

**Rapport annuel d'activité**

**2019**

**Centre National de Référence  
des Légionelles**

**Année d'exercice  
2018**

**Pr Sophie Jarraud & Pr Gérard Lina**

Centre de Biologie et de Pathologie Nord  
Institut des Agents Infectieux  
Hôpital de la Croix-Rousse  
103, Grande rue de la Croix-Rousse  
69317 Lyon Cedex 04

# Résumé analytique

## Enjeux de Santé Publique

L'année 2018 a été marquée par un nombre de cas de légionellose jamais atteint en France depuis la découverte de cette infection, 2133 cas de légionellose soit une augmentation de 30,8% par rapport à 2017. Une augmentation avait déjà été observée en 2017 ce qui indique une augmentation de 75% du nombre de cas en 2 ans. L'épisode de 2018 est exceptionnel à plusieurs égards : l'augmentation n'est pas liée à des cas groupés mais correspond à une augmentation de cas sporadiques ; aucune source d'exposition commune n'a pu être reliée à la survenue de plusieurs cas pendant cet épisode ; l'épisode a été concentré sur une période courte en mai-juin 2018 ; seules certaines régions de France ont été particulièrement touchées ; lors de la réunion annuelle de l'*European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet) qui a eu lieu à Lyon en août 2018, aucun pays européen n'a rapporté d'augmentation de 20% de cas sur une période de 3 mois ; l'épisode semble associé à une période marquée par des conditions météorologiques particulières (humidité et précipitations) ; les patients atteints étaient souvent des hommes, plus jeunes avec plus de facteurs de risque, principalement le tabagisme. En parallèle et en dehors de cet épisode, une persistance du gradient ouest-est d'incidence des cas (taux d'incidence 5,1 fois plus élevé en Auvergne-Rhône-Alpes qu'en Bretagne) est observée en France.

Ainsi, malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires en France, le risque de légionellose n'est pas totalement maîtrisé. Dans ce contexte, il apparaît important d'investiguer d'autres pistes, dont les réseaux intérieurs de distribution d'eau du domicile des cas, qui jusqu'alors n'ont pas fait l'objet d'investigations systématiques. Par ailleurs, de nombreux travaux publiés ainsi que ceux de Santé publique France indiquent que les conditions météorologiques pourraient avoir une influence sur la temporalité d'incidence des cas de légionellose. Un des enjeux important et passionnant est de mieux comprendre la contamination de l'Homme, le rôle des conditions météorologiques sur la survie des légionelles dans l'environnement ou leur capacité à infecter l'Homme et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'à présent.

Nous disposons et avons mis en place des outils puissants d'interprétation des données de séquençage des génomes complets de *Legionella* pour discriminer les souches afin de mieux identifier les sources de contamination. Les données épidémiologiques cliniques ainsi que les analyses microbiologiques environnementales restent et apparaissent primordiales pour répondre à la question des sources de contamination non identifiées. Cette question implique en parallèle une amélioration du nombre de souches d'origine clinique disponibles et de favoriser le diagnostic des cas de légionellose notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires.

Enfin, la légionellose reste une infection sévère malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée avec une létalité globale estimée à plus de 10%. L'un des enjeux majeurs est l'identification de facteurs et/ou de marqueurs associés à la sévérité des légionelloses.

### Faits marquants en 2018

\* L'augmentation de 30,8% du nombre de cas de légionellose notifiés à SpF par rapport à 2017 a conduit à une **augmentation de 29,7%** du nombre de souches cliniques typées par le CNR.

\* Au total, 650 isolats de *Legionella* ont été typés en 2018 dont 66% (434 isolats) par WGS; 73% des souches analysées par WGS étaient des souches d'origine clinique.

\* L'investigation de la sur-incidence de cas en Mai-Juin 2018 par WGS sur le plan microbiologique n'a pas identifié de cas groupés ni de source de contamination commune pour ces cas.

\* 20% des investigations réalisées ont concerné un **domicile** en 2018 et ont permis de **confirmer** cette source de contamination dans **85% des investigations réalisées**. Ces données renforcent notre volonté de réaliser une étude commune avec Santé publique France afin de mieux caractériser le rôle du domicile (non encadré par la réglementation).

- \* la méthode PCR a permis de confirmer des cas de légionellose à *L. pneumophila* et *L. pneumophila* dont certains cas à Lp1 non diagnostiqués par la méthode urinaire ; son utilisation doit être largement encouragée au niveau national
- \* 10 cas sporadiques à *Legionella longbeachae* ont été diagnostiqués sans identification de sources de contamination.
- \* Les premiers cas d'infection humaine à *L. gratiana* ont été diagnostiqués sur l'île de la Réunion par PCR, dans un contexte de cas groupés sans qu'une source commune de contamination n'ait été identifiée.
- \* Une large étude nationale translationnelle PROGLEGIO coordonnée par le CNR et financée par la DGOS et l'ANR mise en place en 2017 se poursuit jusqu'en 2020 dans l'objectif d'identifier des facteurs et/ou marqueurs associés à la sévérité des légionelloses.

## Abstract

### Public Health Issues

2018 is marked by an **increase of Legionnaires' disease (LD) of 30.8%** compared to 2017 and to **75%** compared to 2016. Indeed, a total of **2133 cases** of LD was notified in France in 2018 corresponding to the largest number of LD notified in France since the discovery of this infection. The episode observed in 2018 is exceptional in several aspects: the increase is not related to clustered cases but corresponds to an increase in sporadic cases; no common source of exposure has been identified; the episode was concentrated on a short period in May-June 2018; only certain area of France have been particularly affected; at the annual meeting of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) which took place in Lyon in August 2018, no European country reported a 20% increase in cases over this period of 3 months; the episode seems to be associated with a particular weather conditions (humidity and precipitation) and particular characteristics of cases: affected patients were often men, younger with more risk factors, mainly smoking. In parallel of this episode, a persistence of the west-east gradient of incidence of cases (incidence rate 5.1 times higher in Auvergne-Rhône-Alpes than in Brittany) was observed in France.

Thus, despite the implementation of numerous regulatory measures in France, the risk of LD is not completely under control. In this context, it seems important to investigate other leads, including domestic water distribution networks, which have not been systematically investigated so far. In addition, numerous works and publications as well as those of Public Health France indicate that weather conditions could have an influence on the temporality of incidence of LD cases. One challenge is to better understand the impact of meteorological conditions on the survival of *Legionella* in the environment and/or their ability to infect human being another is to identify other sources that have not been suspected so far.

We have implemented powerful tools for interpreting Legionella genome sequencing data to discriminate strains and better identify sources of contamination. Clinical epidemiological data as well as environmental microbiological analyzes remains essential for answering the issue of unidentified sources of contamination. In addition, this issue implies to improve the number of available clinical strains and to promote the diagnosis of the cases of legionellosis notably by the use of the PCR on pulmonary samples.

Finally, LD remains a severe infection with a global mortality estimated to more than 10%. One of the major issues is the identification of factors and/or markers associated to the severity of LD.

### Highlights in 2018

- \* The increase of 30.8% of LD cases compared to 2017 led to an increase of 29.7% of clinical strains typed by the CNR.
- \* A total of 650 Legionella isolates were typed in 2018, of which 66% (434 isolates) were typed by WGS; 73% of the strains analyzed by WGS were clinical strains.
- \* The investigation of cases during over-incidence of LD in May-June 2018 by using WGS did not identify any clustered cases or common source of contamination for these cases.
- \* 10% of the investigations carried out concerned a home in 2018 and confirmed this source of contamination in 85% of the investigations carried out. These data reinforce our desire to carry out a joint study with Public Health France to better characterize the proportion of LD cases due to home contamination (for which there is no regulations).
- \* the PCR method confirmed several *L. non pneumophila* cases and *L. pneumophila* cases including some Lp1 cases not diagnosed by the urinary method; its use should be widely promoted at national level
- \* 10 sporadic cases of *Legionella longbeachae* were diagnosed without identification of sources of contamination.
- \* The first cases of human infection with *L. gratiana* were diagnosed on Reunion Island by PCR, in a context of clustered cases without a common source of contamination being identified.
- \* A large national translational study PROGLEGIO coordinated by the CNR and funded by the DGOS and the ANR set up in 2017 continues until 2020 in order to identify factors and / or markers associated with the severity of legionellosis.

## Avant propos

Le Centre National de Référence des *Legionella* remercie vivement l'ensemble de ses correspondants et partenaires (laboratoires, biologistes, ARS et Délégations Territoriales, CIRE), notamment pour l'envoi de souches et de prélèvements pulmonaires ainsi que pour les renseignements permettant de remplir sa mission de surveillance microbiologique.

Le CNR des *Legionella* remercie Santé publique France, et notamment Christine Campese, Sibylle Bernard-Stoecklin, Catherine Maine et Daniel Levy-Bruhl pour les nombreuses interactions permettant de répondre à nos missions.

# Table des matières

<b>1. Missions et organisation du CNR.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Activités d'expertise.....</b>	<b>12</b>
2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2018.....	12
2.1.1. Evaluation du séquençage de 3 <sup>ème</sup> génération sur prélèvements complexes.....	12
2.1.2. PCR du groupe européen ESGLI détectant <i>L. pneumophila</i> et Lp1.....	13
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	13
2.2.1. Evaluation du prototype de test de la société Biosynex pour la recherche d'antigènes urinaires.....	13
2.2.2. Evaluation du test Monlab pour la recherche d'antigènes urinaires.....	13
2.2.3. Evaluation des tests standard standard Q® et standard F <i>Legionella</i> Ag FIA® pour la recherche d'antigènes urinaires.....	13
2.2.4. Evaluation du test ImmuView® de la société SSI Diagnostica, revendu par Biocentric, pour la recherche d'antigènes urinaires.....	14
2.2.5. Evaluation du test Legiolert™ commercialisé par la société IDEXX pour la recherche de <i>Legionella pneumophila</i> dans les eaux.....	14
2.2.6. Evaluation de l'ajout du réactif Free DNA Removal Solution (FDRS) dans le kit iQ-Check™ Reference (Biorad) pour la quantification de l'ADN de <i>Legionella</i> dans les eaux.....	15
2.2.7. Evaluation du kit R-DiaLeg et de l'appareil geneLEAD VIII pour PCR <i>Legionella</i> sur prélèvements respiratoires (société Diagenode).....	15
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	16
2.4. Collections de matériel biologique distribuées.....	16
2.5. Activités d'expertise.....	17
2.5.1. Synthèse de l'activité d'expertise.....	17
2.5.2. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses.....	18
2.5.3. Restitution des résultats.....	21
2.6. Activités de séquençage.....	21
Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?.....	21
Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?.....	21
Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ? ....	22
<b>3. Activités de surveillance.....</b>	<b>23</b>
3.1. Description du réseau de partenaires.....	23
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	28
3.2.1. Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF).....	28
3.2.2. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR.....	30
3.2.3. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR.....	36
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	38
3.3.1. Définitions utilisées pour exprimer la résistance.....	38
3.3.2. Résultats & analyse des tendances.....	38
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	39

3.4.1.	Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	39
3.4.2.	Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC).....	40
3.5.	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	41
<b>4.</b>	<b>Alerte .....</b>	<b>43</b>
4.1.	Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal et événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte en 2018	43
4.2.	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux.....	45
<b>4.2.3.</b>	<b>Investigation de cas groupés sur Dunkerque (59) .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.4.</b>	<b>Investigation de cas familiaux .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.5.</b>	<b>Investigation des cas potentiellement associés aux dispositifs d'apnée du sommeil, de nébulisation.....</b>	<b>52</b>
<b>5.</b>	<b>Activités de rétro-information, de formation et de conseil .....</b>	<b>52</b>
5.1.	Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	52
5.2.	Conseil et expertise aux autorités sanitaires .....	54
5.3.	Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ... ).....	54
<b>6.</b>	<b>Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>54</b>
6.1.	Activités de recherche en cours lors de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR .....	54
6.1.1.	Projet présenté de façon préliminaire dans le rapport de 2017 – finalisé en 2018 (résumé non présenté si étude précédemment décrite).....	54
6.1.2.	Etudes démarrées ou en cours en 2018 .....	55
6.2.	Liste des publications et communications de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	58
6.2.1.	Publications nationales .....	58
6.2.2.	Publications internationales .....	58
6.2.3.	Communications nationales.....	59
6.2.4.	Communications internationales .....	59
6.2.5.	Conférences sur invitations.....	60
<b>7.</b>	<b>Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux .....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Programme d'activité pour les années suivantes .....</b>	<b>61</b>
<b>Annexe 1 :</b>	<b>Missions &amp; organisation du CNR .....</b>	<b>64</b>
Missions du CNR des Légionelles.....		64
1.	Apporter une expertise microbiologique.....	64
2.	Conseil .....	64

3. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique .....	64
4. Contribuer à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel .....	64
Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés .....	65
Personnels affectés au CNR et Organigramme .....	65
Locaux .....	67
Principaux équipements : .....	68
Collections de matériel biologique.....	69
Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ; .....	69
Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation .....	70
Démarche qualité du laboratoire .....	71
Accréditation .....	71
Structure qualité du laboratoire.....	71
Contrôles de Qualité Externes (CQE).....	73
Audits .....	74
Logiciel de gestion de la qualité.....	74
Avancement de la démarche .....	74
<b>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR .....</b>	<b>75</b>
Liste des techniques de référence pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux .....	75
Méthodes pour le diagnostic des légionelloses.....	75
Méthodes d'identification des légionelles.....	76
Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques.....	76
Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement .....	77
Détection et quantification des bactéries viables .....	77
Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique.....	77
Méthodes appliquées sur souches .....	77
Méthodes appliquées sur prélèvements cliniques ou sur échantillons environnementaux .	78
Liste des techniques recommandées par le CNR .....	78



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2018.....	16
<b>Figure 2.</b> Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012-2018. ....	18
<b>Figure 3.</b> Villes partenaires ayant envoyé en 2018 au moins une souche clinique ou au moins un prélèvement respiratoire pour mise en culture. ....	25
<b>Figure 4.</b> Villes partenaires ayant envoyé en 2018 au moins un prélèvement pour diagnostic et/ou expertise.....	26
<b>Figure 5.</b> Villes partenaires ayant envoyé en 2018 au moins une souche environnementale...	27
<b>Figure 6.</b> Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2018 (Santé publique France). ....	28
<b>Figure 7.</b> Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2018. ....	29
<b>Figure 8.</b> Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2018 (Santé publique France). ....	29
<b>Figure 9.</b> Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2018. ....	30
<b>Figure 10.</b> Origine des souches reçues ou isolées en 2018 superposée à l'incidence de la déclaration par région (en fonction du lieu du laboratoire d'envoi). ....	31
<b>Figure 11.</b> Origine des souches reçues ou isolées en 2018 superposée au nombre de cas par région (en fonction du lieu du laboratoire d'envoi). ....	32
<b>Figure 12.</b> Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2011 à 2018. ....	36
<b>Figure 13.</b> Distribution en termes de séro groupe des souches de <i>Legionella pneumophila</i> d'origine environnementale adressées au CNR en 2018. ....	37
<b>Figure 14.</b> Distribution en termes d'espèce des souches de <i>Legionella non pneumophila</i> d'origine environnementale adressées au CNR en 2018. ....	37
<b>Figure 15.</b> Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011. ....	42
<b>Figure 16.</b> Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2018 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête (positives = enquête ayant permis d'identifier la source de contamination du patient). ....	43
<b>Figure 17.</b> Nombre annuel de cas de légionellose à Aurillac depuis 2008.....	44
<b>Figure 18.</b> Evolution du nombre de cas de légionellose sur une année, 2010-2018 (données SpF) .....	46
<b>Figure 19.</b> Evolution du nombre de prélèvements pour mise en culture et de souches cliniques reçues sur l'année 2018 par rapport à l'année 2017.....	46
<b>Figure 20.</b> Modification du flux de travail pour le typage des souches de <i>L. pneumophila</i> pendant la période de surincidence de cas de légionellose des mois de mai-juin 2018.....	47
<b>Figure 21.</b> Minimum spanning tree SBT et cgMLST.....	50
<b>Figure 22.</b> Organigramme fonctionnel du CNR. ....	65
<b>Figure 23.</b> Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles. ....	68
<b>Figure 24.</b> Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001) .....	72
<b>Figure 25.</b> Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux. ....	73
<b>Figure 26.</b> Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose. ....	79

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Evolution de l'activité du CNR, 2014-2018. ....	17
<b>Tableau 2.</b> Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> , 2011 – 2018.....	33
<b>Tableau 3.</b> Nombre de souches appartenant aux STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2011 et 2018.....	35
<b>Tableau 4.</b> Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2018.....	42
<b>Tableau 5.</b> Résultats des investigations réalisées en 2018 ayant permis d'identifier la source de contamination par le ST et/ou le PFGE et/ou le WGS. ....	43
<b>Tableau 6.</b> Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles. ....	66
<b>Tableau 7.</b> Modes de stockage de la collection du CNR .....	69
<b>Tableau 8.</b> Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles. ....	71

## 1. Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNR des Légionelles sont détaillées en Annexe 1.

Aucun changement notable sur le plan organisationnel n'est à noter pour l'année 2018. Sur le plan des personnels affectés au CNR, l'absence d'une technicienne a été gérée par son remplacement successif par 3 techniciennes.

Pour les biologistes, du fait des modifications de l'organisation de l'Institut des Agents Infectieux, le Dr Pascale Girardo et le Dr Anne-Gaëlle ont quitté le CNR des Légionelles respectivement en novembre 2018 et janvier 2019. Le Dr Camille Allam, assistante hospitalo-universitaire a intégré le CNR le 1<sup>er</sup> novembre 2018. Par ailleurs, le Dr Laetitia Beraud a augmenté son temps consacré au CNR à 40% de son activité.

L'organigramme du CNR en 2018 était le suivant :

**Secteur CNR Légio**  
UF 24844  
Gérard LINA  
Sophie JARRAUD  
Cadre de santé : Hélène RUTSCHI

Biologistes :  
- Laëtitia BERAUD  
- Ghislaine DESCOURS  
- Pascale GIRARDO  
- Sophie JARRAUD  
- Anne-Gaëlle RANC

Techniciens :  
- Joëlle CHASTANG  
- Lucie CHAVEROT  
- Karine DROITCOURT\*  
- Noémie FESSY  
- Corinne FAUCHON  
- Isabelle ROYET  
- Marielle SIFFERT

Ingénieur :  
Christophe GINEVRA

\* Karine DROITCOURT a été remplacée à 75% par :

- Charlotte VERRIER du 01/01/2018 au 31/03/2018

- Emeline WAREZ du 01/04/2018 au 31/08/2018

- HADDOUR DOUDOU Hanene du 01/09/2018 au 31/12/2018

Noémie FESSY est recrutée sur un poste spécifique pour l'étude PROGLEGIO financée par la DGOS

Le CNR est accrédité pour :

- la recherche de *Legionella* par culture et PCR dans les eaux propres (norme 17025) depuis 2012 ;

- la recherche de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires (norme 15189 – lignée de portée BA8) depuis 2016.

## 2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles au CNR est présentée en Annexe 2.

### Eléments clés de l'année 2018 en termes de production d'expertise :

- Augmentation importante de l'activité au CNR, que ce soit en termes d'expertise microbiologique (+27,4% d'analyses) ou de surveillance épidémiologique (+6,8% d'analyses, malgré la diminution de 42,5% des analyses par PFGE), en relation avec la forte augmentation du nombre de cas (+30,8% par rapport à 2017) ;
- Cette modification de l'expertise est marquée par une augmentation importante (+53%) du nombre de prélèvements pulmonaires adressés au CNR pour isolement de légionelles, et une diminution (-41,2%) des sérologies réalisées au CNR par une sensibilisation des laboratoires sur les sérums devant nous être envoyés (confirmation de titre) ;
- Le taux de cas avec une souche disponible reste faible, à 23 % de l'ensemble des cas ;
- Le CNR a isolé près de la moitié (47,5%) des souches d'origine clinique disponibles au niveau national ;
- Le nombre de PCR à visée diagnostique réalisées au CNR a augmenté de 34% ; ces PCR ont permis le diagnostic de 6 cas non diagnostiqués par antigénurie.
- Le CNR continue à expertiser de nombreux tests de détection des antigènes urinaires, 5 en 2018 : Biosynex, Monlab standard F *Legionella* Ag FIA®, standard Q® de SD Biosensor et ImmuView
- Le CNR a évalué l'apport du séquençage 3<sup>ème</sup> génération (MinION Oxford Nanopore) sur les prélèvements complexes respiratoires au cours d'une légionellose ou sur des prélèvements non respiratoires lors de légionelloses extra-respiratoires.

### 2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2018

#### 2.1.1. Evaluation du séquençage de 3<sup>ème</sup> génération sur prélèvements complexes

Nous avons évalué le séquençage MinION Oxford Nanopore dans plusieurs contextes : le séquençage ciblé de l'ARNr 16S entier à des fins de détection et d'identification de *Legionella* dans des prélèvements complexes (cliniques et environnementaux) ; le séquençage de génomes bactériens à partir d'ADN isolé de souche de *Legionella* dans le but d'assembler des génomes avec ou sans données Illumina® associées.

Le séquençage de l'ARNr 16S entier par cette technologie permet la détection de *Legionella* dans des prélèvements respiratoires ainsi que dans des prélèvements cliniques autres tels que des liquides articulaires mais également dans des prélèvements environnementaux. La cible ainsi que le taux d'erreur de ce type de séquençage ne permettent une identification fiable de *Legionella* qu'au niveau du genre pour les échantillons que nous avons testés. Cette technologie permet la détection de co-infections dans les prélèvements pulmonaires ou non pulmonaires, ce qui permet d'adapter l'antibiothérapie.

En ce qui concerne les souches, l'assemblage avec la circularisation du chromosome et des éventuels plasmides est très efficace avec ce type de séquençage. Néanmoins, pour obtenir un génome de bonne qualité, l'association avec des données Illumina® est pour l'instant nécessaire.

### **2.1.2. PCR du groupe européen ESGLI détectant *L. pneumophila* et Lp1**

En 2017, le CNR a mis en place une PCR en temps réel multiplexe, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al*; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015). Cette PCR cible une région spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* d'une part et une région spécifique du séro groupe 1 de cette même espèce permettant son identification simultanément à la détection de l'espèce. Cette PCR multiplexe cible également un contrôle interne.

Cette PCR a été réalisée sur 281 prélèvements cliniques en 2018 et est devenue un test de routine ; 147 résultats positifs pour *L. pneumophila* et 131 en *L. pneumophila* séro groupe 1 ont été obtenus. En comparaison à la PCR commerciale Diagénode, le taux de concordance était de 95% (sur 121 échantillons testés avec les deux tests) et de 93% avec une PCR spécifique Lp1 élaborée au CNR depuis 2014 (sur 29 échantillons passés en double).

Cette PCR permet d'investiguer des cas d'interprétation difficile et de préciser la prévalence des cas de *L. pneumophila* séro groupe non 1.

## **2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse**

### **2.2.1. Evaluation du prototype de test de la société Biosynex pour la recherche d'antigènes urinaires**

En 2017, le CNR avait évalué un nouveau prototype de test immuno-chromatographique proposé par la société Biosynex pour la recherche des antigènes urinaires *Legionella*. L'étude de spécificité avait montré de bons résultats (199 échantillons concordants par rapport au test BinaxNOW® sur urines concentrées) mais l'étude de sensibilité avait dû être arrêtée en raison de résultats non satisfaisants (4 échantillons non détectés positifs sur 22 échantillons positifs testés). Début 2018, deux nouvelles versions du prototype ont été évaluées, en commençant par les échantillons discordants de la première étude. Ces tests n'ont pas été concluants, et l'étude a été une nouvelle fois interrompue.

### **2.2.2. Evaluation du test Monlab pour la recherche d'antigènes urinaires**

L'évaluation du test immuno-chromatographique Monlab pour la recherche d'antigénurie *Legionella* commercialisé par la société Orgentec s'est achevée en 2018. Ce test a été comparé au test BinaxNOW®. Les sites partenaires de l'étude, l'Hôpital d'Instruction des Armées de Begin et le site de Marne-la-Vallée du Grand Hôpital de l'Est Francilien ont évalué ce test sur respectivement 39 et 162 échantillons d'urines non concentrées. Le CNR a évalué ce test sur 68 échantillons d'urines dont 50 positifs. Au total, après chauffage des échantillons positifs, la concordance entre les 2 techniques s'élève à 99,2% avec 99,5% de concordance sur 216 urines négatives et 98% de concordance sur 53 urines positives. Cependant, ce test a été évalué en comparaison au BinaxNOW® sans concentration et sans lecteur. Or nous savons que ces deux techniques recommandées par le CNR apportent un gain de sensibilité. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que la sensibilité du test Monlab soit identique à celle du test BinaxNOW® utilisé dans des conditions optimales. L'étude a également montré que la mise en place d'une technique de chauffage des échantillons positifs est indispensable mais ne semble pas suffisante pour éliminer tous les défauts de spécificité ce qui reste un point de vigilance.

