacteria in natural soil and rainwater puddles. J Appl Microbiol. sept 2014;117(3):882-90.
- INRAE. Spectromètre de masse MALDI-TOF [Internet]. 2009. Disponible sur: https://www6.versailles-grignon.inrae.fr/green_chemistry_platform/Instruments/Spectrometre-de-masse-MALDI-TOF
- INRS. Légionelles et milieu de travail. 2004. 2004;
- INRS, 3RB Réseau Ressource Risque Biologique. Surveillance des légionelles dans l'eau [Internet]. 2018. Disponible sur: https://www.esst-inrs.fr/3rb/afftexte.php?p1=surveillance_legionelles
- Jamal W, Saleem R, Rotimi VO. Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. Diagn Microbiol Infect Dis. août 2013;76(4):404-8.
- Jamilloux Y, Jarraud S, Lina G, Etienne J, Ader F. Legionella, légionellose. juin 2012; Disponible sur: http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/7907/MS_2012_06-07_639.html?sequence=16&isAllowed=y
- Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of Legionella in Clinical Samples. In: Buchrieser C, Hilbi H, éditeurs. Legionella: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 11 sept 2019]. p. 27-56. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-161-5_2
- Joseph C. Surveillance of Legionnaires' Disease in Europe. Legionella. 1 janv 2002;311-7.

- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 15 oct 1988;60(20):2299-301.
- Karas Michael, Bachmann Doris, Hillenkamp Franz. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem.* 1 déc 1985;57(14):2935-9.
- Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann Clin Lab Sci.* juin 1987;17(3):150-6.
- Lee JV, Joseph C, PHLS Atypical Pneumonia Working Group. Guidelines for investigating single cases of Legionnaires' disease. *Commun Dis Public Health.* juin 2002;5(2):157-62.
- Maurin M, Hammer L, Gestin B, Timsit JF, Rogeaux O, Delavena F, et al. Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis. *Clin Microbiol Infect.* avr 2010;16(4):379-84.
- 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.* 1 déc 1977;297(22):1197-203.
- Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, et al. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *J Med Microbiol.* mars 2010;59(Pt 3):273-84.
- Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis.* 15 oct 2002;35(8):990-8.
- 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.* mai 2003;69(5):2540-7.
- Oxoid TS. *Legionella latex test.* 2019a;. Disponible sur:
http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0800&cat=&c=UK&lang=EN
- Oxoid TS. *Oxoid - Product Detail [Internet].* 2019b [cité 30 déc 2019]. Disponible sur:
http://www.oxid.com/FR/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=DR0585&c=FR&lang=FR&org=133&img=DR0585C&sec=
- Panda A, Kurapati S, Samantaray JC, Myneedu VP, Verma A, Srinivasan A, et al. Rapid identification of clinical mycobacterial isolates by protein profiling using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Indian J Med Microbiol.* juin 2013;31(2):117-22.
- Papadakis A, Chochlakis D, Sandalakis V, Keramarou M, Tselentis Y, Psaroulaki A. *Legionella* spp. Risk Assessment in Recreational and Garden Areas of Hotels. *Int J Environ Res Public Health.* 26 mars 2018;15(4).
- Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25712.

- Polet M, Botteldoorn N, Dierick K. Maldi-Tof comme outil d'identification de pathogènes alimentaires [Internet]. 2015. Disponible sur: http://www.afsca.be/laboratoires/labinfo/_documents/2015-04_labinfo13-p12_fr.pdf
- Prussin AJ, Schwake DO, Marr LC. Ten Questions Concerning the Aerosolization and Transmission of Legionella in the Built Environment. *Build Environ.* oct 2017;123:684-95.
- Robowtham T. Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 1980;
- Santé Publique France. e-SIN : signalement externe des infections nosocomiales [Internet]. 2019a. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins/articles/e-sin-signalement-externe-des-infections-nosocomiales>
- Santé Publique France. Légionellose [Internet]. 2019b [cité 11 déc 2019]. Disponible sur: </maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/legionellose>
- Sauget M. Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de typeMALDI-TOF: application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales. [Internet] [Bactériologie]. Université de Franche Comté; 2016. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01558289/document>
- Sellier N. Les différentes techniques de désorption-ionisation et de solvatation-ionisation utilisée en spectrométrie de masse. 2002 [cité 3 déc 2019]; Disponible sur: <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/les-differentes-techniques-de-desorption-ionisation-et-de-solvatation-ionisation-utilisee-en-spectrometrie-de-masse-752>
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 15 août 2009;49(4):543-51.
- 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.* mars 2010;29(3):280-1.
- 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.* janv 2007;55(1):114-9.
- 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(5):330-4.
- SPILF. Légionellose - Définition, Diagnostic, Traitement [Internet]. 2004. Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/legionelle-SPILF-aout2004.pdf
- SPILF Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Légionellose Définition, Diagnostic et Traitement. 2004.
- 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.* 26 mars 2004;53(RR-3):1-36.

- Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF, Fraser DW, McDade JE, Shepard CC, et al. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *J Infect Dis.* oct 1978;138(4):512-9.
- Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110-6.
- Vianney A. La formation de biofilms de *Legionella pneumophila* - Rôle du di-GMP cyclique dans le contrôle de la formation de biofilms de *Legionella pneumophila*. avr 2013;
- 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).* janv 2013;92(1):51-60.
- Warren WJ, Miller RD. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J Clin Microbiol.* 1979;
- Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol.* sept 2001;67(9):3985-93.
- Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the mip Gene. *J Clin Microbiol.* juill 2003;41(7):3327-30.
- 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.* oct 2013;41(5):941-8.

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



CONSTANTIN Eléa

Validation de l'identification de colonies présomptives de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* par spectrométrie de masse : comparaison avec une méthode de référence.

Th. D. Pharm., Rouen, 2020, 102 p.

RESUME

La légionellose est une infection respiratoire grave potentiellement mortelle chez l'homme, provoquée par la bactérie *Legionella pneumophila*. Ce germe ubiquitaire est retrouvé majoritairement en milieu hydrique artificiel, notamment dans les réseaux d'eaux collectifs mal entretenus. Le risque de contamination par des légionelles est surtout important dans les établissements hébergeant des populations vulnérables, et particulièrement les établissements de santé. Véritable enjeu de santé public, la prévention de la légionellose impose la surveillance et l'investigation des cas, mais aussi des prélèvements réguliers au niveau des installations à risque et des réseaux d'eaux chaude collectifs. Au CHU de Rouen, c'est le laboratoire d'Hygiène qui assure cette surveillance. Conformément à la réglementation, le laboratoire est accrédité Cofrac et réalise les recherches et dénombrements de légionelles selon la norme T90-431. Actuellement, l'étape d'identification des colonies confirmées comme *Legionella* est principalement réalisée par agglutination au latex, qui est une des méthodes de référence décrites par la norme. Toutefois, depuis 2016, le laboratoire rencontre des difficultés d'identification de certaines souches de *Legionella pneumophila* avec cette méthode. C'est pourquoi il envisage la possibilité de mettre en place une méthode alternative d'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF. Cette méthode n'étant pas celle de référence, elle doit faire l'objet d'une validation selon la norme XP T90-500 pour que le résultat des identifications puisse être rendu sous accréditation. Le dossier de validation doit comprendre, en complément d'autres critères, une étape de comparaison de la méthode alternative envisagée avec la méthode de référence. L'objectif de ce travail a été de réaliser cette étude de comparaison en testant 150 souches de *Legionella* issues de l'environnement avec la méthode d'identification de référence (agglutination au latex), et la méthode à valider (MALDI TOF). Au final, la méthode d'identification par spectrométrie de masse est comparable à la méthode d'identification par agglutination au latex vis-à-vis de l'espèce *Legionella pneumophila*. Cette étude devra toutefois être complétée par la caractérisation de l'ensemble des souches testées pour pouvoir être exploitée dans un dossier de validation de méthode.

MOTS CLES : Légionellose – *Legionella pneumophila* – Identification – Confirmation – Spectrométrie de masse – MALDI TOF – Norme XP T90-500 – Norme T90-431

JURY

Président : Mme PESTEL-CARON Martine, Professeur, Docteur en Pharmacie
Membres : Mme GOURICHON LISE, Praticien Attaché, Docteur en Pharmacie
Mme GROULT Marie-Laure, Maître de Conférences, Docteur en Pharmacie
Mr RODRIGUES-FERREIRA Nuno, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 21 février 2020