### **2.2.3. Evaluation des tests standard standard Q® et standard F *Legionella* Ag FIA® pour la recherche d'antigènes urinaires**

Ces 2 tests SD Biosensor revendus par la société Orgentec ont été évalués en 2018 sur urines non concentrées en comparaison au test BinaxNOW® sur urines concentrées.

- Pour le test standard Q®, test immuno-chromatographique pour la détection d'antigénurie *Legionella* associé à un lecteur, l'étude de spécificité sur 200 échantillons négatifs a montré une concordance de 100% entre les 2 tests lorsque la lecture était réalisée à l'œil. L'étude de spécificité sur échantillons connus positifs a été interrompue après obtention de 4 cas

- discordants (1 invalide et 3 négatifs) sur 14 échantillons testés. Par ailleurs, la lecture au lecteur n'était pas concluante, entraînant 18 résultats invalides sur les 200 négatifs.
- Pour le test standard F *Legionella* Ag FIA®, test immuno-chromatographique avec lecture par immunofluorescence, l'étude de sensibilité sur 200 échantillons négatifs a montré une concordance de 98% entre les 2 tests. Ce taux n'est pas de 100% uniquement en raison de 4 tests invalides. Pour 2 des échantillons invalides, le CNR a obtenu des résultats négatifs après utilisation d'un protocole « maison » de centrifugation de l'urine non précisé dans la notice. Le CNR n'a pas pu évaluer l'impact de cette centrifugation supplémentaire sur des échantillons positifs et sur un nombre suffisant d'échantillons négatifs. De telles recommandations pourraient faire défaut pour l'accréditation en portée A des laboratoires qui choisiront d'utiliser ce test. La concordance du test standard F® avec le test BinaxNow® est évaluée à 94% pour les antigénuries positives, liée à deux résultats discordants et 1 invalide. Parmi ces 2 discordants, une urine présentait un score de 0,94, proche de 1 (seuil de positivité). Le résultat de l'autre urine discordante (score à 0) a été imputé à un effet crochet (résultat très positif après dilution au 1/100 des urines).

#### **2.2.4. Evaluation du test ImmuView® de la société SSI Diagnostica, revendu par Biocentric, pour la recherche d'antigènes urinaires**

Le test ImmuView® évalué au CNR des Légionelles en 2018 est un test immuno-chromatographique combiné permettant la recherche à la fois de lipopolysaccharides de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 et de *Legionella longbeachae*. Il a été évalué sur urines non concentrées en comparaison au BinaxNOW® sur urines concentrées. L'étude de spécificité sur 200 échantillons négatifs a montré une concordance de 100% entre les 2 tests. Deux urines ont présenté une positivité à *L. longbeachae*, éliminée après chauffage de l'échantillon. En 2019, le CNR prévoit de continuer l'évaluation de ce test notamment sur échantillons positifs.

Une étude préliminaire de ce test sur urines concentrées a retrouvé 2 cas d'urines positives à *L. longbeachae* non éliminé après chauffage de l'échantillon. Les contextes cliniques des 2 patients n'étaient pas évocateurs de légionellose, ce qui nous fait suspecter des faux positifs et donc contre-indique l'utilisation d'urines concentrées pour ce test. Ce test a également été évalué sur l'urine d'une patiente ayant présenté une légionellose à *L. longbeachae* en 2018, mais le résultat s'est avéré négatif.

#### **2.2.5. Evaluation du test Legiolert™ commercialisé par la société IDEXX pour la recherche de *Legionella pneumophila* dans les eaux**

Le test Legiolert™, proposant une méthode de quantification de *L. pneumophila* dans les eaux par une recherche simple (sans test complémentaire) basée sur le nombre le plus probable (NPP), donnant une réponse à 7 jours, a été évalué en 2017 et 2018 au CNR des Légionelles et a fait l'objet de présentations sous forme de posters aux congrès ESGLI 2018 et RICAI 2018.

**Objectif.** Evaluer les performances de la méthode IDEXX Legiolert™, technique simple permettant la détection et la quantification de *Legionella pneumophila* (*Lp*) dans des échantillons d'eau potable en 7 jours basée sur le principe du nombre le plus probable (NPP).

**Matériels et méthodes.** Un total de 125 échantillons d'eau potable des Hospices Civils de Lyon ont été analysés avec la méthode Legiolert™ et avec la méthode de référence selon la Norme Française (NF) T90-431:2017. Ces échantillons ont été prélevés au niveau de robinets, douches, vannes ou fauteuils dentaires. Afin de vérifier la spécificité, 10% des puits positifs de la méthode Legiolert™ étaient ouverts et remis en culture sur géloses spécifiques.

**Résultats.** 72 échantillons étaient négatifs par les 2 méthodes, 10 positifs à *L. anisa* (seulement avec la NF), 43 étaient positifs à *Lp* (35 avec les deux méthodes, 5 avec la NF seulement et 3 avec la technique Legiolert™ seulement). Les puits positifs testés sur gélose ont montré une spécificité de 100% pour *Lp*. La concordance entre les deux méthodes était de 93,6%. La quantification de *Lp* obtenue avec Legiolert™ a été comparée avec celle obtenue avec la NF (incertitude de mesure: [-0,540; 0,540]) sur les 35 échantillons positifs par les 2 techniques.

Pour 26 échantillons, la différence entre les 2 techniques était comprise dans la zone d'incertitude. Pour les 8 échantillons à *Lp* autre que sérotype (sg) 1 (3 *sg*3, 4 *sg*3-6 et 1 *sg*4), Legiolert™ donnait des résultats inférieurs à ceux retrouvés par NF pour 6 échantillons. Cette différence était significativement différente lorsque la quantité de *Lp* était environ de 1000 UFC/L (2 échantillons) et le résultat Legiolert™ était supérieur à 1000 UFC/L alors que le résultat selon la NF était inférieur à ce seuil, seuil en France pour le déclenchement d'actions correctives.

**Conclusion.** La méthode Legiolert™ propose une méthode d'identification et de quantification de *Lp* dans l'eau potable, simple et rapide à réaliser, facile à interpréter et fiable (bonne spécificité et bonne concordance avec la méthode de référence). Certaines différences dans la quantification ont été observées, un nombre plus important d'échantillons devra être analysé pour permettre une conclusion sur ces données. Pour conclure, Legiolert™ pourrait aider aux contrôles sanitaires et permettre la mise en place d'actions correctives le plus précocement possible.

#### **2.2.6. Evaluation de l'ajout du réactif Free DNA Removal Solution (FDRS) dans le kit iQ-Check™ Reference (Biorad) pour la quantification de l'ADN de Legionella dans les eaux**

Fin 2018, le réactif FDRS ajouté suite à l'étape d'extraction de prélèvements d'eaux et permettant de limiter la quantité d'ADNg libre détecté a été évalué au CNR, en comparaison à la PCR Biorad sans ajout de ce réactif et à la culture sur des échantillons d'eaux chaudes sanitaires. L'étude se poursuit en 2019.

#### **2.2.7. Evaluation du kit R-DiaLeg et de l'appareil geneLEAD VIII pour PCR Legionella sur prélèvements respiratoires (société Diagenode)**

Le kit de PCR en temps réel R-DiaLeg est dédié à la détection qualitative de *Legionella* (*Lsp*) et *Legionella pneumophila* (*Lpn*) dans des prélèvements respiratoires et réalisée sur l'appareil geneLEAD VIII sur lequel est également réalisée l'extraction. Ce kit a été évalué en comparaison au kit PCR Legio pneumo/Cc r-gene® de BioMérieux.

Cette évaluation a été réalisée sur 167 échantillons (95 LBA, 51 expectorations, 20 aspirations trachéales et 1 liquide pleural) extraits sur le geneLEAD VIII en accord avec les recommandations du protocole R-DiaLeg. Sur les 143 échantillons pour lesquels un résultat a été obtenu avec les deux méthodes, le pourcentage de concordance positive est de 98,2% et le pourcentage de concordance négative de 92%.

Pour l'un des échantillons trouvés positifs avec le test R-DiaLeg et négatif avec l'autre test, la positivité a été confirmée avec un 3<sup>ème</sup> test du CNR ; les 6 autres échantillons étaient négatifs avec ce 3<sup>ème</sup> test. Le Ct des 6 tests positifs non confirmés par une autre méthode avaient tous un Ct > à 37. Les légionelloses à *Legionella non pneumophila* n'ont pas été intégrées dans ce tableau de concordance.

		Legio pneumo/Cc		Total
		r-gene		
		+	-	
R-DiaLeg	+	55	7	62
	-	1	80	81
Total		56	87	143



### 2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

#### Institut Pasteur, Algérie

Nous avons poursuivi en 2018 une collaboration initiée en 2016 avec le Dr Kahina SOUAMI. L'objectif de cette collaboration est de développer le diagnostic de légionellose à Alger afin de connaître l'incidence et d'identifier des sources de contamination.

Cette collaboration a permis la réalisation d'un poster au congrès européen ESGLI : K.Y.Souami, S.Taghight-Mah, S.Uldum, R.F.Petersen, S.Jarraud, O.Tizarouine, D.T. Haddadi, N.Boudjemline, S.M. Guettouche, H. Ammari, D.Yala, M. Ghaffor. *Legionella pneumophila* at Mitidja area (Algiers and neighbourhood), Algeria. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, Lyon, 28-30 August 2018.

Le travail plus ciblé sur le diagnostic de la légionellose à Alger et la caractérisation des cas de légionellose devraient permettre une publication commune.

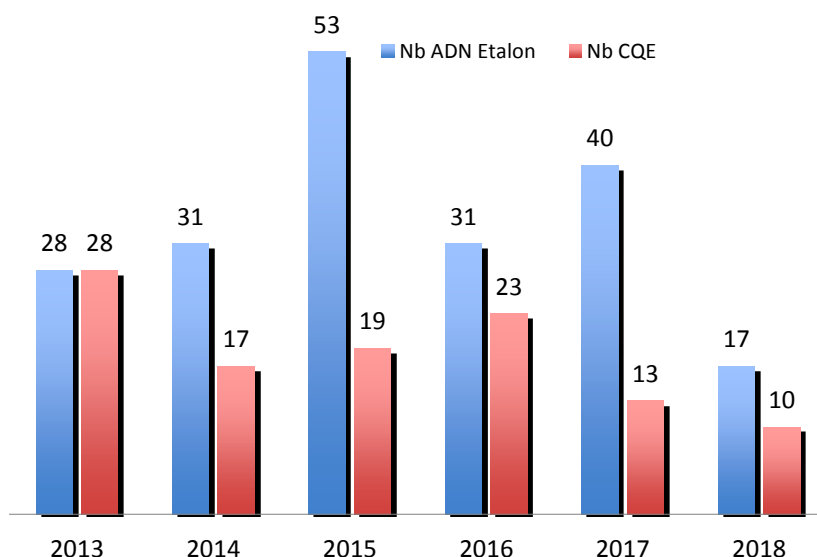
### 2.4. Collections de matériel biologique distribuées

#### ADN étalon pour la quantification d'ADN de *Legionella* dans l'eau par PCR

En 2018, 17 ADN étalon et 10 contrôles quantitatifs (raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement par le CNR à 12 laboratoires environnementaux dont 4 laboratoires à l'étranger (Canada, Royaume-Uni, Allemagne).

En parallèle, l'ADN étalon et les contrôles quantitatifs sont distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, uniquement dans des laboratoires à l'étranger. Nous envoyons 2 fois par an de l'ADN étalon ou des CQE à LGC à leur demande.

**Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif , 2013 -2018**



**Figure 1.** Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2018

#### Distribution de souches de *Legionella* au bureau technique AFNOR validation

En 2018, 16 souches de *Legionella* non *pneumophila* et 12 souches de *L. pneumophila* sérotype non 1 ont été cédées au bureau technique AFNOR validation, dans le cadre d'une expertise pour le laboratoire AdGene, un laboratoire expert pour la validation de solutions alternatives aux méthodes normatives.



## 2.5. Activités d'expertise

### 2.5.1. Synthèse de l'activité d'expertise

Le Tableau 1 résume de façon chiffrée l'activité du CNR pour l'année 2018 et son évolution depuis 2014.

**Tableau 1.** Evolution de l'activité du CNR, 2014-2018.

Nombre de prélèvements ou souches	2014	2015	2016	2017	2018
<b>EXPERTISE</b>					
<b>Expertise microbiologique</b>					
Sérologie	1393	1109	944	842	495 <sup>1</sup>
Culture de prélèvements cliniques	329	391	362	451	841 <sup>2</sup>
PCR sur prélèvements cliniques	236	309	284	254	383 <sup>3</sup>
Co-culture de prélèvements pulmonaires	262	252	177	253	434
Expertise antigènes urinaires	27	41	55	110	131
Identification de souches cliniques <sup>4</sup>	340	346	300	377	489
Expertise souches environnementales	458	515	445	462	472
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	11	9	4	2	5
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	3	3	3	6	3
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	7	5	7	8	5
<b>Développement et validation de tests diagnostiques (nombre d'échantillons ou de souches testé(s))</b>					
Antigènes urinaires	100	250	440	249	572
Eaux chaudes sanitaires	-	-	-	125	100
Prélèvements pulmonaires				100	167
<b>SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE</b>					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	46	64	74	65	62
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	480	604	510	607	349 <sup>5</sup>
PCR Lp1				358	459
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	143	223	166	115	91
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou NGS)	382	429	352	440	650 <sup>6</sup>
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS		114	228	366	434

<sup>1</sup> 495 patients pour lesquels 510 analyses ont été réalisées : 213 en immunofluorescence (parmi lesquels 10 pour un protocole de recherche clinique) et 297 en ELISA (parmi lesquels 24 pour un protocole de recherche clinique)

<sup>2</sup> parmi lesquels 152 pour un protocole de recherche clinique

<sup>3</sup> PCR réalisées : 291 PCR *L. pneumophila* - *L. non pneumophila* (Diagénode), parmi lesquelles 78 pour un protocole de recherche clinique, 99 *L. pneumophila* - *L. pneumophila* séro groupe 1 (PCR européenne ESGLI) dont 78 pour un protocole de recherche clinique.

<sup>4</sup> Pour des raisons de cohérence avec les données de Santé publique France, nous avons pris en compte les souches isolées de patients pour lesquels la date de début des signes se situe en 2018 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2018.

<sup>5</sup> 349 analyses en PFGE dont 141 isolats cliniques et 208 isolats environnementaux

<sup>6</sup> 314 ont été obtenus après analyse par SBT, 336 STs ont été obtenus ou confirmés par WGS

La technique de typage des souches par anticorps monoclonaux mAbs ayant été arrêtée à la fin de l'année 2017, cette ligne ne figure plus sur le tableau pour l'année 2018.

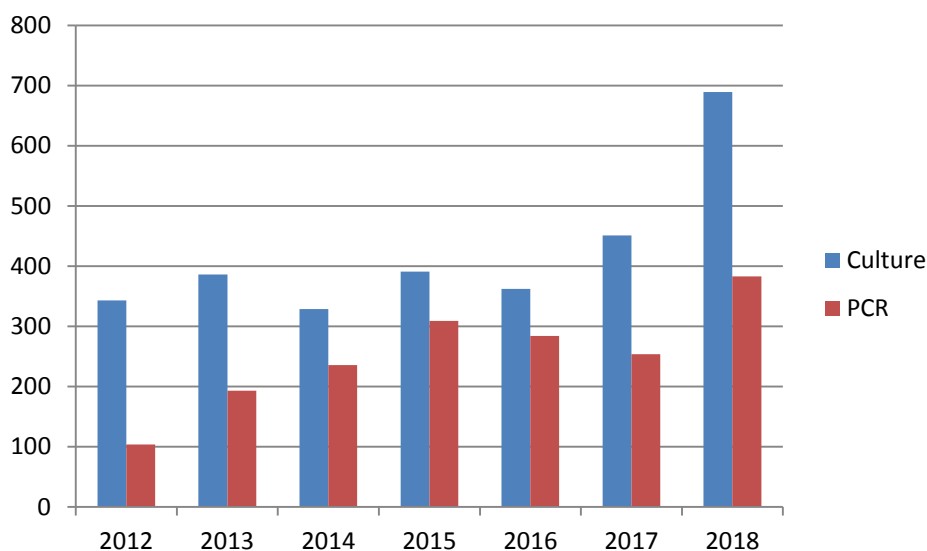
## 2.5.2. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses

Le CNR des Légionelles expertise tout prélèvement : prélèvement broncho-pulmonaire, urine, extrait d'ADN, etc... permettant de faire le diagnostic initial ou de confirmer un diagnostic réalisé dans le laboratoire d'origine.

Pour les investigations épidémiologiques des cas de légionellose, conjointement avec Santé publique France et les ARS, le CNR demande aux laboratoires d'adresser les prélèvements broncho-pulmonaires en cas d'antigénurie *Legionella* ou de PCR positive, lorsque la culture est négative ou qu'elle n'est pas réalisée dans le laboratoire d'origine.

### 2.5.2.1. Expertise de prélèvements broncho-pulmonaires

Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour culture a été plus élevé par rapport à 2017 (+53%) et reflète l'augmentation de l'incidence en 2018. Le nombre de prélèvements qui nous ont été adressés pour PCR est stable par rapport à l'année 2017 reflétant le développement des techniques de biologie moléculaire (PCR multiplexe ou autre) dans les laboratoires partenaires (Figure 2).



**Figure 2.** Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012-2018.

#### • Culture

**En 2018, 689 prélèvements pulmonaires** (patients avec antigène urinaire positif ou PCR positive) (protocole de recherche clinique exclu) ont été mis en culture sur milieux gélosés selon la technique conventionnelle. La culture s'est révélée positive pour 219 prélèvements, soit 31,8% des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*, APT), mise en œuvre sur les prélèvements présentant une culture négative, a permis d'isoler 13 souches additionnelles. Au total, **des légionelles ont été isolées** pour 232 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, soit **33,6% des prélèvements**. Ces taux sont faibles et inférieurs aux performances de l'année 2017 (37,5%). Des travaux notamment utilisant la capture par bille immuno-magnétique sont en cours en 2019. Cette faible performance peut être due à la spécificité des échantillons reçus au CNR pour lesquels la culture a souvent déjà été tentée par les laboratoires expéditeurs. Enfin, ces données montrent que sur les 489 souches de *Legionella* isolées en France en 2018, le **CNR a isolé près de la moitié (47,5%) des souches disponibles au niveau national**.

A noter que depuis 2018, l'APT n'est plus réalisée en systématique sur tous les prélèvements mais limitée à ceux présentant une forte contamination bactérienne sur milieu BPMA ou MWY (Descours *et al.*, JCM 2018).

- **PCR**

Les PCR sont réalisées en première intention chez les patients présentant un tableau clinique évocateur de légionellose le plus souvent associée à une antigénurie négative.

En 2018, le CNR a réalisé 198 PCR à visée diagnostique (dont 13 pour une étude clinique) pour des établissements extérieurs. Parmi celles-ci, 28 prélèvements avaient un antigène urinaire positif (dont les 13 de l'étude) et 170 avaient un antigène urinaire négatif, douteux, ou de résultat inconnu. Sur les 170 dossiers avec un antigène négatif ou non renseigné, **21 PCR étaient positives** dont **13 positives en *L. pneumophila*** et **8 positives en *L. non pneumophila***.

Pour les 13 prélèvements positifs en PCR *L. pneumophila*, la PCR Lp1 maison ou la PCR européenne ESGLI (détectant également Lp1) réalisés sur 10 échantillons (77%) était positive pour 6 patients (46%). Une culture a été réalisée sur 12 prélèvements dont une était positive en Lp1 (également positive en PCR Lp1 maison) et une en Lp6.

Au total, les différentes techniques PCR ont permis le diagnostic de 13 cas de légionellose dont **6 cas de légionellose à Lp1** qui avaient tous un antigène urinaire négatif. Les 7 autres cas sont potentiellement des cas à *L. pneumophila* non sérotype 1 (avec une antigénurie négative pour 6 cas).

**Pour les 8 prélèvements positifs en *L. non pneumophila***, la PCR 23S-5S a été réalisée pour 6 patients et était positive pour **4 patients** (2 *Legionella gratiana*, 1 *Legionella longbeachae* et 1 *Legionella cherii*). Une culture a été réalisée pour 6 prélèvements, tous étaient négatifs.

Pour étudier l'apport de la PCR au niveau d'une institution, nous avons analysé les résultats obtenus en 2018 concernant l'utilisation de la PCR *Legionella* utilisée pour les patients hospitalisés aux Hospices Civils de Lyon (hors activité entrant dans le champ du CNR). Un total de **603 PCR diagnostiques** ont été réalisées parmi lesquelles 601 patients avaient un antigène urinaire négatif (n=224) ou non effectué (n=377). A noter une très grande prescription de PCR diagnostique en systématique, pour lesquelles seuls 37,2% des patients avaient au préalable eu une recherche d'antigène urinaire.

Parmi les 603 PCR réalisés, **44 PCR étaient positives** dont **19 positives en *L. pneumophila* (3.5%)** et **23 positives en *L. non pneumophila* (3.8%)**.

**Pour les 19 cas à *L. pneumophila***, la PCR Lp1 (maison ou ESGLI) réalisée sur 13 prélèvements (62%) a permis de confirmer **2 cas à Lp1** (dont 1 également en culture) et la culture réalisée sur 16 prélèvements a permis de confirmer **1 cas à Lp6** et **1 cas à Lp8**. Sur les 15 prélèvements restants pour lesquels le sérotype n'a pas pu être déterminé, l'antigène urinaire était négatif pour 5 patients et non effectué pour les 10 autres.

**Vingt-trois PCR ont été rendues positives uniquement en *Legionella non pneumophila***.

Parmi celles-ci, la PCR 23S-5S a été réalisée sur 16 prélèvements et était négative dans tous les cas. Vingt-deux prélèvements ont été mis en culture qui n'a pas permis l'identification de la *Legionella*. Pour ces 23 PCR positives, les Ct rendus étaient tardifs, signifiant une charge bactérienne très faible ou pouvant indiquer une fausse positivité.

L'ensemble de ces données montre que la PCR peut avoir un grand intérêt en première ou deuxième intention pour diagnostiquer des cas de légionellose, parfois à Lp1 malgré une antigénurie négative, et renforce la volonté du CNR de promouvoir la PCR.

### 2.5.2.2. Expertise de prélèvements urinaires

En 2018, 131 urines (provenant de 84 patients) testées avec différents kits par les laboratoires expéditeurs ont été analysées, dans différents contextes :

- confirmation d'un résultat positif ;
- résultat douteux ;
- résultats discordants entre deux antigénuries successives, entre une antigénurie et une PCR sur prélèvement respiratoire, entre deux résultats obtenus avec des kits différents ou entre une antigénurie lue à l'œil nu et lue avec un lecteur automatisé ;
- le laboratoire expéditeur utilisait depuis peu un nouveau test pour effectuer la recherche d'antigènes urinaires *Legionella* et souhaitait confirmer ses premiers résultats.

La majorité des prélèvements nous ont été adressés pour confirmation diagnostique, en particulier pour des laboratoires ayant récemment mis en place une nouvelle technique (4 urines pour confirmation du test Monlab) ou ayant démarré une lecture automatisée suite au développement de cet outil par les deux principaux fournisseurs de tests. Cinq prélèvements urinaires nous ont été adressés dans le cas d'une discordance entre 2 techniques (essentiellement entre BinaxNOW® Alere et Quidel ® Sofia). Huit prélèvements nous ont été adressés dans un contexte de discordance entre une lecture visuelle et automatisée par un lecteur, ou discordance entre deux lecteurs (2 pour le lecteur Sofia et 6 pour le lecteur Alere). Pour le test Sofia, les 2 tests étaient rendus négatifs par une deuxième technique (par ELISA ). Pour les 6 cas de discordance avec le lecteur Binax Alere (positifs par le lecteur et négatifs à la lecture visuelle sur urines natives), 4 étaient positifs et 2 négatifs (par technique ELISA et/ou Sofia)

Au moment de l'augmentation importante du nombre de cas de légionellose notamment en Ile de France et en Auvergne-Rhône-Alpes au cours des mois de mai-juin 2018, plusieurs hypothèses ont été soulevées pour tenter d'expliquer cette augmentation. L'une des hypothèses investiguées a été la modification des pratiques diagnostiques et notamment l'apparition des lecteurs pour les tests urinaires. Le CNR durant cette période n'a pas reçu plus d'urines pour confirmation de tests dans ce contexte. Le CNR n'a pas été alerté par des diagnostics associés à des tableaux cliniques non compatibles avec une légionellose. Enfin, les résultats de nos travaux réalisés en 2017 sur le lecteur du kit BinaxNOW® Alere, largement utilisé, montraient que le lecteur apportait un gain de sensibilité. Par contre, il entraînait une perte de spécificité avec une augmentation du nombre de faux positifs (4/200). Mais le chauffage des échantillons d'urines avait permis d'éliminer l'ensemble des faux positifs. Ce chauffage est recommandé pour ce test mais également pour tous les tests commercialisés.

Enfin, la période très courte associée à cette augmentation du nombre de cas est peu compatible avec une modification des pratiques diagnostiques.

### 2.5.2.3. Expertise pour sérologie

En 2018, le CNR a réalisé 510 sérologies (pour 495 patients) pour des laboratoires extérieurs : 297 sérologies par technique ELISA comme méthode de screening (dont 60 positives seulement) et 213 sérologies pour expertise par technique d'immunofluorescence. Parmi celles-ci, 25 étaient positives pour Lp1, et 30 pour les autres sérogroupes (Lp 2-4, Lp5-6 et Lp 7-10). A noter qu'il existe de nombreux croisements entre les sérogroupes de *Legionella pneumophila* non 1.

On note une **diminution de 41%** des tests sérologiques réalisés en 2018 par rapport à 2017. Cette diminution a été voulue et favorisée par le CNR et est en accord avec les recommandations du comité des CNR. Ainsi dans le but d'améliorer la pertinence des envois de sérologies au CNR, 44 centres hospitaliers ou centres hospitalo-universitaires répertoriés comme nous envoyant des sérums ont été contactés en 2018 pour connaître la technique utilisée localement. Pour les laboratoires disposant déjà d'une technique de screening, ou sous-

traitant le screening à un autre laboratoire, nous avons privilégié une confirmation par immunofluorescence sans refaire de test de dépistage. Dans les cas où la technique de dépistage n'était pas réalisée, nous avons encouragé les laboratoires à abandonner cette méthode diagnostique ou à réaliser le screening sur leur site ou encore à faire appel à des laboratoires prestataires. Pour les sérums reçus en 2018 sans test de screening préalable, nous avons réalisé un screening par ELISA, suivi d'une confirmation par immunofluorescence en cas de positivité.

En 2018, 46 partenaires nous ont fait parvenir des sérums pour diagnostic ou confirmation sérologique, correspondant à la très grande majorité des laboratoires contactés durant 2018.

### **2.5.3. Restitution des résultats**

Le délai moyen de restitution des résultats du CNR aux laboratoires est de :

- 48h (jours ouvrables) pour une PCR à visée diagnostique ;
- 48h (jours ouvrables) pour une expertise d'antigènes urinaires ;
- 3 semaines pour une culture associée à une co-culture amibienne (si négatives) ;
- 3 semaines pour la détection de *Legionella* par culture et/ou PCR à partir de prélèvements d'eau complexes ;
- 3 semaines pour l'identification et le typage d'une souche clinique ou environnementale ;
- moins d'1 mois pour une confirmation de sérologie positive.

Les résultats positifs sont systématiquement communiqués par appel téléphonique et/ou email au biologiste correspondant. Un compte-rendu papier, associé à un courrier réponse, lui est adressé dans un second temps.

## **2.6. Activités de séquençage**

### **Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?**

**OUI**

- *Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, préciser quelle(s) plateforme(s) :*  
**Interne aux Hospices Civils de Lyon**
- *Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès :*

Le CNR a accès en externe à la plateforme des Hospices Civils de Lyon dédiée au diagnostic par les techniques de séquençage haut débit nouvelle génération. Cette plateforme compte 2 séquenceurs Nextseq et 1 Miseq Illumina, 2 séquenceurs Ion torrent (1 PGM et 1 X5); ainsi que tout l'équipement pour la préparation des banques : 1 Covaris, 1 AB builder, 1 Ion Chef, 2 One touch, 2 ES-one touch, 2 automates de pipetage (1 Sciclone et 1 Zéphir, Caliper).

Le CNR s'est également doté en interne d'un séquenceur MinION Oxford Nanopore.

### **Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?**

**OUI**

*Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, préciser la source ;*

#### Expertise interne :

La plateforme possède également les ressources pour l'analyse et le stockage des données générées avec 6 stations de travail informatique Windows et/ou Linux équipées de plusieurs logiciels d'analyses, 2 serveurs de stockage sécurisés à la direction du système d'information et de l'informatique (DSII) des Hospices Civils de Lyon, un accès sécurisé (payant) à un cluster de calcul haute capacité (Université de Bourgogne) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologistes développant conjointement des outils d'analyse mutualisés pour les différents services.

#### Expertise externe :

Le CNR participe également à un groupe de travail européen pour le design et l'évaluation d'analyse de typage par cgMLST de *Legionella pneumophila*.

Le CNR à accès aux outils bioinformatiques développés par le service de bioinformatique (BIBS) du Centre de recherche en infectiologie de Lyon (CIRI) ainsi qu'à ceux développés par le service de bioinformatique du LBMC de l'ENS de Lyon.

*Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...*

Le CNR utilise beaucoup d'outils open source inclus ou non dans des pipelines maison (samtools, bcftools, BWA, bowtie, fastqc, trimmomatic, SPAdes, Pilon, Snippy, nullarbor, prokka, roary, Parsnp, Figtree, RaxML, Fasttree, seaview, Chewbbaca, unicycler, porechop, guppy, gubbins, albacore, deepbinner...). La DSII a également installé sur un serveur sécurisé le Logiciel BIGSDG (open source), permettant notamment la gestion des bases de données NGS et des analyses de type cgMLST.

### **Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?**

**OUI**, pour les activités suivantes :

#### Investigations d'épidémies

Le séquençage NGS est réalisé dans le cadre d'investigation d'épidémie en particulier lorsque celles-ci impliquent des clones de *Legionella pneumophila* non différenciables par les techniques standard.

#### Surveillance

Le séquençage NGS est également réalisé dans le cadre de la surveillance mais pas sur l'ensemble des isolats cliniques ou environnementaux.

### **Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles).**

Plusieurs analyses bio-informatiques sont conduites à partir des données NGS :

Le MLST standard (SBT, 7 gènes) est extrait des séquences NGS et permet une correspondance entre une des méthodes de typage standard et les nouvelles méthodes. Cette analyse peut être réalisée en première intention.

L'analyse phylogénétique à partir de mapping sur un génome de référence ou d'assemblages *de novo* est réalisée pour différencier les grands clones de *Legionella pneumophila* dans un contexte épidémique.

Un protocole commun de cgMLST et une base de données commune européenne sont en cours de développement par le groupe de ESGLI auquel nous participons activement.

### **Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année**

Dans le contexte d'investigation d'épidémies ou à la recherche de sources de contamination, 166 souches ont été séquencées.

### **Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance : nombres de séquences réalisées dans l'année, modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...**

Dans le contexte de surveillance 268 souches ont été séquencées. La sélection est essentiellement basée sur la disponibilité des appareils de la plateforme ainsi que de notre capacité à détacher du personnel CNR (la plateforme est sur un autre site des HCL dans la ville nécessitant que le personnel soit délocalisé pour cette activité sur une journée). Notre objectif est d'analyser l'ensemble des isolats cliniques par WGS.

### **Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fasta/fastq files) :**

- Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales)

Les données brutes sont stockées sur un serveur sécurisé des services informatiques des HCL. Une partie des données fastq et fasta (sans metadata) ont été déposées dans une base de données internationale fermée dans le cadre du développement du cgMLST.

- Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans metadata associées

Les données déposées dans le cadre du développement du cgMLST seront déposées dans une base de données publique (ENA et/ou NCBI) dans le cadre de la publication de ce travail.

Les données déposées dans le cadre de la publication d'investigations particulières sont déposées dans une base de données publique (ENA et/ou NCBI) préalablement à chaque publication.

### 3. Activités de surveillance

#### Éléments clés en 2018 concernant les activités de surveillance :

- Augmentation de 30,8% du nombre de cas notifiés à Santé publique France en 2018 (2133 cas) par rapport à 2017 (1630 cas) et 75% par rapport à 2016 (1218 cas) ;
- Augmentation (+29,7%) du nombre de souches cliniques identifiées et typées par le CNR ;
- 10 cas sporadiques à *Legionella longbeachae* ont été diagnostiqués sans identification de sources de contamination ;
- Analyse de 434 isolats en WGS (+15,6%) : 166 dans le cadre d'investigations et 268 à des fins de surveillance ;
- L'investigation de la sur-incidence de cas au mois de mai-juin 2018 n'a pas permis d'identifier de cas groupés ni d'expositions communes ;
- Les souches isolées pour les cas diagnostiqués au cours de l'épisode de mai-juin 2018 ne présentent pas de STs spécifiques, différents de la distribution observée au cours de l'année ;
- Moins de 3% de l'ensemble des cas de légionellose déclarés en 2018 a fait l'objet d'investigations microbiologiques (typage) à la recherche de la source de contamination ;
- Mais plus de 68 % des investigations se sont révélées positives ;
- Les laboratoires partenaires nous envoyant les souches d'origine clinique ou les prélèvements sont des laboratoires de centres hospitaliers couvrant globalement l'ensemble du territoire Français

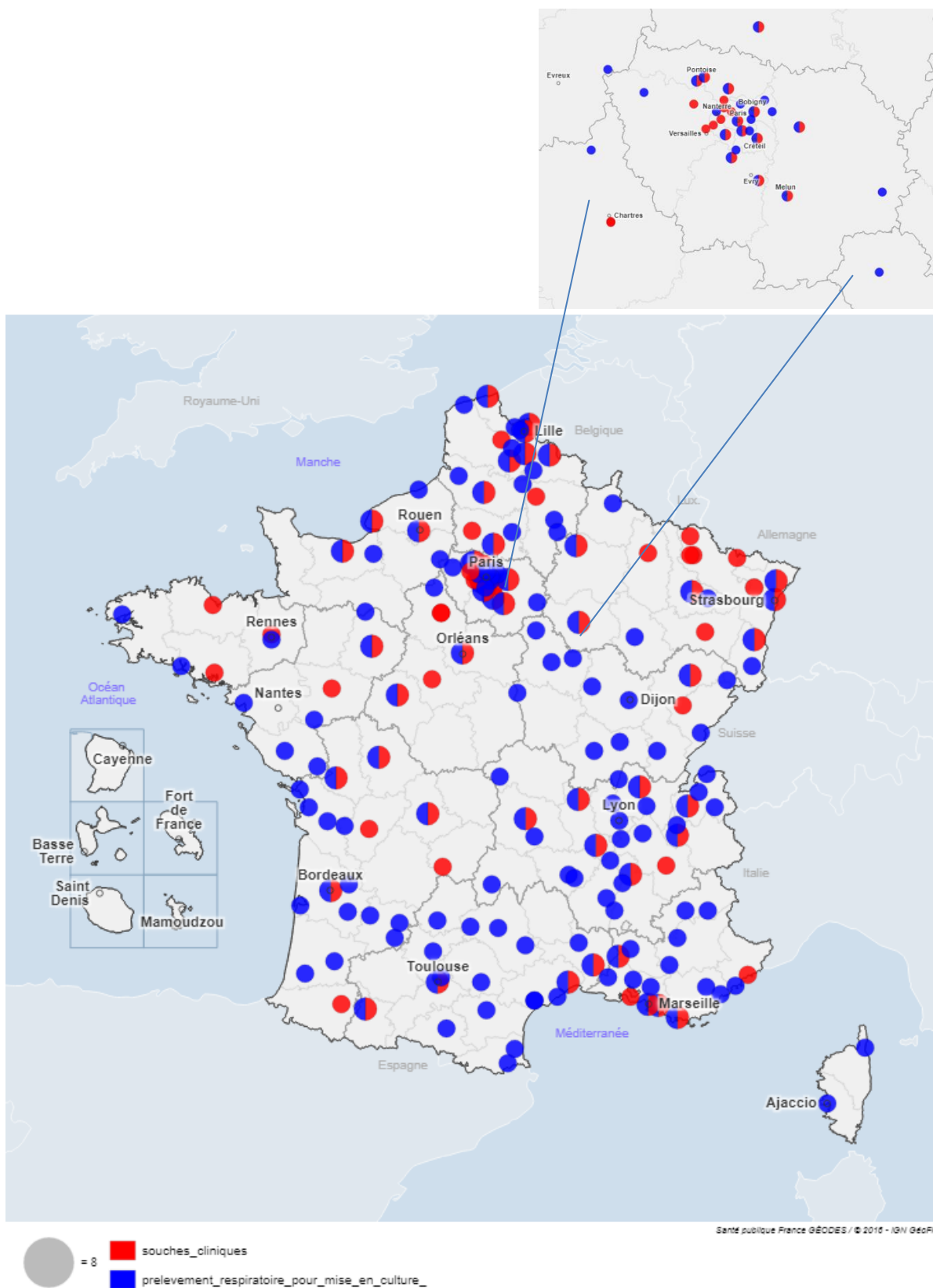
#### 3.1. Description du réseau de partenaires

Le CNR est sollicité pour son activité épidémiologique (mise en culture et typage des souches cliniques de *Legionella*). Nos partenaires sont répartis sur l'ensemble du territoire Français (Figure 3).

En 2018, **100 partenaires** nous ont envoyé **277 souches cliniques**, soit **plus de 50% de souches reçues par rapport à 2017** (186 souches reçues) pour un nombre équivalent de partenaires (94 en 2017). Comme en 2017, ces souches représentent la moitié des isolats cliniques isolées en France ; l'autre moitié ayant été isolée au CNR. La grande majorité (97/100) des laboratoires envoyant ces souches sont des laboratoires de centres hospitaliers.

En parallèle, **186 partenaires** nous ont envoyés **689 prélèvements respiratoires** pour mise en culture (diagnostic déjà réalisé par antigénurie et/ou PCR). Comme sur les souches cliniques, ce chiffre représente une **hausse d'activité de 53%** (451 prélèvements en 2017) et une quinzaine de partenaires supplémentaires, signant bien une augmentation sur l'ensemble du territoire du diagnostic de légionellose. Parmi eux, nous recensons 157 laboratoires de centres hospitaliers et 29 laboratoires hors institution. La culture de *Legionella* reste donc rare hors institution. Cependant, le nombre important de prélèvements reçus pour mise en culture semble indiquer une bonne sensibilisation des partenaires. Certains laboratoires nous adressent à la fois des souches cliniques et des prélèvements respiratoires lorsque la culture dans leur laboratoire est en échec, respectant ainsi nos recommandations.



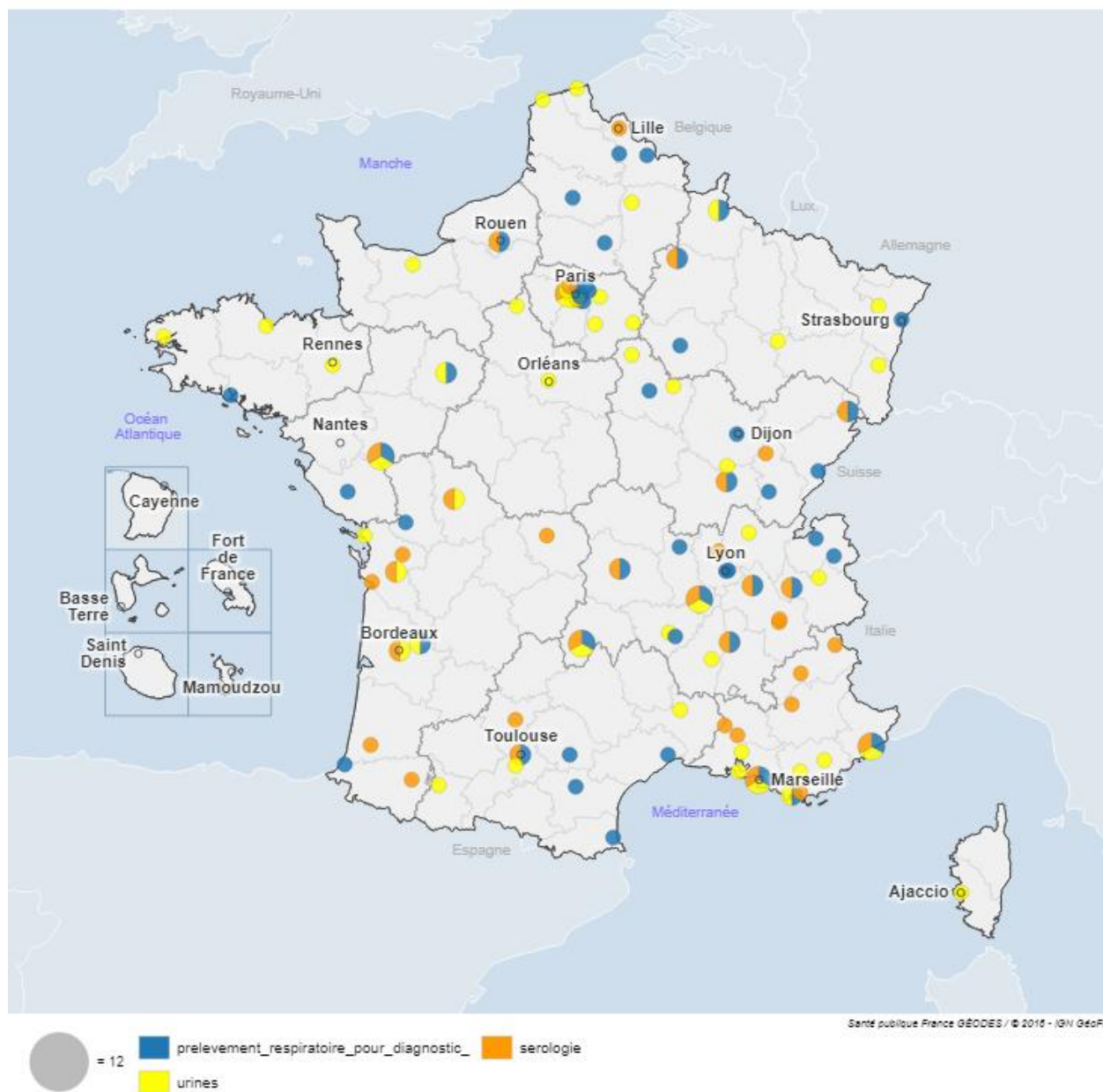


**Figure 3.** Villes partenaires ayant envoyé en 2018 au moins une souche clinique ou au moins un prélèvement respiratoire pour mise en culture.

Le CNR est également sollicité pour l'aide au diagnostic de légionellose (Figure 4). En 2018, **59 partenaires** nous ont envoyé environ **213 prélèvements respiratoires pour diagnostic**

(antigénurie négative ou non réalisée). Ce chiffre est stable par rapport à 2017. D'autres laboratoires que le CNR proposent la PCR *Legionella* sur prélèvements respiratoires et le développement des PCR multiplex fait que cette technique est de plus en plus accessible à l'ensemble des partenaires sans avoir recours à nos services.

De plus, **53 partenaires** nous ont envoyé des **prélèvements d'urines** pour expertise et **46 partenaires** nous ont fait parvenir des sérums pour **diagnostic ou confirmation sérologique**.



**Figure 4.** Villes partenaires ayant envoyé en 2018 au moins un prélèvement pour diagnostic et/ou expertise.

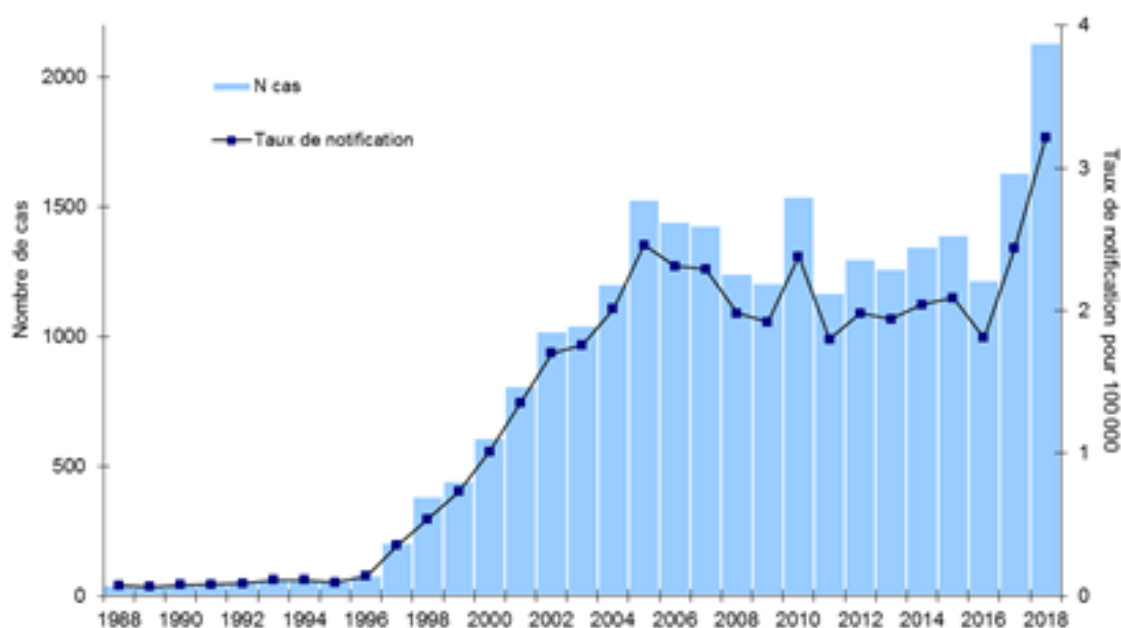


## 3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

### 3.2.1. Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF)

En 2018, **2133 cas de légionellose** ont été notifiés en France. Parmi eux, 20 cas étaient des résidents des DOM (3 cas en Guadeloupe, 1 en Martinique, 1 en Guyane et 15 à la Réunion) et 26 étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine était de **3,2/100 000 habitants**.

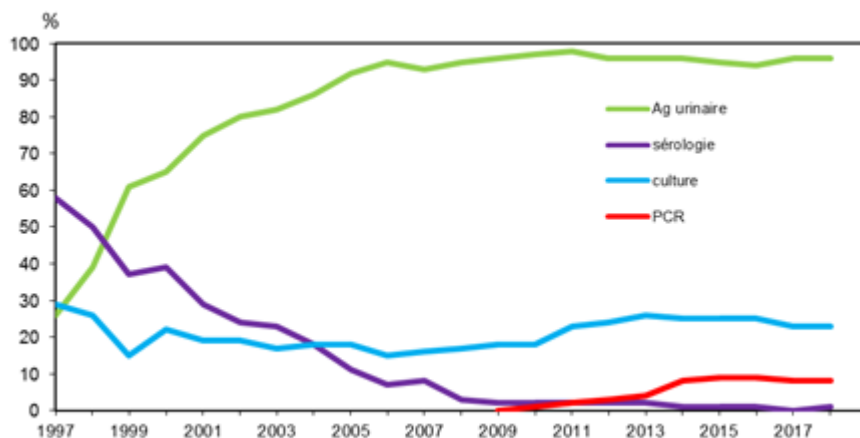
Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2018 était très nettement supérieur à celui de 2017 (+30,8%), où 1 630 cas avaient été enregistrés (incidence de 2,4/100 000 habitants) (Figure 6). La tendance à l'augmentation constatée en 2017 s'est poursuivie en 2018 avec un nombre de cas record depuis le début de la surveillance.



**Figure 6.** Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2018 (Santé publique France).

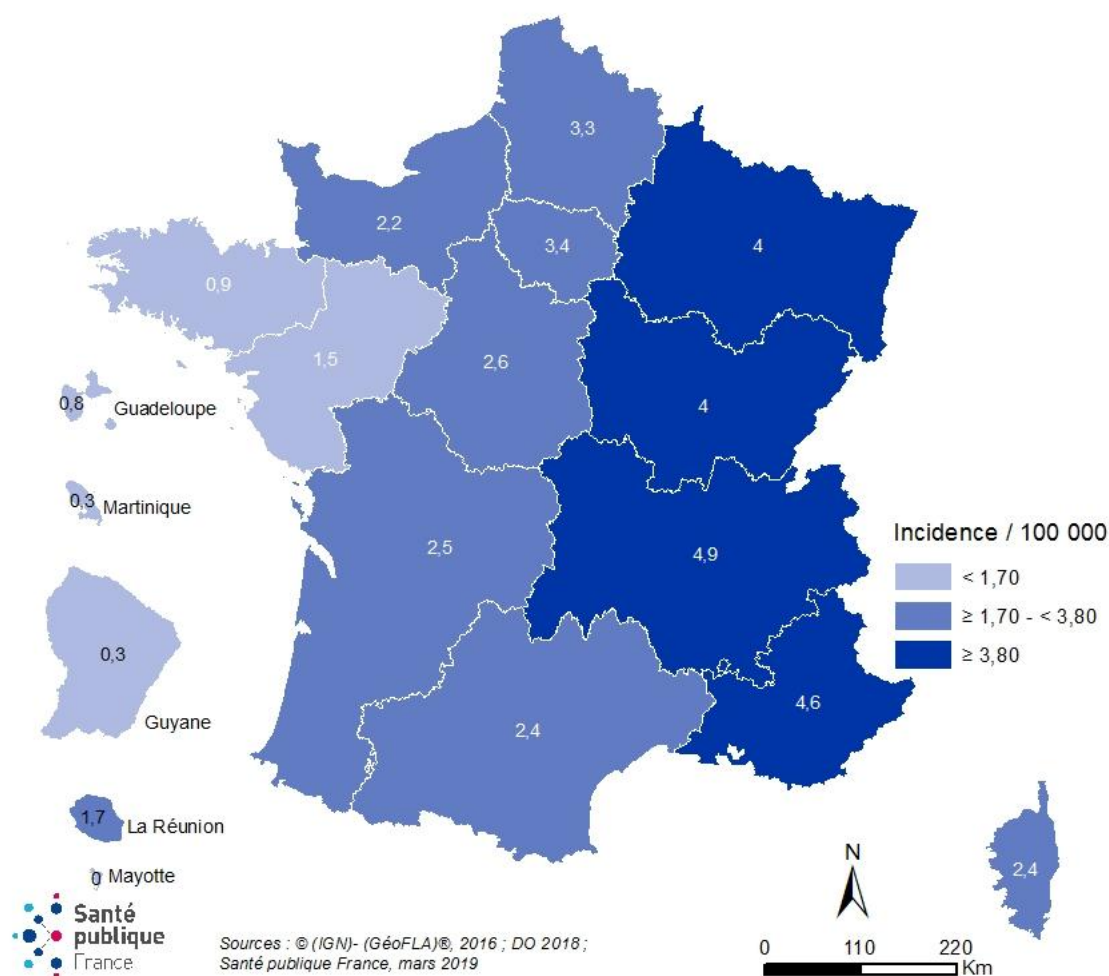
Cette augmentation du nombre de cas diagnostiqués en 2017 et 2018 a été mise en évidence pour de nombreux pays européens. L'hypothèse du rôle des conditions météorologiques a été évoquée même si les causes sont encore en cours d'investigation.

Parmi les 2133 cas, 2094 (98%) étaient des cas confirmés et la détection des antigènes solubles urinaires était la principale méthode diagnostique utilisée (2048 cas, 96%). Une PCR a été réalisée pour 169 cas (8%) et pour 39 d'entre eux, la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique (31 en 2017). La proportion de cas diagnostiqués par PCR n'a pas augmenté ces dernières années (Figure 7).



**Figure 7.** Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2018.

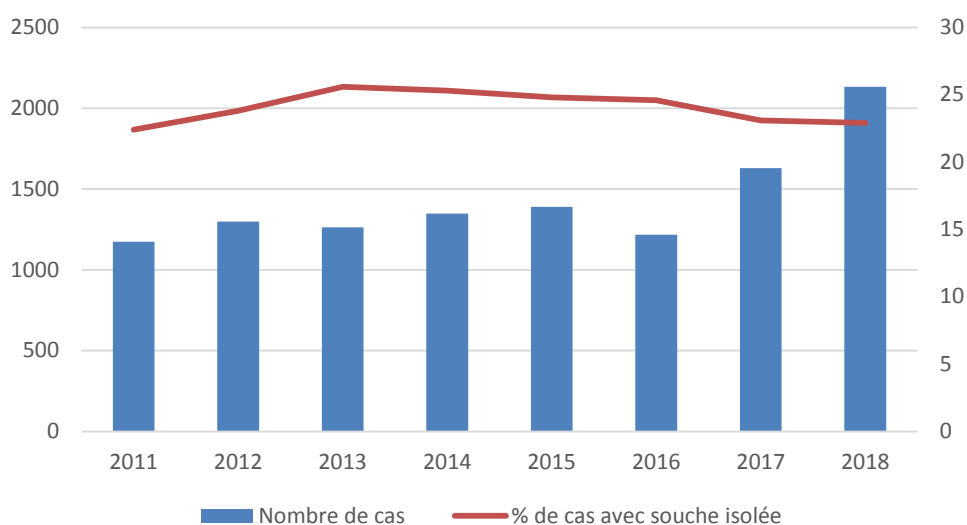
Le gradient géographique Ouest-Est du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose était toujours marqué en France en 2018 et l'incidence variait de 0,9/100 000 habitants en Bretagne à 4,9/100 000 habitants en Auvergne-Rhône-Alpes (Figure 8).



**Figure 8.** Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2018 (Santé publique France).

### 3.2.2. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR

Parmi les 2133 cas de légionellose notifiés en 2018, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 489 cas soit 22,9% des cas. Ce pourcentage est comparable à celui des années précédentes (Figure 9).



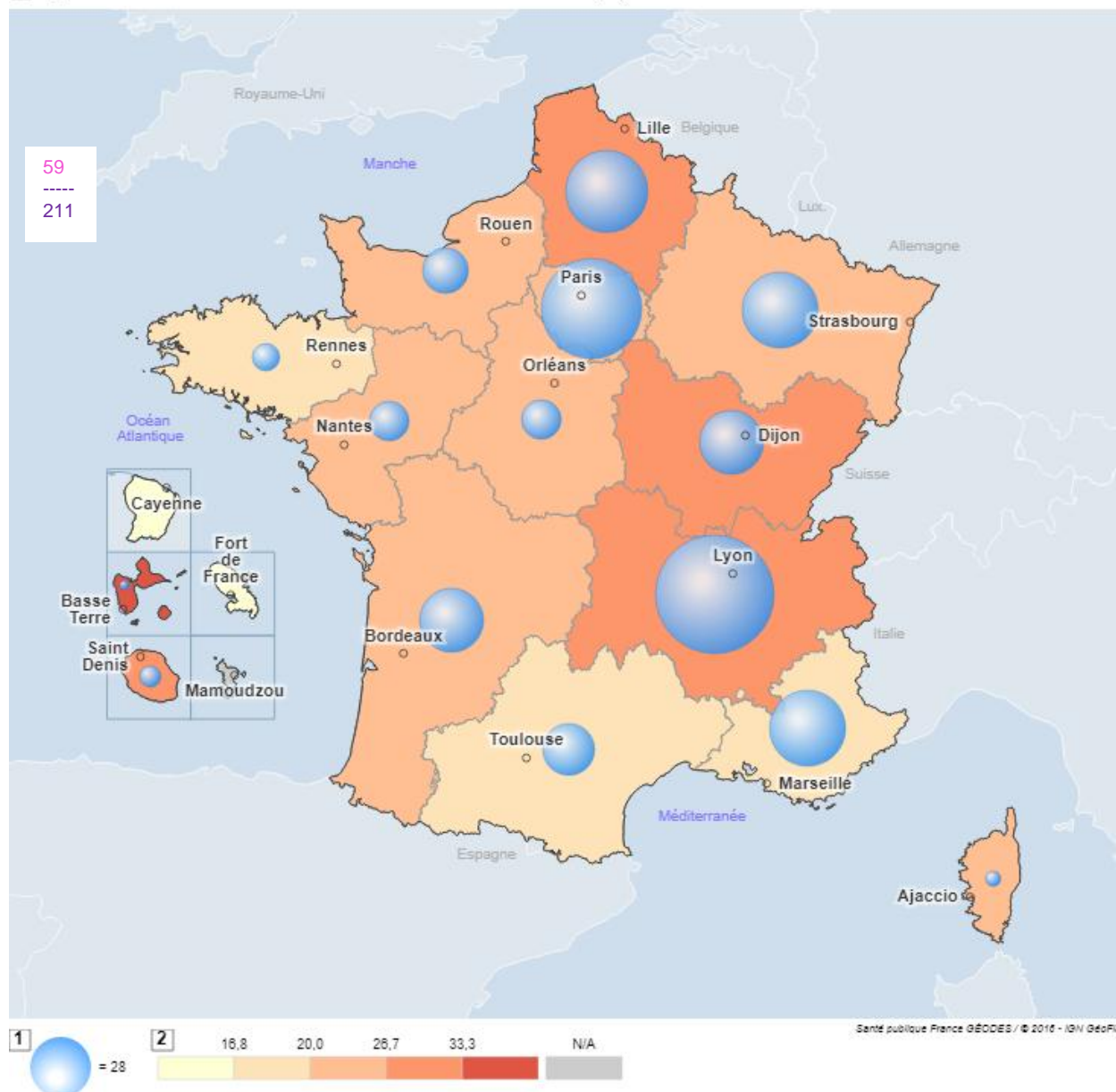
**Figure 9.** Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2018.





1 Nombre de Souches isolées 2018 - Source :

2 rapport nombre de souches isolées sur nombre de cas déclarés (%) - Source :



**Figure 11.** Origine des souches reçues ou isolées en 2018 superposée au nombre de cas par région (en fonction du lieu du laboratoire d'envoi).

Pour toutes les régions, nous remarquons que le pourcentage de souches isolées par rapport au nombre de cas déclarés est stable et proche de la valeur moyenne nationale de 22,6%. Ce taux apparaît plus faible en Bretagne, en Languedoc-Roussillon et en PACA. Il est plus élevé en Bourgogne-Franche-Comté, en Auvergne-Rhône-Alpes et dans les Hauts-de-France.

### 3.2.2.1. Espèces et sérogroupes

Toutes les souches de *L. pneumophila* d'origine clinique reçues au CNR des Légionelles sont systématiquement caractérisées par latex agglutination (réactif Oxoid) et utilisation d'anticorps (immunofluorescence ou latex) pour caractériser leur sérotype. Les souches de *Legionella* non *pneumophila* sont identifiées par séquençage du gène *mip* et, lorsque cela est possible, par MALDI-TOF (Vitek MS, base de données RUO).



Parmi les 489 souches isolées, la majorité (478/489, 98%) étaient des *L. pneumophila* dont 451 Lp1 et 22 appartenant à d'autres sérogroupe (Tableau 2).

**Tableau 2.** Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupe de *L. pneumophila*, 2011 – 2018.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements							
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<i>Legionella pneumophila</i>	259	304	321	333	342	296	373	478
sérogroupe 1	248	294	305	313	328	281	361	456
sérogroupe 2		2	2	3			1	
sérogroupe 3	2	6	9	6	3	1	5	6
sérogroupe 4	4					1		
sérogroupe 5	2		2	1	1			
sérogroupe 6		1	2	2	4	6	2	5
sérogroupe 7	2		1	2	3	1	1	
sérogroupe 8	1	1		2		1	1	2
sérogroupe 10				3	1	3		2
sérogroupe 12							1	1
sérogroupe 13						1		
sérogroupe 14								1
sérogroupe indéterminé*				1	2	1	1	5
<i>Legionella non pneumophila</i>	4	3	2	7	4	4	5	11
<i>Legionella dumoffii</i>		1	1				1	1
<i>Legionella micdadei</i>	1			1		2		1
<i>Legionella longbeachae</i>	1	1	1	5	2			8
<i>Legionella anisa</i>					1		1	
<i>Legionella tucsonensis</i>								
<i>Legionella gormanii</i>							1	
<i>Legionella bozemanii</i>	2	1		1	1	1	1**	
<i>Legionella feelei</i>							1	
<i>Legionella cincinnatiensis</i>								
<i>Legionella wadsworthii</i>								
<i>Legionella sainthelenensis</i>								1
<i>Legionella maceachernii</i>						1		
<b>Total</b>	<b>263</b>	<b>307</b>	<b>323</b>	<b>340</b>	<b>346</b>	<b>300</b>	<b>378</b>	<b>489</b>

\* réaction croisée entre sérogroupe 3 et 6 en immunofluorescence directe

\*\* fièvre de Pontiac

En parallèle de l'augmentation déjà décrite des cas de *Legionella* en 2018, nous remarquons une **augmentation des cas d'infections à *L. longbeachae*** avec 8 souches isolées en 2018 et 2 diagnostics posés par PCR uniquement (culture négative). Ceci est à rapporter à l'augmentation générale du nombre de cas mais également à l'augmentation d'utilisation des techniques moléculaires. En effet, sur les 10 cas diagnostiqués en 2018, nous savons que pour 2 d'entre eux, c'est un diagnostic positif par PCR *Legionella* spp qui a poussé à faire la culture. Pour 6 autres cas, nous n'avons pas pu recueillir l'information. De façon étonnante pour 2 cas, la détection d'antigène urinaire était positive; et pour l'un de ces cas la PCR *L. pneumophila* était positive. Nous avons suspecté une co-infection au moins pour ce dernier cas. Nous avons réalisé un séquençage NGS d'un amplicon 16S universel directement sur prélèvement par la technique MinION (voir § 2.1.1) afin de vérifier l'hypothèse d'une co-infection par *L. pneumophila* et *L. longbeachae*. Malheureusement les résultats n'ont pas permis de conclure.

Au CNR, ces 8 souches ont été identifiées par MALDI-TOF et PCR *mip* suivi d'un séquençage. Cinq de ces souches avaient déjà été identifiées correctement par les laboratoires expéditeurs grâce à des techniques de MALDI-TOF.

Enfin pour 3 des cas, une enquête environnementale a été réalisée. *L. longbeachae* étant particulièrement présente dans les terreaux et composts, des PCR et cultures ont été réalisées sur des échantillons de terreaux utilisés par l'un des patients. Sur tous ces échantillons, les PCR *Legionella* spp étaient positives; certains étaient positifs également à *Legionella pneumophila*. Les cultures étaient fortement contaminées, ne nous permettant pas d'isoler de souches de *Legionella*. Pour connaître la diversité des espèces retrouvées, une analyse par métagénomique ciblée sur le 16S a été tentée mais elle ne nous a pas permis d'identifier la présence spécifique de *L. longbeachae*. Pour 2 autres patients, l'enquête environnementale a permis d'isoler des souches de *Legionella* d'eau chaude sanitaire et de TAR mais il ne s'agissait pas de *L. longbeachae*.

#### 3.2.2.2. Typage

- **PFGE**

Dans le but de basculer progressivement vers une base de données de souches génotypées par WGS, nous avons décidé au cours de cette année de ne plus réaliser le typage systématique par PFGE de toutes les souches cliniques. Seules les souches impliquées dans une enquête épidémiologique sont génotypées par PFGE dans le but de faire un premier crible des souches environnementales à tester par la suite en SBT et/ou en NGS. Dans ce contexte, 349 souches ont été typées par PFGE en 2018.

- **ST**

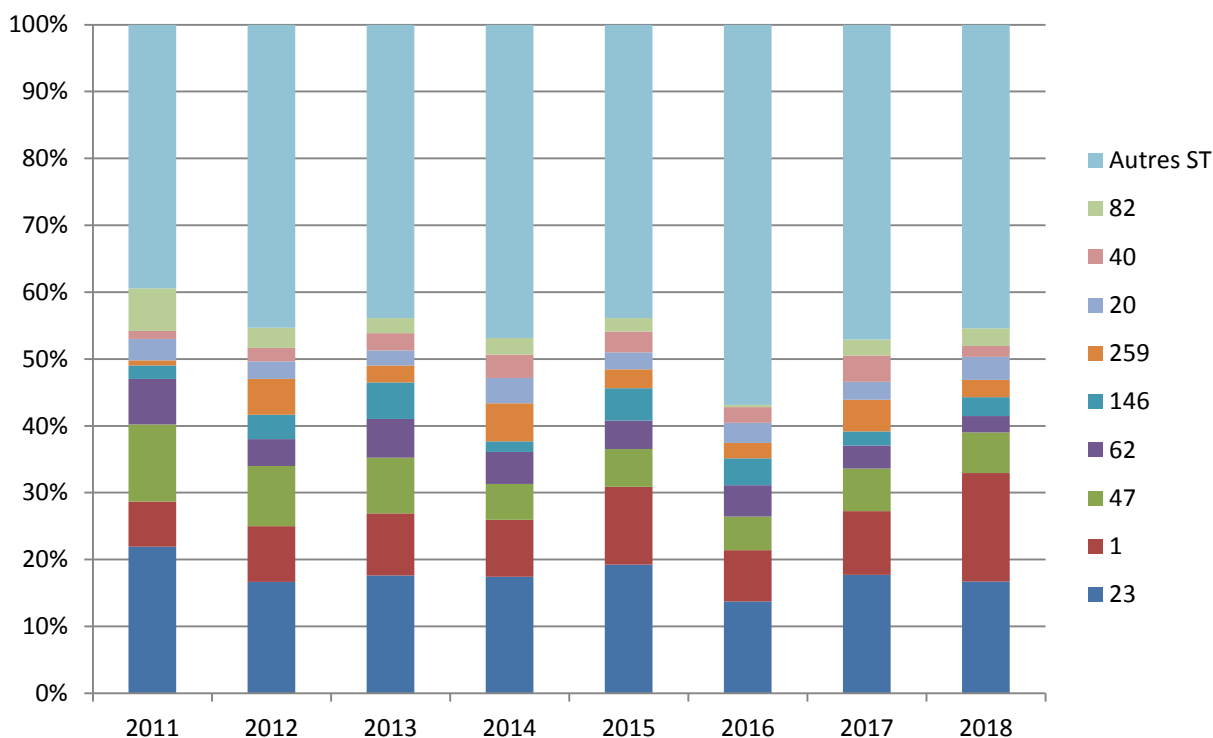
Un *Sequence Type* est obtenu pour l'ensemble des souches de *L. pneumophila* d'origine clinique reçues au CNR. Ce ST est extrait de l'analyse des génomes entiers ou est obtenu par amplification et séquençage nucléotidique (« *Sequence Based Typing* », SBT) des 7 gènes.

En 2018, parmi l'ensemble des 610 isolats cliniques et environnementaux analysés, le ST de 268 isolats a été obtenu ou confirmé par WGS. L'ensemble des Lp1 analysées appartenait à 121 *Sequence Type* (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans le tableau 3. Cette distribution est relativement stable au cours des années.

**Tableau 3.** Nombre de souches appartenant aux STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2011 et 2018.

ST	Années								TOTAL	%
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018		
23	55	50	55	55	68	41	67	102	522	18%
1	17	25	29	27	41	23	36	99	265	9%
47	29	27	26	17	20	15	24	37	227	8%
62	17	12	18	15	15	14	13	15	134	5%
146	5	11	17	5	17	12	8	17	109	4%
259	2	16	8	18	10	7	18	16	98	3%
20	8	8	7	12	9	9	10	21	88	3%
40	3	6	8	11	11	7	15	10	86	3%
82	16	9	7	8	7	1	9	16	75	3%
42	4	8	10	5	12	11	5	7	63	2%
701	4	6	7	11	6	11	8	22	63	2%
9	3	11	3	5	7	8	11	18	58	2%
48	8	3	3	5	7	5	9	8	49	2%
444	5	6	4	12	3	5	3	5	47	2%
94	0	7	9	8	2	2	6	3	47	2%
96	4	5	4	0	4	4	8	4	39	1%
224	2	3	3	3	4	8	8	12	38	1%
107	0	2	5	1	5	3	2	5	35	1%
44	3	4	4	3	6	2	3	7	32	1%
75	4	4	3	5	5	1	4	3	32	1%
37	2	1	2	10	4	7	2	1	31	1%
65	2	3	3	6	5	2	3	3	30	1%
435	2	2	4	4	1	3	2	2	28	1%
Autre	56	71	73	70	84	98	104	177	702	24%
<b>TOTAL</b>	<b>251</b>	<b>300</b>	<b>312</b>	<b>316</b>	<b>353</b>	<b>299</b>	<b>378</b>	<b>610</b>	<b>2898</b>	<b>100%</b>

**Plus de la moitié des souches appartiennent à 9 STs;** l'évolution de ces ST au cours des 8 dernières années est représentée en Figure 12.



**Figure 12.** Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2011 à 2018.

- **NGS**

Voir paragraphe « 2.6 Activités de séquençage ».

Dans le contexte d'investigation à la recherche de la source de contamination, l'analyse NGS soit à l'aide du cgMLST, soit à l'aide d'une analyse phylogénétique plus fine, a été très utile pour discriminer des isolats ST1 et ST23 ce qui est impossible par les autres méthodes disponibles (voir § 4.2).

Dans le contexte de surveillance, 268 isolats ont été analysés en NGS. De ces analyses ont été extraits le *Sequence Type* (ST) et le *core genome Sequence Type* (cgST)

- **Typage en cas de culture négative**

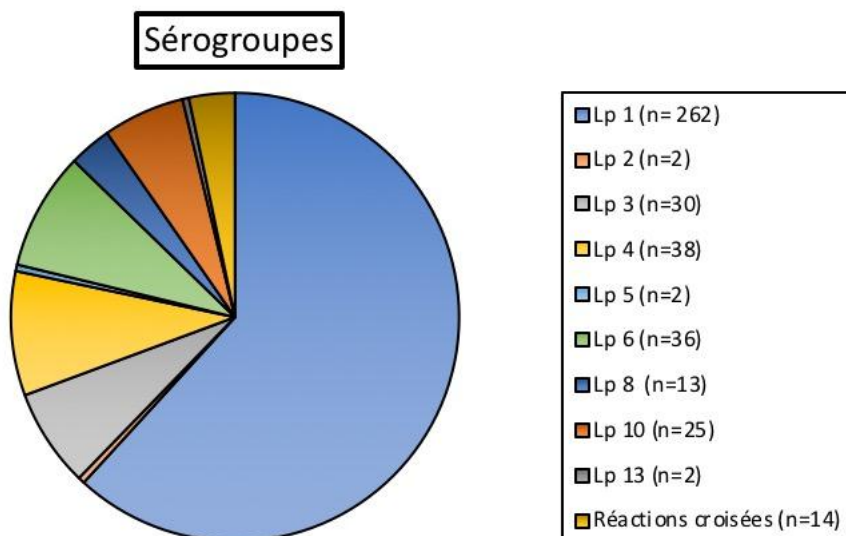
En cas de culture et co-culture négatives, la technique de SBT nichée ou nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. En 2018, 91 prélèvements ont été analysés par cette technique. Cette technique présentant de faibles performances, elle n'est à présent réalisée qu'à la demande des ARS lors d'investigations épidémiologiques et uniquement sur les prélèvements montrant une PCR spécifique Lp1 positive.

Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 7 prélèvements. Pour 36 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié.

### **3.2.3. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR**

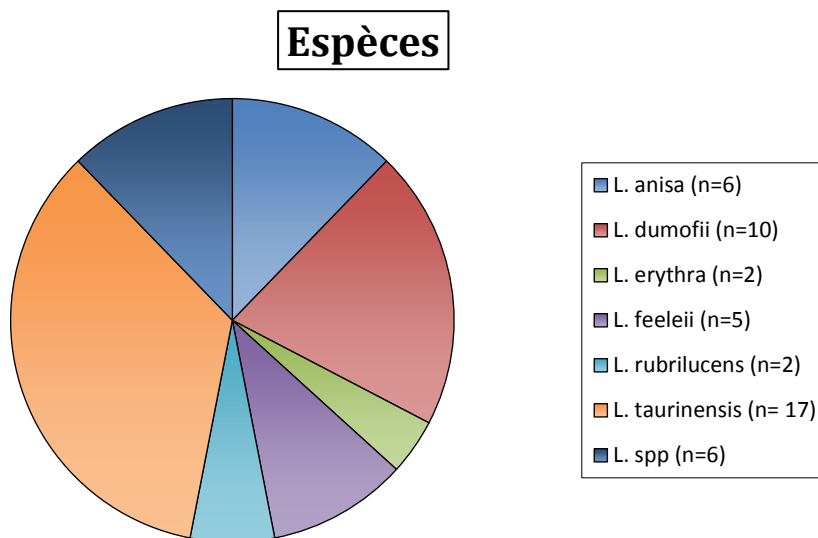
En 2018, 472 souches environnementales ont été envoyées par des laboratoires extérieurs. Les souches environnementales sont adressées au CNR pour identification précise (séro groupe ou espèce) ou typage lors de l'investigation de cas.

Parmi les 472 souches analysées, 424 (89,8%) étaient des *Legionella pneumophila* ; la répartition des sérogroupes est présentée en Figure 13.



**Figure 13.** Distribution en termes de séro groupe des souches de *Legionella pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2018.

L'identification des 48 souches d'origine environnementale (10,1%) de *Legionella* non *pneumophila* a été réalisée soit par séquençage du gène *mip* (technique de référence), soit par technique de MALDI-TOF. La répartition des espèces identifiées est présentée en Figure 14.



**Figure 14.** Distribution en termes d'espèce des souches de *Legionella* non *pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2018.

### **3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux**

#### **3.3.1. Définitions utilisées pour exprimer la résistance**

- **Techniques phénotypiques**

Il n'existe pas de méthode de référence pour évaluer la sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques. Différentes méthodes, utilisant différents milieux, inocula et délais d'incubation ont été décrites, conduisant à des résultats de CMI différents pour une même souche. L'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) a proposé en 2016 une technique de *screening* de la résistance, technique par diffusion sur milieu BCYE utilisant des bandelettes Etest :

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Legionella\\_guidance\\_document\\_20171208.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20171208.pdf).

Néanmoins, l'utilisation d'un milieu avec du charbon (nécessaire pour obtenir une croissance de la souche) tel que le milieu BCYE est sujette à débat car elle résulte en une augmentation des CMI de la plupart des antibiotiques.

Une technique alternative de microdilution, sans charbon, est ainsi utilisée au CNR. Des travaux antérieurs sur (i) 109 souches cliniques de la collection du CNR caractérisées sur la base de données cliniques et génomiques (WGS) et sur (ii) des souches résistantes aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la rifampicine sélectionnées *in vitro* ont permis de définir la distribution des CMI d'une population sauvage ainsi que les valeurs seuils au-delà desquelles une résistance doit être suspectée (Vandewalle *et al.*, Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, IJAA , 2017).

Le CNR dispose également d'une technique intracellulaire sur lignée monocyttaire permettant de déterminer les concentrations extracellulaires inhibant la croissance intracellulaire de *Legionella*.

- **Techniques moléculaires**

Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche, le CNR dispose de PCR ciblées pour détecter une résistance aux antibiotiques indiqués dans la légionellose :

- mutations ribosomiques associées à une résistance aux macrolides (d'après des travaux du CNR, Descours *et al.*, Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*, AAC, 2017);

- mutations sur l'ADN gyrase associées à la résistance aux fluoroquinolones (d'après la collaboration avec le laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes à Grenoble, CNRS UMR5163, Institut Jean Rouget, M. Maurin et D. Schneider) (2012);

- mutations dans le gène *rpoB* codant la sous-unité de l'ARN polymérase N (cluster I) associées à la résistance à la rifampicine (d'après les travaux du CNR, 2015).

Nous possédons également un outil NGS développé au CNR et présentant une meilleure sensibilité que les outils précédents. Après réalisation d'une PCR en temps réel ciblant les gènes mutés en cas de résistance aux trois familles thérapeutiques (*rpID*, *rpIV*, *rri*, *gyrA* et *rpoB*), un séquençage NGS est réalisé sur les produits de PCR. Il présente l'avantage de pouvoir détecter des sous-populations résistantes présentes dans une proportion de 0,5% au sein de la population totale.

#### **3.3.2. Résultats & analyse des tendances**

En 2018, le CNR a répondu à 5 demandes d'antibiogrammes par microdilution pour des souches cliniques isolées de 5 patients différents. Pour trois d'entre eux, un antibiogramme a

été réalisé systématiquement dans le cadre de l'inclusion des patients dans le protocole de recherche PROGLEGIO (chapitre 6.1.2). Pour l'un d'eux, un antibiogramme a été réalisé sur une souche de Lp1 isolée à J4 après le début des signes cliniques ; il s'agissait d'une légionellose sévère d'emblée ayant entraîné un SDRA et le décès du patient. Pour le dernier patient, un antibiogramme a été réalisé sur une souche de *L. micdadei* isolée d'un abcès pulmonaire non résolutif sous bi-antibiothérapie.

Les PCR suivantes ciblant les mutations associées à la résistance ont également été réalisées au laboratoire sur des extraits d'ADN de prélèvements :

- PCR *rrl* (n=52 dont 50 pour des patients inclus dans le protocole PROGLEGIO) et *rplD/rpIV* (n=40 dont 38 pour des patients inclus dans le protocole PROGLEGIO) ;
- PCR *gyrA* (n=48 dont 46 pour des patients inclus dans le protocole PROGLEGIO) ;
- PCR *rpoB* (n=40 dont 38 pour des patients inclus dans le protocole PROGLEGIO).

Aucune résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones, à la rifampicine ou aux tétracyclines n'a été détectée phénotypiquement ou par biologie moléculaire, suggérant une implication faible de ces mécanismes dans les échecs thérapeutiques.

Bien que les phénomènes de résistance soient exceptionnellement décrits, le CNR communique sur la possibilité de ces résistances, notamment lors d'infections non/lentement résolutive(s), et incite ses correspondants à l'envoi de prélèvement en cas de suspicion. Du fait d'un faible nombre de demandes et des contraintes techniques, il est préférable de réserver cette activité au CNR.

### **3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux**

#### **3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France**

##### **• Echanges de données – périodicité**

Les échanges avec Santé publique France sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, fax, courriers postaux) et ont pour objectifs :

- de valider les cas de légionellose posant problème ;
- de s'informer des investigations en cours (résultats de typage, prélèvements adéquates à réaliser, etc) ;
- d'élaborer de nouvelles études ou analyses communes.

##### **Données échangées**

Notification hebdomadaire du CNR à SpF des souches d'origine clinique reçues au CNR (par email et télécopie) sous la forme d'un fichier Excel commun. Chaque fin d'année, les données de ce fichier sont validées par SpF (Christine Campese). Le bilan d'activité du CNR concernant la surveillance des cas de légionellose s'appuie sur ces données.

SpF fournit toutes les informations utiles au CNR lors des investigations épidémiologiques. En retour, le CNR fournit par courrier les résultats de typage épidémiologique de la(les) souche(s) clinique(s) isolée(s) et de(s) souche(s) environnementale(s). Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.

En 2018, **855 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF. Ce chiffre est en augmentation par rapport à 2017 (645 courriers) et en adéquation avec le nombre de cas diagnostiqués. Par ailleurs, de nombreux contacts avec les ARS sont réalisés par messagerie électronique (envoi des demandes de comparaison, demande d'information, demande de résultats...). En moyenne, 1 à 5 contacts quotidiens sont réalisés par ce moyen.

Une réunion annuelle SpF/DMI – CNR est organisée pour discuter des analyses communes en cours ou à venir. Elle a eu lieu cette année à Lyon en août 2018.

- **Analyses communes**

Le CNR est rapidement associé à l'investigation de toute suspicion de cas groupés ou comme cela a été le cas en 2018 d'une augmentation soudaine du nombre de cas.

Plus spécifiquement, nous avons particulièrement investigué par des réunions physiques ou téléphoniques les situations suivantes :

*Forte proportion de cas lié à la souche Lp1 ST259 à Aurillac (paragraphe 4.1)*

Les cas de légionellose à Aurillac font l'objet d'une attention particulière car la grande majorité d'entre eux (75%) présente le même profil de souche « Pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia », suggérant une source commune d'exposition. La récurrence de cette souche depuis 2008, notamment retrouvée lors d'épisodes de cas groupés en décembre 2012 (3 cas), janvier 2015 (3 cas) et février 2017 (2 cas) a amené SpF (DMI et Cire), l'ARS DD15 et le CNR à entreprendre des investigations plus approfondies.

*Investigations de cas à L. gratiana sur l'île de la Réunion (paragraphe 4.2)*

Deux cas à *L. gratiana* ont été diagnostiqués à la Réunion (et un troisième suspecté par sérologie) dans un contexte d'augmentation du diagnostic de cas de légionellose. Nous avons investigué la réalité de cette augmentation du nombre de cas (à *L. pneumophila* et *L. non pneumophila*). L'espèce *L. gratiana* n'ayant jamais été décrite dans la littérature comme responsable de cas de légionellose, nous avons alerté l'ARS et SpF car une source de contamination commune était largement suspectée. Le seul lien entre les 2 patients étant l'hôpital (en dehors des périodes classiques de durée d'incubation), nous avons conseillé des investigations à ce niveau. Les investigations n'ont pas permis d'identifier la source.

*Investigation de l'augmentation des cas en mai-juin 2018 (paragraphe 4.2)*

Cette situation a entraîné de nombreux contacts et réunions téléphoniques avec SpF, les ARS et les CIRE. Nous avons participé à la réunion Retour d'expérience (RETEX) sur la recrudescence de cas de légionellose en mai-juin 2018 en région Auvergne-Rhône-Alpes le 9 octobre 2018 à Lyon par une intervention sur le bilan de la surveillance par le CNR.

En novembre 2018, le CNR a participé à une réunion d'échange entre la DGS et Santé publique France concernant notamment les travaux envisagés pour comprendre l'incidence des cas (pic, disparité géographique, influence météorologique) et améliorer les connaissances sur les légionelles dans ce contexte.

### **3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC)**

- **Expertise & envoi de données**

\* Le CNR collabore avec le réseau européen de surveillance des légionelloses **ELDSNet** (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Le CNR participe tous les ans aux réunions et aux activités de ce réseau. Dans ce cadre, il est nommé comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau européen. Nous avons accueilli la réunion ELDSNet à Lyon en août 2018. Le CNR (C. Ginevra) a été invité à présenter aux épidémiologistes les moyens d'obtention de résultats de WGS et l'interprétation des données.

\* Les **données de typage par SBT** de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation sont systématiquement envoyées afin de renseigner la base de données sur la base de données EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Au total, les données de 3495 souches françaises ont été renseignées sur le site sur un total de 12859 souches.



\* **Membre du Groupe de travail international** de ESGLI pour le développement du « Whole genome sequencing » comme outil de typage des souches – C. Ginevra et S. Jarraud. Envoi de 180 génomes (fastq et fasta) aux membres du groupe de travail pour la mise en place d'une méthode standardisée européenne de cgMLST.

- **Collaborations**

\* Développement d'une PCR spécifique des *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1 applicable directement sur prélèvements. Collaboration au niveau Européen avec Israël et l'Angleterre. Publication en cours de rédaction : Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J.

\* Coordination par le CNR d'une étude multicentrique européenne du groupe ESGLI sur la détection des antigènes urinaires, soutenue par l'ESCMID.

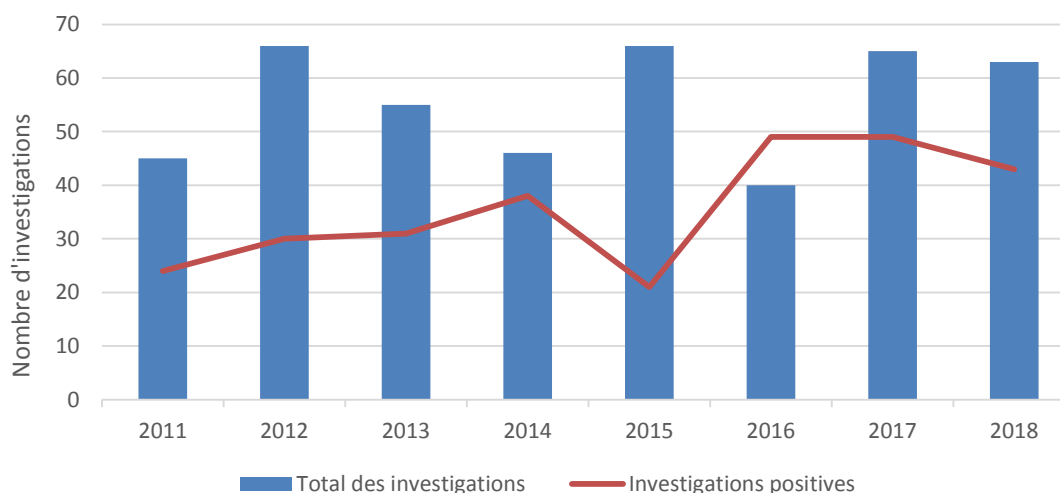
Les tests urinaires permettant de détecter le lipopolysaccharide (LPS) des *Legionella* sont largement utilisés et permettent de diagnostiquer environ 80% des cas en Europe. Ces tests détectent principalement Lp1 mais leur sensibilité semble dépendre de la souche Lp1 et leurs performances pour la détection d'autres sérogroupes sont mal connues. Les performances en termes de spécificité sont également dépendantes des tests.

Afin de formuler des recommandations européennes pratiques sur l'utilisation des tests disponibles sur le marché, le groupe d'étude ESCMID pour les infections à *Legionella* (ESGLI) propose aux fabricants commercialisant des tests urinaires *Legionella* de participer à une large étude européenne et multicentrique. Cette étude intitulée « Évaluation de 16 tests de détection qualitative de l'antigène de *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'urine de patients atteints de pneumonie » est l'une des 3 études de « Study Group Research Grant » soutenue par l'ESCMID en 2018. Le CNR est l'investigateur principal. L'étude impliquera 9 centres nationaux de référence (France, Pr Sophie Jarraud ; Danemark, Dr Soren Uldum ; Allemagne, Dr Christian Luck ; Suisse, Dr Valeria Gaia ; Royaume-Uni, Dr Vicki Chalker ; Pays-Bas, Dr Sjoerd Euser ; Italie, Dr Maria Luisa Ricci ; Belgique, Dr Fedora Echahidi ; Slovénie, Dr Darja Kese), permettant une bonne représentativité de la diversité des souches de *Legionella* européennes. Cette étude a été initiée en 2018 par l'écriture du projet et envoi à l'appel à projet pour un soutien par l'ESCMID et démarrera en 2019.

### **3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

- **Contribution à l'investigation des sources de contamination pour les cas sporadiques**

Parmi les 2133 cas de légionellose diagnostiqués en 2018 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2018), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **62 cas de légionellose**, soit **2,9 %** de l'ensemble des cas et **13%** des cas avec souche disponible. Parmi les 62 cas investigués, les profils génomiques des souches clinique et environnementale(s) se sont révélés **identiques pour 43 cas (68%)**.



**Figure 15.** Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.

Pour les 63 cas de 2018, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que **les réseaux d'eau sanitaire** étaient la source la plus probable de contamination dans 12 établissements de santé, 11 domiciles, 5 établissements de tourisme, 4 maisons de retraite et 11 autres établissements (Tableau 4).

Les investigations menées dans les hôpitaux, les EHPAD / maisons de retraite ou au domicile des patients montrent des forts taux de conclusion positive quant à la source de contamination.

**Tableau 4.** Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2018.

	Investigations positives		Investigations négatives		Investigations totales	
	N	%	N		N	%
Hôpitaux	12	92%	1		13	21%
EHPAD/ MR	4	100%	0		4	6%
Domicile	11	85%	2		13	21%
Tourisme	5	55%	4		9	14%
Autre	11	78%	3		14	22%
TAR	0	0%	10		10	16%
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>68%</b>	<b>20</b>		<b>63</b>	<b>100%</b>

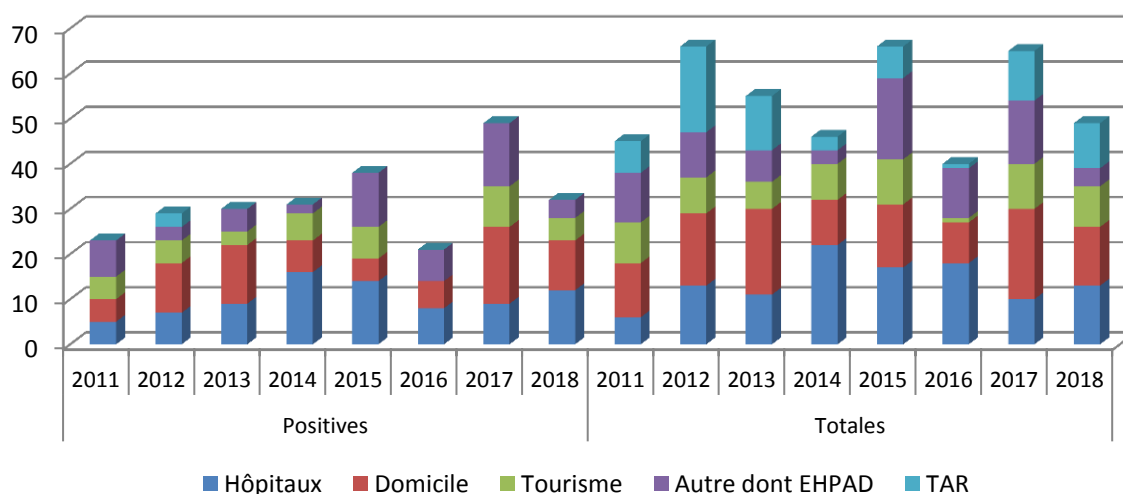
MR : maison de retraite

Alors que 75% (n=47) des investigations identifiaient des STs identiques entre isolats cliniques et environnementaux, il est à noter que 49% (23/47) de ces investigations positives impliquaient des STs endémiques : 11 cas ST1, 9 cas ST23, 1 cas ST47 et 2 cas ST40.

La technique de WGS a permis de conclure quant à la source de contamination pour 14 cas. Elle a été utilisée pour 10 des 11 cas ST1, le profil PFGE du 11<sup>ème</sup> cas étant sporadique et suffisant pour conclure. Parmi ces 10 cas, 9 présentaient des données de WGS en faveur d'une contamination avec la souche environnementale analysée. La technique de WGS a également été utilisée pour tous les cas ST23 (n=9). Pour 5 d'entre eux, elle a permis de conclure à l'appartenance des souches clinique et environnementale(s) à un même cluster. Les souches de ST47 et 40 n'ont pas été analysées par WGS ; les souches de ST47 étant rarement identifiées dans l'environnement, leur isolement est un argument fort en faveur de la source de contamination (Tableau 5).

**Tableau 5.** Résultats des investigations réalisées en 2018 ayant permis d'identifier la source de contamination par le ST et/ou le PFGE et/ou le WGS.

	Profil des souches identique						Profil des souches différent	TOTAL
	ST1	ST23	ST47	ST40	autre	total		
<b>Domicile</b>	2	2	0	0	7	11	2	<b>13</b>
<b>Tourisme</b>	1	1	0	0	3	5	4	<b>9</b>
<b>Centre hospitalier</b>	7	1	0	0	4	12	1	<b>13</b>
<b>EHPAD ou MR</b>	0	1	1	0	2	4	0	<b>4</b>
<b>Autres</b>	1	0	0	2	8	11	3	<b>14</b>
<b>TAR</b>	0	0	0	0	0	0	10	<b>10</b>
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>43</b>	<b>20</b>	<b>63</b>



**Figure 16.** Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2018 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête (positives = enquête ayant permis d'identifier la source de contamination du patient).

## 4. Alerte

### 4.1. Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal et événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte en 2018

L'alerte de Santé Publique France est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Christine Campese. La DGS est alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr).

En 2018, nous avons alerté Santé publique France pour 2 épisodes plus spécifiques. La DGS n'a pas été alertée suite aux premières investigations menées.

- **Cas de légionellose au retour de la Mecque (août – septembre 2018)**

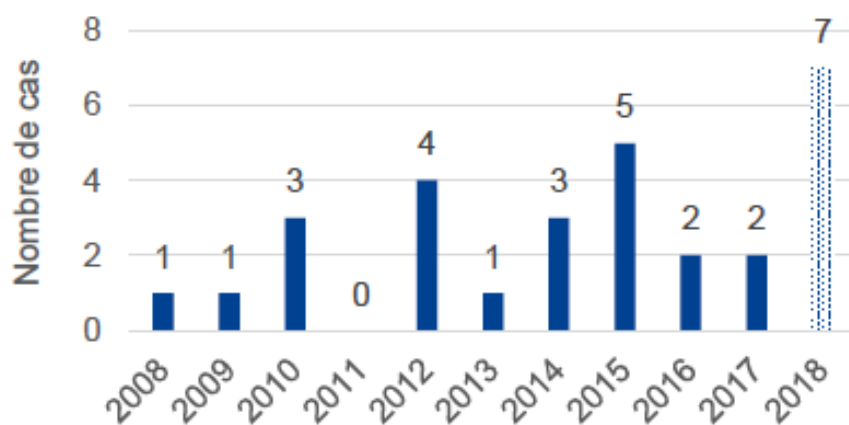
En août – septembre 2018, le CNR a alerté Santé publique France après identification de 3 souches ST211 isolées chez deux patients de la région lyonnaise et un patient hospitalisé à Strasbourg, tous au retour d'un pèlerinage à la Mecque. La base de données ESGLI faisait à ce

moment-là état de 10 souches cliniques ST211 notifiées au niveau européen, dont 6 associées à un voyage et parmi celles-ci 2 notifiés en Arabie Saoudite. Ces données ont été transmises par SpF au réseau de surveillance ELDSNet qui n'a pas rapporté de cas contemporain aux cas français à Lp1 ST211 dans d'autres pays en Europe. Les données d'ELDSNet rapportent depuis 2015 11 cas associés à la Mecque (1 en 2015, 2 en 2016, 5 en 2017 et 3 en 2018 correspondant à nos cas). Pour l'un des cas, la notion d'une souche à ST211 était rapportée. Par ailleurs, notons qu'une souche clinique ST211 avait déjà été isolée chez un patient strasbourgeois au retour de la Mecque en 2011.

Au total, depuis 2011, au moins 12 cas ont été rapportés au retour d'un pèlerinage à la Mecque, 5 sont associés à un ST211 ; pour les autres cas le ST n'est pas connu. Ces données nous imposent une vigilance particulière pour ce ST211 et les cas associés à la Mecque.

- **Persistance de cas liés à des souches ST 259 à Aurillac**

Les cas de légionellose à Aurillac (n=22 sur la période 2008-2017) font l'objet d'une attention particulière car la grande majorité d'entre eux présente le même profil de souche : pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia, suggérant une source commune d'exposition.



**Figure 17.** Nombre annuel de cas de légionellose à Aurillac depuis 2008.

Le premier semestre 2018 a été marqué par la survenue de 7 cas dont 5 entre le 5 et le 21 juin (Figure 17). Une souche clinique a été isolée pour 3 patients, parmi lesquels 2 souches ST259 et une souche ST23. L'analyse des données du WGS des souches isolées depuis 2015 montre que ces souches appartiennent au même cluster, signant une forte homologie entre les souches. Néanmoins, nous ne disposons pas de suffisamment de génomes de souches ST259 séquencées pour pouvoir conclure sur le lien de clonalité. En particulier, 2 souches cliniques ST259 isolées sur la même période chez 2 patients clermontois appartiennent au même cluster, sans lien épidémiologique entre les patients aurillacois et les patients clermontois.

Pour les 3 autres cas diagnostiqués sur la période mai-juin 2018, aucune souche n'a pu être isolée et aucun typage moléculaire n'a pu être réalisé.

A noter qu'une nouvelle souche a été isolée chez un patient en décembre 2018 ; elle appartient au même complexe clonal que les souches ST259 (6 gènes sur les 7 séquencés identiques).

Concernant les investigations autour de ces cas groupés :

Parmi ces 7 cas, un seul réside à Aurillac ; les 6 autres cas sont domiciliés dans d'autres communes du Cantal mais tous rapportent un ou plusieurs déplacements à Aurillac, dans une zone restreinte définie au cours des précédentes investigations, située au sud de la ville et comprenant des centres commerciaux, des entreprises et des quartiers résidentiels. Plusieurs sources potentielles de contamination ont été recensées (3 tours aéro-réfrigérantes, 1 station d'épuration des eaux usées, 1 industrie avec des laveurs d'air).

En juin 2018, en raison du caractère temporel groupé des cas et en lien avec la préfecture du Cantal, l'ARS a relancé les investigations sur le secteur précédemment défini. Les actions suivantes ont été réalisées :

- prélèvements dans les bassins de la station d'épuration des eaux usées de la ville le 15 juin, avec mise en culture et PCR ; aucune légionelle n'a pu être isolée par culture (contamination fréquente par de la flore interférente); un seul prélèvement était positif pour *L. pneumophila* en quantité inférieure à la limite de quantification, mais négatif pour *L. pneumophila* séro groupe 1 ce qui n'a pas permis de réaliser de typage directement sur le prélèvement ;
- prélèvements inopinés sur 3 Tars d'Aurillac le 29 juin : légionelles non détectées par culture (présence d'une flore interférente) ;
- demande des auto-contrôles réalisés en avril 2018 sur les laveurs d'air : légionelles non détectées par culture ;
- investigation d'une installation frigorifique d'une grande surface avec condensateur en toiture en juillet 2018 : légionelles non détectées par culture.

Pour 2019, l'ARS ARA a planifié le recensement des installations de climatisation dans le secteur tertiaire en s'appuyant sur les frigoristes et le Service départemental d'incendie et de secours (SDIS) qui effectue tous les ans des visites de conformité (risque incendie) dans les ERP.

Le caractère groupé des cas survenus en mai-juin 2018 à Aurillac est superposable à l'épidémiologie particulière observée dans certaines régions de France sur la même période (cf paragraphe 4.2). Néanmoins, la récurrence d'une même souche clinique est en faveur de la persistance probable d'une source commune de contamination, non identifiée à ce jour.

En raison d'une contamination fréquente des prélèvements environnementaux, il a été convenu avec l'ARS ARA que ces prélèvements nous soient adressés pour analyse complémentaire avec co-culture ambiante et PCR spécifique du séro groupe 1 en particulier.

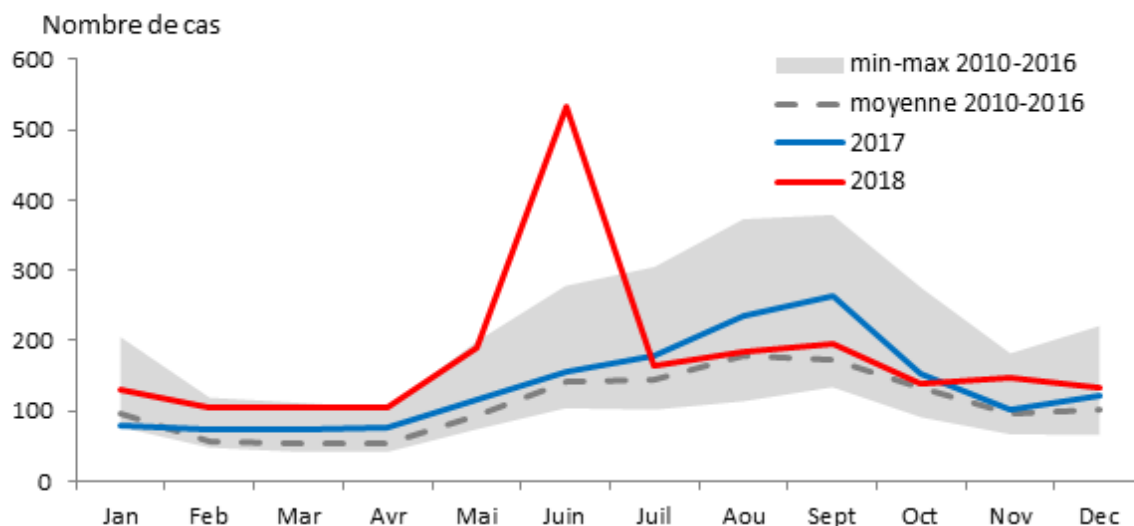
#### **4.2. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux**

Un nombre important de potentiels cas groupés a été investigué en 2018. Ne sont présentés ici que les phénomènes anormaux ou des situations particulières.

##### **4.2.1. Forte recrudescence de cas de légionellose en mai – juin 2018 sans identification de caractère groupé des cas**

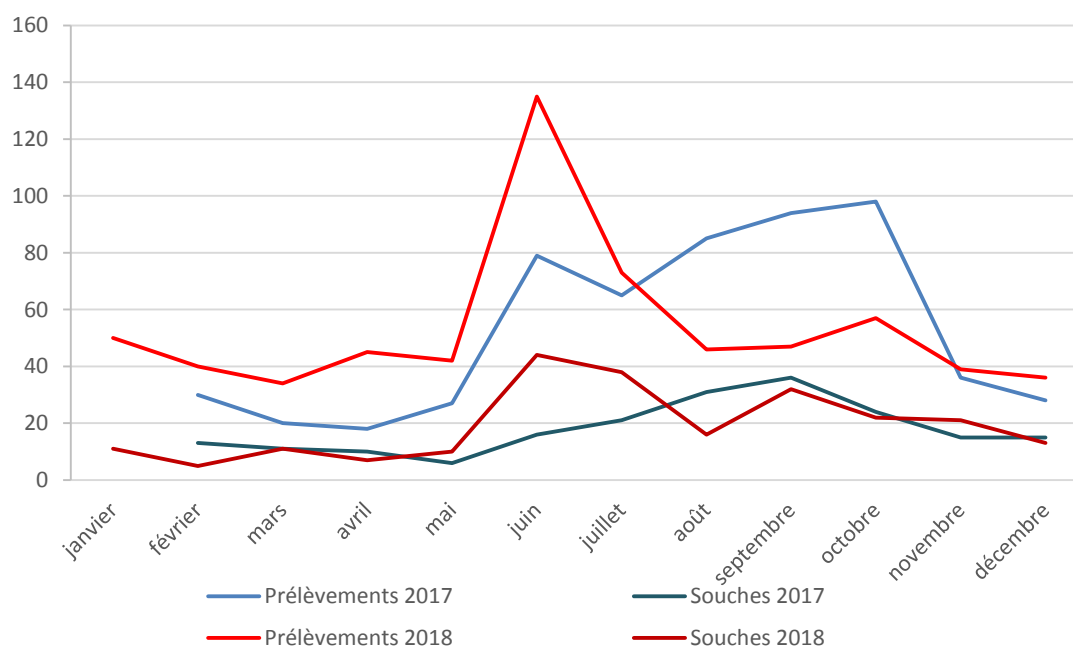
La période mai-juin 2018 a été marquée par une recrudescence de cas de légionellose sur l'ensemble du territoire national (Figure 18). Certaines régions ont été néanmoins particulièrement concernées. Ainsi, en juin, 106 cas de légionellose ont été identifiés chez des personnes vivant en région **Auvergne-Rhône-Alpes** (versus 24 en 2017), et 119 cas ont été identifiés chez des personnes vivant en **Ile-de-France** (versus 17 cas en juin 2017). Une hypothèse est que les conditions météorologiques particulières de mai-juin (fortes précipitations et températures chaudes) aient joué un rôle en favorisant la survie des légionelles dispersées dans l'atmosphère par différentes sources. L'investigation de cette hypothèse est en cours par Santé Publique France.

Cette recrudescence de cas n'a concerné que cette période mai-juin 2018, le nombre de cas sur les autres mois était similaire à 2017 ou à la période 2010-2016, voire inférieur (Figure 18).



**Figure 18.** Evolution du nombre de cas de légionellose sur une année, 2010-2018 (données SpF)

Cette augmentation du nombre de cas a entraîné une augmentation de l'activité au CNR (Figure 19).



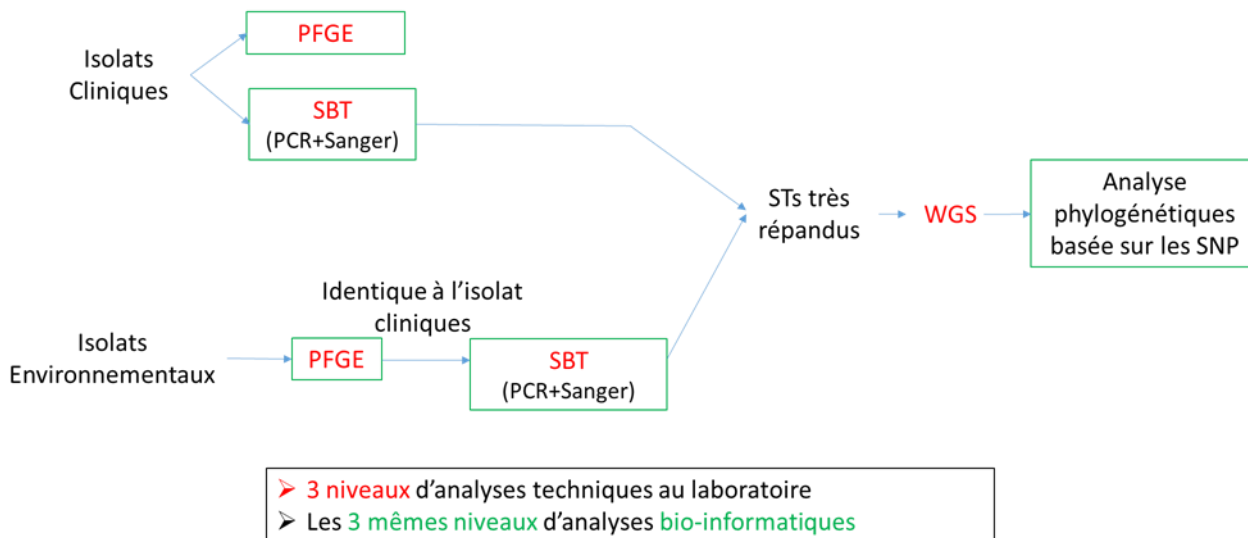
**Figure 19.** Evolution du nombre de prélèvements pour mise en culture et de souches cliniques reçues sur l'année 2018 par rapport à l'année 2017.

Cette augmentation a conduit à investiguer de potentiels cas groupés dans ces mêmes régions sur cette période. Le nombre important de souches à analyser et à comparer durant cette période nous a conduit à modifier notre flux de travail en réalisant des analyses par WGS en première intention (Figure 20).

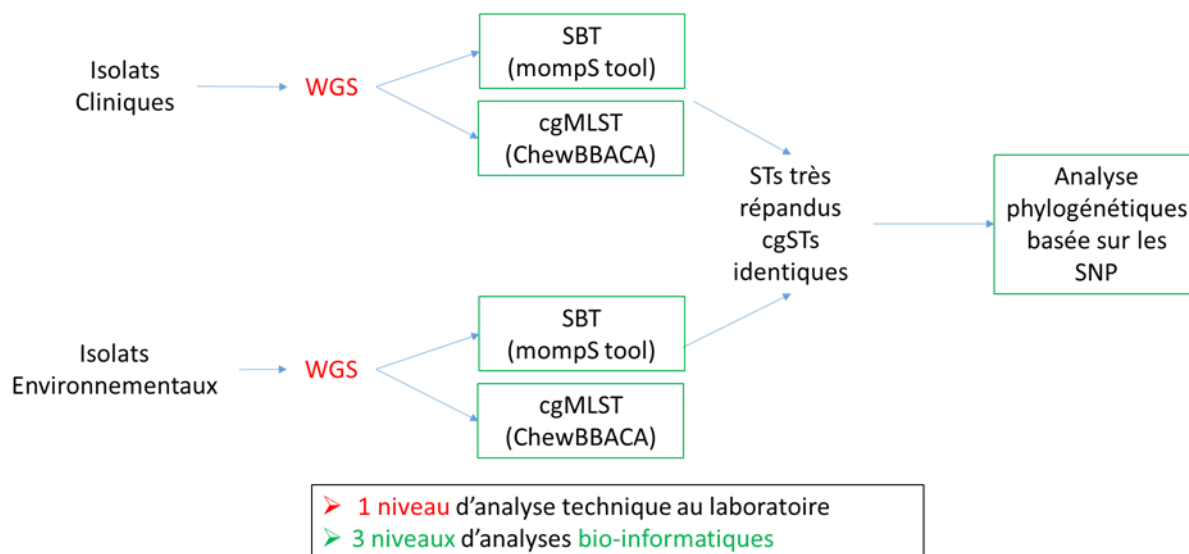
Cette modification du flux de travail a été possible grâce à un financement exceptionnel de SpF.

Ce flux de travail modifié a été particulièrement utile pour l'investigation de cas potentiellement groupés en Haute Savoie et en île de France (cf. ci-dessous), il nous a également permis de mettre en évidence fortuitement 2 cas reliés à Amiens.

### A/ Flux de travail actuel



### B/ Flux de travail testé pendant la période de surincidence

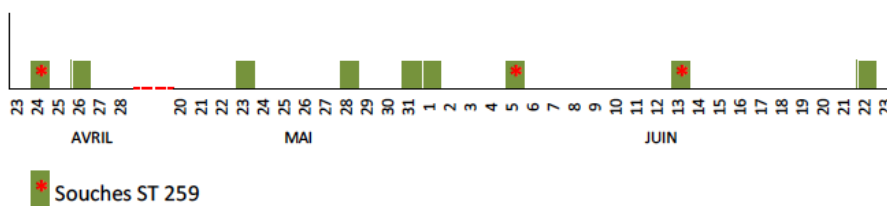


**Figure 20.** Modification du flux de travail pour le typage des souches de *L. pneumophila* pendant la période de surincidence de cas de légionellose des mois de mai-juin 2018.

- **Episode de cas groupés de légionellose dans l'agglomération de Clermont-Ferrand**

Le département du Puy-de-Dôme (63) a fait partie des départements les plus concernés par la recrudescence des cas de légionellose observée dans la région Auvergne-Rhône-Alpes en mai-juin 2018. Au 5 juillet 2018, le nombre de cas signalés depuis le début de l'année (n=27) était déjà supérieur au nombre de cas pour l'année 2017 (n=24, dont 9 sur la période fin avril-juin) (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après E. Vaissière, Cire ARA).





Courbe épidémique réalisée à partir des dates de début des signes des cas « clermontois » déclarés sur la période avril-juin 2018

Parmi ces 27 cas domiciliés dans le Puy-de-Dôme :

- 14 ont été notifiés par le CHU de Clermont-Ferrand ;
- 13 résidaient dans l'agglomération (Clermont-Ferrand, Chamalières, Gerzat, Cournon-d'Auvergne) ;
- 2 s'étaient rendus au moins une fois dans la commune de Clermont-Ferrand.

Trois autres patients, non domiciliés dans la région ARA, avaient effectué un séjour dans l'agglomération de Clermont-Ferrand.

L'isolement d'une souche clinique a été obtenu pour 3 cas domiciliés à Clermont-Ferrand. Les 3 souches présentaient un ST259. Le WGS de ces souches a montré que 2 de ces souches appartenaient au même cluster, compatible avec une origine de contamination commune. L'enquête de l'ARS n'a pas retrouvé de lieu fréquenté en commun entre ces patients. Une autre souche, ST 23, a été isolée chez un patient domicilié à Chamalières.

Les lieux de déplacement des cas ont été recensés de manière systématique par l'ARS pour tout cas de légionellose à l'aide d'un questionnaire standardisé. Leur analyse n'a révélé aucune zone, plus restreinte que l'agglomération elle-même, commune à l'ensemble des cas depuis début 2018. En revanche, elle a mis en évidence plusieurs regroupements de quelques cas, que ce soit au travers des lieux fréquentés ou des lieux de domicile, et en particulier la commune de Chamalières.

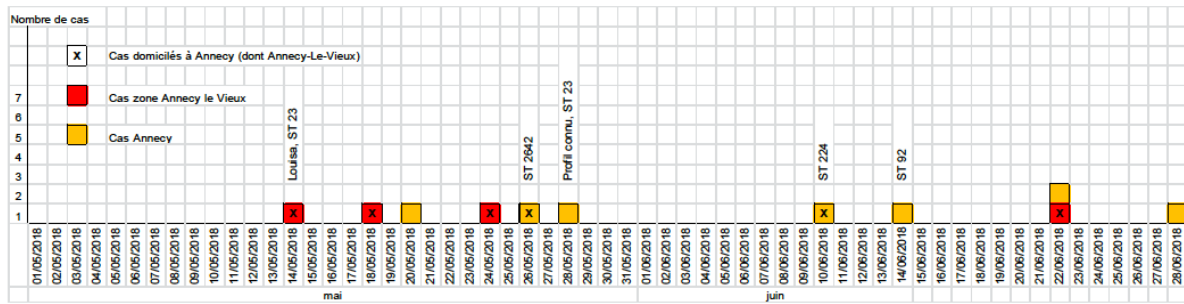
Initialement centrées sur le secteur de Chamalières, les investigations menées par l'ARS se sont progressivement élargies à l'agglomération clermontoise, au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux cas. La DREAL (Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) a fourni à l'ARS les résultats d'autocontrôle des Tars présentes sur ce secteur mais ces Tars de Clermont-Ferrand n'ont pas fait l'objet de prélèvements inopinés. Ils ont révélé des dépassements du seuil de détection (1000 UFC/L) sur 3 sites en mai 2018 ; les souches de Lp1 isolées au niveau d'une Tar ont été adressées au CNR pour comparaison avec les souches cliniques mais elles ont montré un profil différent (ST1). De nombreuses actions ont été menées par l'ARS parallèlement dans les communes de Chamalières et Clermont-Ferrand : prélèvements aux domiciles de 3 cas domiciliés à Chamalières, recensement ± suivi/contrôle des fontaines publiques et dispositifs susceptibles de générer des microgouttelettes d'eau, information des supermarchés de l'agglomération (n=10) concernant leurs systèmes de brumisation, inspection de la piscine de Chamalières ayant révélé plusieurs manquements (méconnaissance de la réglementation de 2010, eau froide sortant chaude, absence de relevés de température etc). Cependant, aucune de ces investigations n'a mis en évidence la présence de légionelles.

Au total, malgré le nombre important de cas groupés sur la commune de Clermont-Ferrand en mai-juin 2018, peu de prélèvements broncho-pulmonaires ont été réalisés ; une sensibilisation auprès des praticiens hospitaliers doit être poursuivie. Enfin, une attention particulière sera portée à tout nouveau cas de légionellose de type ST259 à Clermont-Ferrand.

- **Episode de cas groupés de légionellose sur la commune d'Annecy**

Entre le 14 mai et le 30 juin 2018, 11 cas domiciliés (n=6) ou s'étant déplacés à Annecy ou Annecy-Le-Vieux (n=5) ont été notifiés (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après J.M. Yvon, Cire ARA).





L'ensemble des cas a été interrogé pour identifier les expositions à risque à leur domicile et lors de leurs déplacements. Plusieurs cas ont également été réinterrogés par téléphone pour affiner leurs déplacements dans le secteur. En dehors des 4 cas résidant à Annecy-Le-Vieux, aucune autre zone commune restreinte fréquentée par l'ensemble des 11 cas ou par quelques-uns d'entre eux n'a été identifiée. Des investigations poussées ont été réalisées par l'ARS sur la zone restreinte d'Annecy-Le-Vieux où sont domiciliés les 3 premiers cas signalés ; aucune source de contamination compatible avec les cas n'a été identifiée.

Concernant les investigations microbiologiques, un prélèvement broncho-pulmonaire a été obtenu pour 9 cas, et 5 souches cliniques ont été isolées. Les 5 cinq souches présentaient toutes des ST et/ou des profils PFGE différents (ST23 (n=2), ST2642, ST92, ST224). Une analyse complémentaire par WGS et cgMLST des souches ST23 isolées en 2018 de 5 patients résidant dans le bassin de vie d'Annecy (dont 2 dans cet épisode) a été réalisée. Les 5 souches présentaient le même cgMLST. Une analyse phylogénétique basée sur les SNP a donc été conduite, elle a confirmé le caractère non relié des souches cliniques pour 3 d'entre elles. Pour les 2 autres génomes, aucun SNP n'a été observé ; les 2 cas résidaient à l'extérieur d'Annecy à environ 10 km l'un de l'autre (dont 1 était inclus dans l'épisode). La ré-analyse des questionnaires de ces 2 cas n'a pas permis d'identifier un lieu commun d'exposition.

Pour l'un des cas domicilié à Annecy le Vieux, une comparaison de la souche clinique (ST23) avec des souches ST23 issues de l'eau de la douche de son domicile par WGS, cgMLST et analyse phylogénétique basée sur les SNP a révélé des profils identiques, permettant d'identifier la source de contamination.

Au total, cette situation s'inscrit dans un contexte de forte recrudescence de cas de légionellose en mai-juin 2018 en région Auvergne-Rhône-Alpes. Il apparaît globalement que l'ensemble de ces cas n'ont pas de source de contamination commune.

• **Autres épisodes de cas groupés de légionellose sur la période mai-juin 2018**

Si la région Ile-de-France a montré une recrudescence particulière du nombre de cas, tous les départements franciliens n'étaient pas uniformément concernés (cf tableau ci-dessous, d'après C. Bassi, Cire IDF). En particulier, une recrudescence forte dans le département du **Val-de-Marne** (94) a été observée.

Département de résidence	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet
75	6	3	6	4	2	14	5
77	2	3	4	3	5	11	2
78	0	2	5	2	4	12	1
91	1	2	5	1	2	12	3
92	4	0	4	2	1	12	5
93	3	3	2	2	6	13	2
94	2	2	3	5	3	<b>32</b>	0
95	1	2	3	1	3	13	3

Parmi les 32 cas observés, 30 ont résidé ou se sont déplacés dans le secteur Nord-Ouest du département (communes de Vitry-sur-Seine, Alfortville, Maisons-Alfort ou commune limitrophe) dans les jours précédant leurs signes cliniques (cf courbe épidémique ci-dessous, d'après C. Bassi, Cire IDF).



- la comparaison des 2 souches isolées parmi les 5 cas observés dans les communes limitrophes de **Givors (69700) et Grigny (69720) en mai – juin 2018** a montré des souches de ST différents (ST23 et ST59).

- **Episode de cas groupés à Amiens**

L'analyse systématique par WGS des souches sur cette période a permis de mettre en évidence fortuitement un lien épidémiologique entre 2 patients ayant fréquenté le même hôpital mais pas le même service, pour lesquels un isolat clinique ST1 était disponible.

#### 4.2.2. Surincidence de cas groupés sur l'île de La Réunion

En février – mars 2018, le CNR a été alerté par une surincidence de cas de légionellose au sud de l'île de la Réunion. Les cas avaient été diagnostiqués par la positivité de l'antigène urinaire ou de la PCR.

Afin de procéder à l'investigation des cas, en concertation avec l'ARS et les équipes hospitalières (hygiénistes, biologistes médicaux) du GH Sud Réunion, le CNR a analysé les prélèvements suivants :

- 2 prélèvements respiratoires (crachats et écouvillonnage naso-pharyngé) réalisés chez 2 patients montrant une PCR *Legionella* spp positive; nous avons identifié une *L. gratiana* par PCR 23S-5S pour ces deux prélèvements, mais les souches n'ont pu être isolées ;
- 1 souche clinique de *L. pneumophila* isolée du prélèvement d'un 3<sup>ème</sup> cas, présentant un ST jamais identifié dans la base de données française et européenne (ST 2692) ;
- 2 prélèvements de sérum réalisés à 3 semaines d'intervalle chez un 4<sup>ème</sup> cas, montrant un titre positif pour *L. bozemanii*, *L. dumoffi* et *L. gratiana* ;
- 15 souches environnementales isolées à différents points du réseau d'ECS du CHU de Saint-Pierre, dont 5 *L. pneumophila* sérogroupe 6 et 10 étaient des *L. pneumophila* sérogroupe 1, ST1, différentes des souches cliniques.

L'espèce *L. gratiana* étant rarement isolée dans un contexte d'infection, il est très probable que les deux premiers cas aient été exposés à une source commune. Néanmoins, malgré les investigations menées par l'ARS, cette source n'a pu être identifiée.

#### 4.2.3. Investigation de cas groupés sur Dunkerque (59)

Le CNR a été sollicité pour l'investigation de 13 cas de légionellose survenus sur la période de juillet – octobre 2018 dans la région de Dunkerque (59). Un prélèvement broncho-pulmonaire a été adressé au CNR pour 10 cas mais aucune souche clinique n'a pu être isolée, rendant toute comparaison impossible.

#### 4.2.4. Investigation de cas familiaux

- **Cas groupés dans une fratrie ayant rendu visite à ses parents**

Au début du mois de juillet 2018, deux cas de légionellose ont été diagnostiqués à quelques jours d'intervalle chez un frère de 46 ans et sa sœur de 49 ans domiciliés respectivement en Savoie et dans la région de Tourcoing. L'interrogatoire des deux cas rapporte que fin juin, ils avaient rendu visite à leurs parents domiciliés en Dordogne. La comparaison de 2 souches de *L. pneumophila* sérogroupe 1 isolées d'un prélèvement d'ECS réalisé début juillet au niveau d'une douche située au sous-sol du domicile des parents des cas avec les 2 souches cliniques a montré un profil identique ST120, rarement isolée en France, en faveur d'une contamination du frère et de la sœur au domicile parental.

- **Cas groupés chez un couple de patients immunodéprimés**

En novembre puis décembre 2018, deux cas de légionellose ont été diagnostiqués par antigénurie positive à presque 2 mois d'intervalle chez un patient de 70 ans souffrant d'un cancer et sa compagne atteinte d'un cancer du pancréas, à l'issue d'une chimiothérapie. Une

souche clinique a pu être isolée uniquement chez le premier cas, qui présente un ST16. Dans les suites du second cas, une enquête au domicile de sa compagne a été réalisée. Elle a révélé la présence de *L. pneumophila* sérotype 1 en quantité importante (25.000 UFC/L) sur un prélèvement d'ECS réalisé au niveau du robinet du lavabo de la cuisine, point d'eau avec lequel sa compagne s'était lavé les cheveux quelques jours avant le début de ses signes cliniques fin décembre 2018. La comparaison de la souche clinique isolée chez le cas n°1 avec les souches environnementales a montré un profil identique, ST16. En raison de la fréquence rare de ce ST en France (<1%), il est très probable que le cas n°1 se soit contaminé au domicile de sa compagne. En l'absence de souche clinique isolée pour le cas n°2, nous ne pouvons conclure formellement sur l'origine de contamination mais il est également très probable qu'elle se soit contaminée à partir du même point d'eau.

#### **4.2.5. Investigation des cas potentiellement associés aux dispositifs d'apnée du sommeil, de nébulisation**

- **Contamination probable à partir d'un diffuseur d'arôme / nébulisateur**

En octobre 2018, un cas de légionellose a été diagnostiqué chez une patiente ayant utilisé, dans les 15 jours précédant la date de début des signes, un diffuseur d'arôme portatif. La patiente avait été hospitalisée 10 jours auparavant l'apparition des signes de pneumonie en service de SSR pour d'autres raisons. Devant cette suspicion de cas nosocomial, des investigations sur le réseau d'ECS de l'hôpital ont été réalisées, qui n'ont pas retrouvé de Lp dans le réseau.

Des prélèvements ont été parallèlement réalisés au niveau du réservoir du diffuseur d'arôme rempli par la patiente à son domicile en amont de son hospitalisation, qui révèlent la présence de *L. pneumophila* sérotype 1.

La comparaison de la souche clinique et de la souche environnementale a montré un profil ST1 pour les deux souches. L'analyse complémentaire par WGS a montré que les 2 souches appartenaient au même cluster, argument en faveur d'une contamination de la patiente avec l'eau du réservoir de nébulisateur. La période d'incubation classiquement décrite dans la légionellose est de 2 à 10 jours mais des durées d'incubation supérieures à 14 jours sont rapportées dans la littérature. Il est ici probable que la patiente se soit contaminée avec de l'eau initialement recueillie à son domicile et ayant stagné dans le nébulisateur.

## **5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil**

### **5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé**

- **Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé**

\* Module de formation « Epidémiologie moléculaire appliquée à la surveillance et au contrôle des maladies infectieuses » de l'InVS – Application des méthodes d'épidémiologie moléculaires et leurs limites dans la surveillance et les investigations d'épidémies de légionellose (1h30), 6 mars 2018, Santé publique France (S. Jarraud et C. Campese)

\* Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) : méthodes de détection des *Legionella* (1h30), novembre 2018, Rennes (S. Jarraud)

- **Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques**

G. Fleres : 26 février – 9 mars 2018, étudiant en thèse de l'Université médicale du Centre de Groningen, sous la supervision du Pr. Friedrich, The Netherlands. Interprétation de données de séquençage de souches de *L. anisa*.

- Publication issue de ce travail : Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, Ginevra C, Jarraud S, Deurenberg RH, Rossen JW, García-Cobos S, Friedrich AW. Microorganisms. 2018 Jul 18;6(3). Detection of *Legionella anisa* in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing.

- **Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR**

Rétro-information aux ARS – laboratoires – cliniciens : courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation (855 courriers en 2018).

Site web : le CNR dispose d'un site web (<http://cnr.univ-lyon1.fr>) et d'un site spécifique dédié à l'ADN étalon en français et en anglais dans l'objectif d'une distribution européenne de cet étalon.

Sur le site web EWGLI : mise en ligne de nos données de SBT dans la base de données européennes de SBT.

- **Information/formation des professionnels de santé**

Le CNR a organisé le congrès européen ESGLI 2018 à Lyon du 28 au 30 août 2018 (<http://esgli2018.univ-lyon1.fr>). Il a réuni 210 personnes venant de 25 pays (France, USA, Canada, Japon, Chine, Australie, Nouvelle-Zélande, Israël, Algérie, Maroc, Tunisie, Malte, Espagne, Portugal, Italie, Suisse, Allemagne, Autriche, Hollande, Danemark, Irlande, Finlande, Suède, Belgique, Emirats Arabes Unis).

- **Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles),**

Conseils téléphoniques ou par courriers électroniques (en moyenne de 1 à 10 conseils par jour) essentiellement pour les microbiologistes et cliniciens (conseil diagnostique, résultats des évaluations de kits, thérapeutique, typage), ARS (interprétation des résultats, information sur les méthodes de typage, conseil), médecins du travail sur les informations à donner aux personnels en cas de légionellose ou de dépassement de seuils environnementaux, et EHOP sur les méthodes de décontamination des sites.

Les appels téléphoniques sont redistribués au biologiste responsable du CNR (au moment de l'appel / responsabilité prise de façon hebdomadaire par l'ensemble des biologistes) par les secrétaires (standard téléphonique pour l'ensemble de l'IAI).

Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation (855 courriers en 2018).

## 5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- **Activités d'expertise auprès du ministère chargé de la santé, de Santé publique France, des autres agences de sécurité sanitaire, du Haut conseil de la santé publique (HCSP), de la Haute Autorité de Santé (HAS) ou de structures européennes (ECDC, ...) ou internationales (OMS, ...)**

**ECDC** – Nomination comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau Européen (Sophie Jarraud) (depuis 2010).

## 5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

Programme INSERM « Les chercheurs accueillent les malades », Maladies allergiques et inflammatoires pulmonaires, le 19 Juin 2018. Accueil d'une vingtaine de patients aux CNR, visite du CNR et discussion autour du rôle et des analyses réalisées au CNR ainsi que des activités de recherche appliquée pouvant être bénéfique pour les patients à cours, moyen et long terme.

## 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

### 6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

#### 6.1.1. Projet présenté de façon préliminaire dans le rapport de 2017 – finalisé en 2018 (résumé non présenté si étude précédemment décrite)

\* **Quantification of *Legionella* DNA Certified Reference Material (CRM) by digital droplet PCR (ddPCR).** Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. J Microbiol Methods. 2019 Feb;157:50-53.

**Objectif.** La surveillance des concentrations de *Legionella* dans les eaux peut être effectuée en quantifiant l'ADN de *Legionella* par PCR. Pour assurer l'étalonnage de ces méthodes, un Matériel de Référence Certifié (CRM), ADN étalon de *Legionella*, est disponible depuis 2009. La valeur de ce CRM a été attribuée par analyse statistique des résultats des tests de dilution limite par PCR effectués lors d'une campagne de certification par 12 laboratoires en 2009. Notre objectif était d'évaluer la possibilité d'utiliser une nouvelle méthode de quantification absolue de l'ADN, la droplet digital<sup>TM</sup> PCR (ddPCR) pour une quantification absolue de ce CRM et une surveillance de sa stabilité.

**Matériels et méthodes.** Afin de quantifier le CRM *Legionella* par ddPCR, la linéarité, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) de la méthode ont été tout d'abord qualifiées. Pour estimer sa valeur par ddPCR, 10 échantillons du CRM choisis au hasard ont été testés. Chaque échantillon a été dilué indépendamment en 8 réplicats et 5 µL de chaque réplicat ont été analysés par ddPCR. Pour chaque échantillon testé, la moyenne, la médiane et la déviation standard des 8 réplicats ont été calculées. Un modèle mixte linéaire a été utilisé pour estimer la variabilité intra et inter-réplicat et pour estimer la valeur moyenne globale.

**Résultats.** Les résultats de linéarité ( $E_{lin} < 0,15$ ), LOD (5 GU/réaction) et LOQ ( $E_{LQ} < 0,15$ ) répondent aux critères d'acceptation de l'ISO / TS 12869. La concentration estimée obtenue par les mesures de ddPCR n'est pas significativement différente ( $p = 0,065$ ) de la valeur certifiée déterminée en 2009 par le test inter-laboratoire utilisant la méthode de dilution limite basée sur la PCR.



**Conclusions.** La méthode ddPCR de quantification de l'ADN de *Legionella* pourrait être utile pour de futurs matériaux de référence, car elle peut être utilisée pour attribuer une valeur à un nouveau lot avec une incertitude réduite et un protocole moins lourd. L'avantage supplémentaire est son indépendance par rapport aux normes préexistantes ainsi que le nombre réduit d'échantillons à tester, ce qui en fait une méthode préférée pour la surveillance de la stabilité.

**\*Mise en place de l'Amoebae Plate Test** comme méthode complémentaire de mise en culture des prélèvements pulmonaires

Descours G, Hannel H, Reynaud JV, Ranc AG, Beraud L, Kolenda C, Campese C, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Adaptation of the Amoebae Plate Test to recover *Legionella* strains from clinical samples. J Clin Microbiol, 2018;56(5).

**\* Détection de *Legionella anisa* dans l'eau des unités de fauteuils dentaires d'hôpitaux et caractérisation moléculaire par séquençage du génome entier.**

Etude hollandaise dans laquelle nous avons participé par notre expertise sur l'analyse du WGS de souches *L. anisa* isolées de l'eau des unités de fauteuils dentaire (DCU) d'un service dentaire d'un hôpital en Hollande. Cette étude a révélé une contamination de l'eau du robinet en contact direct avec les patients et l'utilité de WGS pour confirmer cette source.

Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, Ginevra C, Jarraud S, Deurenberg RH, Rossen JW, García-Cobos S, Friedrich AW. Detection of *Legionella Anisa* in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing. Microorganisms. 2018 Jul 18;6(3).

## **6.1.2. Etudes démarrées ou en cours en 2018**

### **6.1.2.1. Biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères (étude PROGLEGIO)**

Il s'agit d'une grande étude nationale interventionnelle prospective coordonnée par le CNR dans le cadre du Programme de Recherche Translationnelle en Santé co-financé par l'ANR et la DGOS. L'objectif est d'identifier des marqueurs bactériens et d'hôte associés à l'évolution péjorative de la légionellose. Ce projet associe une recherche clinique et une recherche plus fondamentale. L'étude distingue deux groupes de patients, les patients hospitalisés en Unités de Soins Intensifs (USI) et ceux en hospitalisation simple. Une comparaison des paramètres est mesurée à J0 entre les patients dont la légionellose est classée sévère et non sévère. Un suivi longitudinal (clinique et des échantillons) est réalisé pour les patients hospitalisés en USI. Un total de 13 centres investigateurs participe au niveau national.

Parmi les marqueurs de sévérité, nous étudions :

- (1) si l'évolution de la charge pulmonaire en *L. pneumophila* par PCR est associée à l'évolution clinique de l'infection ;
- (2) l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante aux antibiotiques, population notamment détectable par séquençage à haut débit ;
- (3) si un profil cytokinique spécifique au niveau local (pulmonaire) ou au niveau systémique (sérum) est associé à la sévérité ;
- (4) si des gènes bactériens ou des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) sont associés à la sévérité, identifiés par des analyses génomiques comparatives ;
- (5) la diversité du microbiote pulmonaire en utilisant des approches de métagénomique et de NGS afin d'associer un microbiote spécifique ou son évolution à la sévérité de l'infection ;
- (6) les facteurs génétiques humains qui prédisposent à des infections sévères à Lp1 à l'aide d'une approche de séquençage global de l'exome.

A la fin 2018, 54 patients ont été inclus et le laboratoire a recueillis plus de 500 prélèvements dont 230 prélèvements pulmonaires. Les premières données très préliminaires de PCR semi-quantitatives montrent que la cinétique de disparition de l'ADN de *Legionella* dans les poumons

est variable (jusqu'à des persistances à plus de 40 jours après le diagnostic pour les patients sévères) et pourrait être en relation avec les données de PCR dans le sérum à J0. L'analyse des microbiotes de ces patients à J0 et au cours de l'infection est en cours à l'Institut Pasteur.

Deux études plus spécifiques ont été réalisées en 2018 :

### \*Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' disease

Etude réalisée en 2018 pour laquelle un poster a été présenté à l'ECCMID 2019

Testaert H, Allam C, Ginevra C, Fessy N, Bernard C, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Lina G, Ader F, Jarraud S.

**Introduction/objectives.** *Legionella pneumophila* is a causative agent for a severe pneumonia named Legionnaires' disease (LD), fatal in 10 to 30% of cases depending on immune status. Immune response in patients with sepsis or septic shock is complex, including an immunosuppressive phase with an altered leukocyte functionality, particularly, a low production of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . LD, as a severe infection, could be comparable to sepsis in terms of immune status. Our study aimed to assess if patients admitted to Intensive Care Units for LD showed a poor pro-inflammatory cytokine release in response to both *Legionella* specific antigen and nonspecific stimulant. This could indicate an anergic profile associated with the disease severity.

**Materials and Methods.** 23 healthy donors (HD) and 14 severe LD sick patients (at D0 – D2 – D8 and D15 after the positive urinary antigen) heparinized whole blood samples were collected. 500 $\mu$ L blood was incubated with a purified *Legionella* specific antigen (Heat Shock Protein 60 (HSP60)), a nonspecific mitogen used as lymphocyte stimulant (Concanavalin A (ConA)), and or negative control (RPMI medium). IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  were quantified with an ELISA technique in each condition supernatant after the 24 hours incubation at 37°C.

**Results.** After stimulation with ConA and HSP60, IFN- $\gamma$  means for patients were lower than controls (ConA: 95.4 pg/mL (SD 143) and 2167 pg/mL (sd 1577) respectively,  $p < 0.001$ , HSP60: 165 pg/mL (sd 270) and 1825 pg/mL (sd 1408) respectively  $p < 0.001$ ). After stimulation with ConA, TNF $\alpha$  mean for LD was significantly lower than HD (359 pg/mL (SD 292) and 1391 pg/mL (sd 1138) respectively,  $p < 0.001$ ) but no significant difference was observed after HSP60 stimulation (LD mean = 1018 pg/mL (sd 1057) and HD mean 1391 pg/mL (sd 1138)). There were not significant differences between D0, D8 and D15 after the inclusion. Results of the tests are presented in Figure 1.

**Conclusion.** Leukocyte stimulation by a *Legionella* specific antigen or by a nonspecific activator causes a significantly lower IFN $\gamma$  production for patients compared to HD. TNF $\alpha$  synthesis is also reduced after stimulation with the global lymphocyte activator. Our preliminary results show monocyte and lymphocyte functional defects induced by severe *Legionella* infection that may indicate a connection between cellular anergy and clinical prognosis.

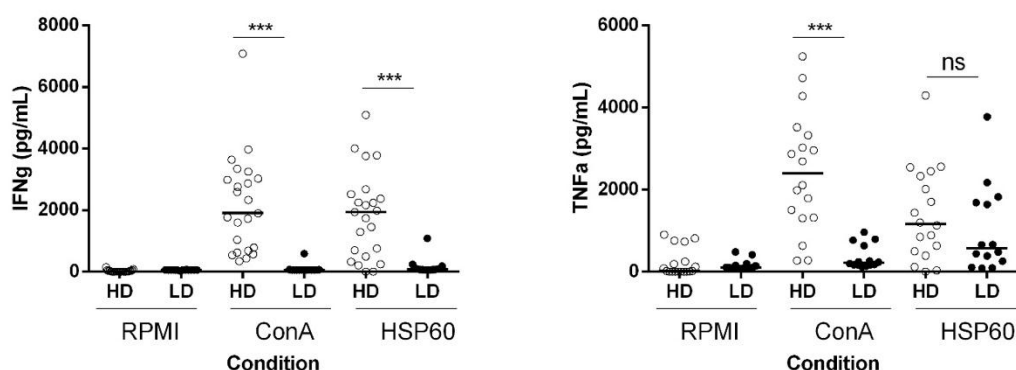


Figure 1. Plasmatic IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in HD (n=23) and LD (n=14) at D0 – D2 – D8 and D15 after the positive urinary antigen after 24 hours incubation in each condition at 37°C.



## \* Etude de l'évolution du microbiote lors des légionelloses

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (C. Buchrieser, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris), et avant l'analyse du microbiote de 50 patients atteints de légionellose, la variation du microbiote pulmonaire au cours de l'infection chez 3 patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques a été analysée. Ce travail fera l'objet d'une publication en 2019 : Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. The pulmonary microbiome is highly disturbed during *Legionella pneumophila* infection and antibiotic treatment.

### 6.1.2.2. Caractérisation des récurrences de légionellose ou des légionelloses persistantes

Depuis quelques années, plusieurs cas de récurrence ou persistance de légionellose (sur plus de 2 mois avec des *Legionella* encore isolées de prélèvements pulmonaires) ont été signalés au CNR. Nous avons réalisé une description précise des caractéristiques cliniques et des facteurs associés aux patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques.

Ce travail a été soumis à CID. **Slowly resolving or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review.** Cécile Pouderoux, Christophe Ginevra, Ghislaine Descours, Anne-Gaëlle Ranc, Laetitia Beraud, Sandrine Boisset, Anne Conrad, Anne Bergeron-Lafaurie, Nicolas Magand, Sophie Jarraud, Florence Ader.

**Background.** Legionnaires' disease (LD) can progress to slowly or non-resolving pneumonia. **Methods.** A nation-wide retrospective study was conducted by the French National Reference Center for Legionella (2013-2017) including cases of slowly or non-resolving LD defined as persistent clinical symptoms, CT-scan progression, and Legionella detection in lower respiratory tract (LRT) specimens by culture and/or real-time (RT) PCR beyond 30 days after the onset of symptoms.

**Results.** Twelve cases of community-acquired slowly or non-resolving LD were identified among 1686 cases of culture-positive LD. Median age was 63 years (interquartile range – IQR [29-82]). Ten (83.3%) patients had  $\geq 1$  immunosuppressive factor. Clinically, presentations were biphasic (n=9, median symptom-free interval of 48 days (IQR [41.5-54]) before further deterioration, or persistent symptoms (n=3). Two patients had  $> 2$  recurrences. CT-scan imagery found lung abscess in 5 (41.6%) cases. Slowly or non-resolving LD were diagnosed on positive LRT Legionella cultures for 10 (83.3%) cases at a median 49.5 days (IQR [33.7-79]) after diagnosis. The 2 remaining cases were documented through positive Legionella PCR after 53 and 52 days (cycle threshold detection of 33.7 and 21.5, respectively). No genomic microevolution and no Legionella resistance to antibiotics were detected. The median duration of treatment of slowly or non-resolving LD was 46.5 days (IQR [21-92.5]). Two empyema cases required thoracic surgery. At a median follow-up of 26 months (IQR [14-41.5]), LD-attributable mortality was 16.6% (n=2).

**Conclusions.** In immunocompromised patients, slowly or non-resolving LD may occur, possibly associated with lung abscess and empyema.

### 6.1.2.3. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1

Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J (soumission d'une publication prévue avant l'été 2019)

**Objective.** *Legionella pneumophila* serogroup1 (*Lp1*) Sequence Type (ST) 1 is globally widespread in the environment and accounts for a significant portion of *Legionella* infections, especially hospital-acquired Legionnaires' disease (LD). This study aimed to design a rapid and

specific detection method for this particular ST which is expected to be advantageous and underpin epidemiological investigations and risk assessments.

**Methods.** A collection of 131 *Lp* genomes, including 49 ST1 genomes was analyzed using whole genome sequencing (WGS) and comparative genomics. Of >900 accessory genes interrogated, 12 candidate targets for specific ST1 detection were identified. Further refinement by *in silico* testing of another 579 international genomes (113 ST1s) resulted in seven unique gene markers for which specific primers and hydrolysis probes were designed. The specificity of the seven primers pairs was evaluated using qPCR on 78 ST1, 19 ST1-related STs and 92 non-related ST. The sensitivity of the assay was evaluated on serial diluted DNA extracted from the reference strain CIP107629. The specificity of the assay was evaluated on 189 LD culture-proven clinical samples.

**Results.** Six PCR assays yielded sensitivities of 2-20 GU/reaction and further evaluated for specificity. The Specificity of the 7 PCR assays was variable and only 2 of them correctly discriminated ST1 and related STs from unrelated ST. Only one PCR target showed sufficient sensitivity and specificity. A positive PCR was obtained for 18/19 clinical samples culture positive for ST1 or related STs. No false positive result was obtained for the other clinical samples.

**Conclusion.** Based on WGS, we have developed and analytically validated, a sensitive and specific PCR assay that allows the specific detection of isolates belonging to the ST1 clonal complex. ST1-specific qPCR is expected to deliver an added value for *Lp* control and prevention, in conjunction with other recently developed assays (e.g. ST47 PCR).

#### **6.1.2.4. Rôle de la pompe à efflux LpeAB dans la virulence du clone ST1 & mécanismes de régulation**

Nos travaux sur le clone ST1 ont montré que des mutants hautement résistants aux macrolides pouvaient être sélectionnés *in vitro*, cette résistance étant due à des mutations ribosomiques. L'analyse génomique de ces mutants a révélé la présence de mutations en amont d'une pompe à efflux, LpeAB, et nous avons montré que LpeAB était impliquée dans l'efflux des macrolides et qu'elle était présente spécifiquement chez le clone ST1. Ces données suggèrent que LpeAB pourrait constituer un facteur de virulence pour le clone ST1, permettant une tolérance aux antibiotiques présents à concentration sub-inhibitrice.

Chez d'autres genres bactériens, la sélection de clones résistants aux antibiotiques nécessite la fonctionnalité d'une pompe à efflux. Nous avons déterminé le rôle de LpeAB dans la tolérance de *L. pneumophila* aux macrolides, et donc dans sa capacité à évoluer vers un niveau de résistance supérieur. Les données préliminaires ne semblent pas montrer de rôle particulier de LpeAB chez *Legionella* pour l'acquisition de mutants de haut niveau de résistance. L'étude de l'efflux de différents biocides a été réalisée, mais aucun substrat de ce type n'a été mis en évidence. Les mécanismes moléculaires mis en jeu concernant la régulation de LpeAB sont en cours d'étude. Travail réalisé avec l'aide de 2 étudiantes, Floriane Nhoung et Audrey Gauthier.

### **6.2. Liste des publications et communications de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR**

#### **6.2.1. Publications nationales**

Pas de publication nationale en 2018.

#### **6.2.2. Publications internationales**

1. Descours G, Hanneltel H, Reynaud JV, Ranc AG, Beraud L, Kolenda C, Campese C, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Adaptation of the Amoebae Plate Test to recover *Legionella* strains from clinical samples. J Clin Microbiol, 2018;56(5).
2. Brunel R, Descours G, Durieux I, Doublet P, Jarraud S, Charpentier X. KKL-35 exhibits potent antibiotic activity against *Legionella* species independently of trans-translation inhibition. Antimicrob Agents Chemother, 2018;62(2).

3. Fleres G, Couto N, Lokate M, van der Sluis LWM, Ginevra C, Jarraud S, Deurenberg RH, Rossen JW, García-Cobos S, Friedrich AW. Detection of Legionella Anisa in Water from Hospital Dental Chair Units and Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing. Microorganisms. 2018 Jul 18;6(3).

### **6.2.3. Communications nationales**

#### **• Communications orales**

1. Couturier J\*, Ginevra C, Nesa D, Adam M, Descours G, Campese C, Tankovic J, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Description des deux premiers cas de légionellose nosocomiale transmis par l'eau des toilettes. 29<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H), 6-8 Juin 2018, Montpellier.
2. Ana Elena Pérez Cobas\*, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Dynamics of the lung microbiome during Legionella-associated pneumonia and antibiotic therapy. Modeling the Mammalian Microbiota Host Superorganism, Current Tools and Challenges, Paris, October 15-16, 2018.

#### **• Communications affichées**

1. Augey F, Descours G, Ranc AG, Ginevra C, Jarraud S, Beraud L. Legiolert™, quantification de *Legionella pneumophila* dans l'eau potable. 38<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 17-18 Décembre 2018, Paris
2. Wyndels K, Descours G, Capron A, Heyman C, Haeghebaert S, Leduc G, Parsy R, Pruvost J, Trouvain H, Hochar AC, Houdre N, Tone A, Ettahar N, Pasquet A, Jarraud S, Campese C. Epidémie de fièvre de Pontiac : le rôle clé des prélèvements bronchopulmonaires ! 38<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 17-18 Décembre 2018, Paris
3. Maud Baume, Astrid Cariou, Adelaïde Leveau, Noémie Fessy, Frederic Pastori, Sophie Jarraud, Sophie Pierre. Quantification du matériau de référence certifié ADN de *Legionella* par digital droplet TM PCR (ddPCR). 38<sup>ème</sup> RICA, 17 – 18 Décembre 2018 Paris

### **6.2.4. Communications internationales**

#### **• Communications orales**

1. Ginevra C\*, Beraud L, Ranc AG, Girardo P, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* genotyping of French isolates: moving from SBT to cgMLST. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
2. Wyndels K\*, Capron A, Heyman C, Haeghebaert S, Leduc G, Parsy R, Pruvost J, Trouvain H, Hochar AC, Houdre N, Tone A, Ettahar N, Pasquet A, Descours G, Jarraud S, Christine Campese. An outbreak of Pontiac fever among workers in a potato-processing factory of the north of France. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
3. Pérez Cobas AE\*, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. Evolution of the lung microbiome of *Legionella*-infected patients during long-term antibiotic treatment. Short talk. Challenges and new concepts in antibiotics research, 19<sup>th</sup>-21<sup>st</sup> march 2018, Institut Pasteur Paris.

- **Communications affichées**

1. Augey F, Descours G, Ranc AG, Ginevra C, Jarraud S, Beraud L. Evaluation of Legiolert™, a most probable number method for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
2. Pouderoux C, Descours G, Ranc AG, Beraud L, Ginevra C, Bruillard P, Bergeron-Lafaurie A, Jarraud S, Ader F. Persistent Legionnaires' Disease: series of 12 cases and review of the literature. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
3. Ginevra C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Jarraud S. *Legionella* direct detection and identification using 16S MinION sequencing. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
4. Ginevra C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Jarraud S. *Legionella pneumophila* subspecies *raphaeli* prevalence in France: the far side of the moon. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
5. Campese C, Beraud L, Descours G, Ranc AG, Girardo P, Ginevra C, Jarraud S. Legionnaires' disease surveillance in France, 2008-2018: should we improve the surveillance of domestic water systems ? 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
6. Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. Quantification of *Legionella* DNA Certified Reference Material (CRM) by digital droplet PCR (ddPCR). 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
7. Cyril Rousseau, Christophe Ginevra, Leslie Banzet, Noël Fiard, Anne Gaëlle Ranc, Karine Vilhès, Hervé Gornès, Sophie Jarraud, Damien Mouly, Christine Campese. An unusual long-lasting community outbreak of legionnaires' disease linked to an aquatic therapy center in Montpellier, France, 2017. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.
8. Souami KY, Taghight-Mah S, Uldum S, Petersen RF, Jarraud S, Tizarouine O, Haddadi DT, Boudjemline N, Guettouche SM, Ammari H, Yala D, Ghaffor M. *Legionella pneumophila* at Mitidja area (Algiers and neighbourhood), Algeria. 5<sup>th</sup> ESGLI Conference, August 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> 2018, Lyon, France.

#### **6.2.5. Conférences sur invitations**

- **Nationale**

1. Jarraud S. Intervention – table ronde. Conférence GIRPI sur « Les réseaux d'eau chaude et d'eau froide sanitaire. De la conception, réalisation à l'exploitation ».

- **Internationale**

1. Jarraud S. « Molecular detection and typing of *Legionella* infections » in session News advances in the molecular detection of atypical agents of respiratory tracts infections, 28<sup>th</sup> ECCMID, 21<sup>st</sup> – 24<sup>th</sup> April 2018, Madrid, Spain.
2. Jarraud S. « Environmental detection of *Legionella* and molecular identification of contamination sources ». 2<sup>nd</sup> International Congress of Environmental Science and Technology - ICEST2018, Hammamet, Tunisie, 3-5 Mai 2018.
3. Ginevra C. « *Legionella pneumophila* typing: from Sequenced-based typing to whole genome sequencing ». ELDSNet meeting Lyon, France, 27-28 Août 2018.

## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Les collaborations dans le domaine de l'environnement se font dans le cadre de l'envoi de souches environnementales pour aide à l'identification précise ou dans le cadre de l'investigation de cas. Ces échanges sont réguliers par téléphone ou messagerie électronique.

\* Le CNR est accrédité pour la détection des légionelles dans l'eau. Des échanges sur ce point sont également réguliers.

\* Le CNR a une expertise dans la détection de légionelles dans des environnements non soumis à l'accréditation, en particulier dans les environnements complexes. Nous pouvons avoir des échanges avec les laboratoires environnementaux sur les techniques employées.

\* Interface avec les instances sanitaires :

Comme indiqué précédemment, le CNR est régulièrement impliqué dans des groupes de travail : ANSES – AFNOR...

\* Distribution de l'ADN étalon pour la quantification des légionelles dans l'eau par PCR à des laboratoires environnementaux français et étrangers ; Partenariat avec LGC Standards, distributeur de matériaux de référence en microbiologie, afin qu'ils distribuent l'ADN étalon et le CQE auprès des potentiels clients à l'étranger. Ces matériaux sont disponibles sur le site : <http://www.lgcstandards.com>.

\* Accueil de stagiaires de laboratoires environnementaux : G. Fleres (26 Février – 9 Mars 2018), Centre médical de Groningen, the Netherlands. Intérêt du WGS pour identifier une source de contamination commune des unités dentaires dans un hôpital en Hollande.

## 8. Programme d'activité pour les années suivantes

Les perspectives et grandes lignes du programme d'activité du CNR pour les deux années à venir sont les suivantes :

### \* **SUR LE PLAN DE L'EXPERTISE**

- **Coordination d'une large évaluation multicentrique européenne de l'ensemble des tests urinaires disponibles sur le marché au niveau Européen**

Le projet est financé par l'ESCMID, le protocole a été validé et les industriels contactés. L'analyse des urines devrait démarrer en Septembre 2019 (Projet du groupe de travail ESGLI).

- **Mise en place d'une PCR « ESGLI » ciblant toutes les *Legionella***

Coordination avec l'Angleterre (Vicki Chalker) d'une étude collaborative au niveau européen pour la mise en place d'une PCR ciblant toutes les *Legionella* incluant une évaluation multicentrique européenne. La mise à disposition de cette PCR est indispensable car peu de réactifs commercialisés sont disponibles actuellement (projet du groupe de travail ESGLI, sur au minimum 2 ans).

- **Poursuite de l'accréditation des analyses au CNR**

Pour 2019, le CNR demande l'accréditation pour l'ensemble des techniques utilisées pour réaliser la recherche d'antigénurie *Legionella* ainsi que pour les techniques de sérologie. La demande d'accréditation pour la recherche de *Legionella* par culture sera réalisée en 2020. Le CNR est actuellement accrédité pour la recherche de *Legionella* par culture et PCR dans les

eaux propres (norme 17025) depuis 2012 et la recherche de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires (norme 15189 – lignée de portée BA8) depuis 2016.

- **Favoriser l'utilisation de la PCR comme outil de diagnostic de première intention en parallèle de la recherche des antigènes urinaires notamment pour les patients immunodéprimés**

Ce programme pourra se faire *via* différentes actions comme :

\* Participer à la discussion de la place de la PCR dans la définition des cas de légionellose au niveau national et européen.

\* Evaluer des kits de type *Point of Care* de diagnostic syndromique d'infections respiratoires basses. Ces dispositifs concernaient principalement jusqu'à récemment les infections respiratoires hautes. Des kits apparaissent pour le diagnostic d'infections respiratoires basses avec le paramètre *Legionella*. La spécificité sera facilement évaluée du fait de la faible incidence de la légionellose. Une réflexion sur l'évaluation de la sensibilité de ces dispositifs qui peut être facilitée par le recrutement du CNR sera importante.

- **Standardisation des techniques de réalisation d'antibiogramme**

Nous souhaitons standardiser la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide par le développement de plaques de réactifs prêt à l'emploi industriels (contact avec un industriel en cours). Par ailleurs une collaboration avec l'Angleterre sur la comparaison des résultats obtenus entre antibiogrammes réalisés en milieu liquide et solide sera réalisée dans le but de proposer une méthode standardisée. Cette proposition d'étude est soutenue par le groupe ESGLI.

#### \* SUR LE PLAN DE LA SURVEILLANCE

- **Utilisation du WGS dans un objectif d'investigation des cas de légionellose et d'épidémiologie globale**

L'utilisation du WGS sera encore amplifiée (429 isolats ont été analysés en 2018) avec pour objectif de caractériser l'ensemble des isolats cliniques et des isolats environnementaux et ainsi abandonner les anciennes méthodes de typage.

- **Comprendre l'augmentation de l'incidence de la légionellose**

\* **Investigation des domiciles** : En 2018, 85% des enquêtes réalisées au domicile des patients ont permis de confirmer cette source de contamination. L'investigation du rôle exact des domiciles comme source de contamination qui jusqu'alors n'ont pas fait l'objet d'investigation systématique devient une priorité et devrait constituer l'objectif d'une étude commune avec Santé publique France dans ces deux prochaines années.

\* De nombreuses études montrent un lien entre l'augmentation de l'incidence de la légionellose et des **conditions météorologiques** particulières (humidité, pluie, chaleur). Nous souhaitons collaborer avec Santé publique France pour identifier des marqueurs météorologiques prédictifs de l'augmentation des cas de légionellose qui pourrait être utilisés par certains spécialistes médicaux pour favoriser le diagnostic de légionellose. Nous souhaitons par ailleurs développer des travaux sur *Legionella* et eau de pluie.

- **Sur le plan de la compréhension de l'infection**

\* **Etude des facteurs pouvant être impliqués dans la sévérité des légionelloses (étude PROGLEGIO)**. Poursuite du projet majeur du CNR financé par la DGOS et l'ANR. Plusieurs axes seront développés ces prochaines années parmi lesquels : étudier le microbiome (bactériome, mycobiome et virome) associés à la sévérité de l'infection ; étudier la réponse de l'hôte associée à la sévérité ; valider des marqueurs simples comme la PCR sur sérum comme marqueur associé à la sévérité.

\* **Utilisation du NGS pour la compréhension de l'infection.** Le développement de différents outils bio-informatiques nous permet d'envisager l'analyse des nombreux génomes séquencés par le CNR en regard des informations clinico-biologiques à notre disposition et ainsi améliorer la compréhension de l'infection. Nous nous intéresserons notamment à l'apparition d'abcès au cours des légionelloses et aux légionelloses extra-pulmonaires. Dans certains contextes, nous envisageons également l'analyse du microbiote respiratoire associé aux légionelloses par méthode ciblée (16S) ou méthode shotgun (utilisation du séquenceur MinION Oxford Nanopore dont le CNR s'est doté ou de la technologie Illumina de la plateforme des HCL).

\* **Compréhension des infections persistantes.** Les données récentes colligées par le CNR montrent que des récurrences d'infection, jusque-là peu décrites, existent et qu'elles ne sont pas liées à l'apparition de bactéries résistantes *in vivo* ni à une micro-évolution génomique de *Legionella* au cours de l'infection. Ces récurrences impliquant une souche bactérienne identique à l'infection initiale suggèrent donc la persistance de bactéries tolérantes au traitement antibiotique ou « *persisters* » (Pouderoux *et al.*, CID, en révision). Le rôle des *persisters* dans les infections chroniques ou les récurrences d'infection a été décrit pour plusieurs genres bactériens parmi lesquels *Salmonella* ou *Staphylococcus*. Ces bactéries constituent une sous-population tolérante aux antibiotiques de façon transitoire pouvant effectuer un « switch » phénotypique pour reprendre leur croissance après un stress. A ce jour, aucune étude n'a été publiée quant à la capacité potentielle de *Legionella pneumophila* à générer des « *persisters* » et elles n'ont jamais été décrites durant une légionellose. Notre objectif est donc d'étudier l'impact de « *persisters* » pour les patients atteints de légionellose évoluant défavorablement sous antibiothérapie.

## Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

### Missions du CNR des Légionelles

#### **1. Apporter une expertise microbiologique**

- contribuer au développement de milieux de culture spécifiques et à leur évaluation,
- contribuer au développement et à l'évaluation des nouvelles techniques diagnostiques (moléculaires, spectrométriques),
- produire, valider et diffuser des réactifs spécifiques,
- contribuer au diagnostic des légionelloses, notamment celles dues aux *Legionella non pneumophila*,
- réaliser le typage moléculaire de toutes les souches cliniques adressées au CNR et la comparaison de leurs profils génomiques,
- développer et maintenir une banque de données des profils génomiques (PFGE/SBT),
- réaliser le typage moléculaire des souches environnementales, lors de l'investigation des cas groupés ou pour comparaison avec les profils génomiques des souches cliniques des cas isolés ayant des expositions spécifiques,
- contribuer à l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux et aux biocides,
- contribuer à des programmes de formation continue et d'évaluation externe de la qualité afin de renforcer la capacité des laboratoires de biologie médicale dans le domaine du diagnostic et de l'identification des légionelles,
- contribuer à des études de recherche appliquée, notamment sur l'écologie, les facteurs de développement et de virulence de la bactérie,
- collaborer avec les laboratoires experts dans la surveillance de la légionellose dans l'environnement,
- participer au conseil auprès des professionnels de santé et de l'environnement.

#### **2. Conseil**

- contribuer aux expertises nationales et européennes.

#### **3. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique**

- en contribuant à la déclaration obligatoire de la légionellose par le signalement à l'agence nationale de santé publique des cas identifiés ou rapportés au CNR,
- en contribuant à la détection et l'investigation de cas groupés,
- en participant au système de surveillance européen (ELDSNet).

#### **4. Contribuer à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel**

- augmentation inhabituelle de cas,
- apparition de cas groupés,
- modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles),
- modification des profils de résistance,
- apparition de souches inhabituelles,
- etc,....



### **Personnels affectés au CNR et Organigramme**

Les missions du CNR des *Legionella* sont assurées par une co-direction assurée par Sophie Jarraud et Gérard Lina. Toutes les personnes mentionnées dans l'organigramme ont un rôle majeur en participant selon leur spécificité à l'accomplissement des missions du CNR.

L'IAI emploie environ 180 personnes réparties dans les différents secteurs et plateaux. Les personnels affectés au CNR des légionelles comprennent des personnels affectés spécifiquement au CNR (techniciens, ingénieurs) et des personnels qui assurent une partie de leur temps au CNR (biologistes, secrétaires, cadres médico-techniques). Pour chacun de ces personnels, la quotité de temps consacrée à l'activité du CNR est précisée dans le document spécifique (état des emplois rémunérés). L'ensemble des personnels est présenté en Figure 22.

**Secteur CNR Légio**  
UF 24844  
Gérard LINA  
Sophie JARRAUD  
Cadre de santé : Hélène RUTSCHI

Biologistes :  
- Laëtitia BERAUD  
- Ghislaine DESCOURS  
- Pascale GIRARDO  
- Sophie JARRAUD  
- Anne-Gaëlle RANC

Techniciens :  
- Joëlle CHASTANG  
- Lucie CHAVEROT  
- Karine DROITCOURT\*  
- Noémie FESSY  
- Corinne FAUCHON  
- Isabelle ROYET  
- Marielle SIFFERT

Ingénieur :  
Christophe GINEVRA

*Noémie FESSY est recrutée sur un poste spécifique pour l'étude PROGLEGIO financé par la DGOS.*

*\* remplacement de Karine DROITCOURT successivement par Charlotte VERRIER, Emeline WAREZ, Hanene HADDOUR DOUDOU.*

### **Figure 22.** Organigramme fonctionnel du CNR.

Les biologistes partagent l'ensemble des 4 missions du CNR (expertise, conseil, surveillance épidémiologique, alerte). Concernant les techniciens, ils partagent les activités des différents secteurs du CNR notamment les postes d'identification de souches, de diagnostic, de biologie moléculaire, de typage, de détection environnementale...

**Tableau 6.** Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles.

Noms et qualifications	Coordonnées
<b>Sophie Jarraud (directeur)</b> PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 38 <a href="mailto:sophie.jarraud@chu-lyon.fr">sophie.jarraud@chu-lyon.fr</a>
<b>Gérard Lina (directeur adjoint)</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 94 <a href="mailto:gerard.lina@chu-lyon.fr">gerard.lina@chu-lyon.fr</a>
<b>Jérôme Etienne (physiopathologie et épidémiologie)</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 26 73 28 76 <a href="mailto:jerome.etienne@chu-lyon.fr">jerome.etienne@chu-lyon.fr</a>
<b>Florence Ader (infectiologie)</b> PH - Service des maladies infectieuses PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 15 60 <a href="mailto:florence.ader@univ-lyon1.fr">florence.ader@univ-lyon1.fr</a>
<b>Laetitia Beraud (environnement, évaluation de réactifs)</b> PH - IAI	Tél : 04 72 07 18 44 <a href="mailto:laetitia.beraud@chu-lyon.fr">laetitia.beraud@chu-lyon.fr</a>
<b>Pascale Girardo (gestion informatique)</b> Praticien attaché - IAI	Tel : 04 72 07 16 87 <a href="mailto:pascale.girardo@chu-lyon.fr">pascale.girardo@chu-lyon.fr</a>
<b>Anne-Gaëlle Ranc (épidémiologie)</b> Assistante hospitalière - IAI Assistante universitaire - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 45 <a href="mailto:anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr">anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr</a>
<b>Ghislaine Descours (résistance)</b> PH - IAI MCU - Faculté de Pharmacie Lyon	Tél : 04 72 07 16 50 <a href="mailto:ghislaine.descours@chu-lyon.fr">ghislaine.descours@chu-lyon.fr</a>
<b>Christophe Ginevra (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique)</b> Ingénieur IAI	<a href="mailto:christophe.ginevra@chu-lyon.fr">christophe.ginevra@chu-lyon.fr</a>
<b>Techniciens (Hospices Civils de Lyon)</b>	
<p>Isabelle Royet            Karine Droitcourt*            * remplacée par Charlotte Verrier, Emeline Warez, Hanene Haddour Doudou            Corinne Fauchon            Joelle Chastang            Marielle Siffert            Lucie Chaverot</p> <p>Noémie Fessy est recrutée sur un poste spécifique pour l'étude PROGLEGIO financé par la DGOS</p>	
<b>Cadre</b>	
Helena Rutschi	<a href="mailto:helena.rutschi@chu-lyon.fr">helena.rutschi@chu-lyon.fr</a>

<b>Secrétaires</b>	Tél : 04 72 07 11 45 Fax : 04 72 00 37 54
Manon Robert	<a href="mailto:manon.robert@chu-lyon.fr">manon.robert@chu-lyon.fr</a>
Blandine Bavitot	<a href="mailto:blandise.bavitot@chu-lyon.fr">blandise.bavitot@chu-lyon.fr</a>

H : hospitalier, U : universitaire

## Locaux

### Surface des locaux - plan :

Le CNR des légionelles est localisé à l'Institut des Agents Infectieux (IAI) dans le Centre de Biologie de l'Hôpital de la Croix Rousse. Hormis un plateau de Biochimie – Hématologie d'urgence destiné aux patients de l'hôpital de la Croix Rousse, plateau qui occupe un demi étage du bâtiment, le reste des 5 étages du bâtiment soit environ 4500 m<sup>2</sup> est occupé par la Microbiologie :

- le R+5de l'IAI est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie ;
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique) ;
- le R+3 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24 ;
- le R+2 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie – Hématologie 24/24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée ;
- le R+1 héberge le **CNR des staphylocoques, le CNR des Légionelles**, l'hygiène environnementale et la Parasitologie – Mycologie non automatisée.

### Etage des CNR de Bactériologie

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (cf plan – Figure 23). Les CNR bénéficient par ailleurs de toute l'infrastructure et des différents plateaux de l'IAI, notamment les outils d'identification MALDI-TOF du plateau de microbiologie 24/24 (R+2), les outils de biologie moléculaire et d'analyse bioinformatique du plateau de Biologie Moléculaire (R+4) et toutes les facilités logistiques du bâtiment (laverie – stérilisation...). Cela inclut notamment l'existence d'un secrétariat centralisé pour l'ensemble de l'IAI assurant une réponse téléphonique 6 jours sur 7 grâce à un numéro unique. En dehors des heures ouvrables et le week-end, ce numéro est transféré vers le numéro d'astreinte de microbiologie sur site. Ainsi, un interlocuteur pour le CNR sera toujours joignable.

L'équipe pathogénie des Légionelles localisée sur le site de la Doua ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR des Légionelles. L'activité du laboratoire est consacrée à l'étude de la physiopathologie des infections à *Legionella*.



**Figure 23.** Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles.

**Principaux équipements :**

Sur le plan des équipements, les principaux équipements dont dispose le CNR, qu'ils aient été acquis sur des crédits SpF ou du fait de la mutualisation avec les autres secteurs du laboratoire, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à tout un équipement technologique comme des appareils PCR temps réels (Light Cycler 1, 2 et 480, Bio-rad DNA Engine chromo4, et autres...), de nombreux thermocycleurs conventionnels, des extracteurs d'ADN, des hottes à flux et des PSMs, trois systèmes d'électrophorèse en champs pulsé Chef Biorad, un système informatique de traitement des images électrophorétiques et d'analyse des données, des cytomètres de flux (utilisé pour étudier l'interaction hôte bactérie au niveau cellulaire), un système de chromatographie liquide (utilisé pour la purification des protéines recombinantes), un système MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimadzu couplé à la base de données Saramis), des lecteurs de plaques spectro-fluoroluminomètre thermostatés et agités (Tecan), des ensemeuseurs (EasySpiral), des centrifugeuses de différentes capacités, et tout le matériel nécessaire à la stérilisation du matériel et à la décontamination.

Du fait de l'implantation du CNR des Légionelles au sein de l'Institut des Agents Infectieux regroupant les laboratoires de bactériologie, virologie et parasitologie de Lyon ainsi que 2 autres CNR et 1 laboratoire associé (Staphylocoques, Entérovirus et grippe), l'accès à de nouveaux équipements sera facilité.

Sur le plan plus spécifique des techniques de *Next Generation Sequencing* (NGS), les Hospices Civils de Lyon ont mis en place une plateforme dédiée au diagnostic par les techniques de séquençage haut débit nouvelle génération (voir paragraphe 2.6).

**Les moyens informatiques :**

Outre le système de gestion du laboratoire (SGL) qui est utilisé pour l'ensemble des analyses traitées par le laboratoire de bactériologie (GLIMS), incluant celles du CNR, le laboratoire s'est doté d'un outil de gestion de base de données spécifiques pour les CNR sur une base du logiciel Bionumerics de la société Applied Maths hébergé sur un serveur sécurisé à la DSII des Hospices Civils de Lyon. Le Logiciel BIGSDG, permettant la gestion notamment la gestion des bases de données NGS, est en cours d'installation sur un autre serveur sécurisé à la DSII.

## Collections de matériel biologique

### **Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections :**

#### Mode de constitution

La collection est actuellement constituée par :

- l'envoi systématique des souches d'origine clinique pour typage (circulaire du 11 juillet 2005) ;
- l'envoi des prélèvements pulmonaires (1) en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive), (2) en présence d'une culture positive (envoi avec la souche) et (3) si le laboratoire ne réalise pas la culture ou la PCR ; cet envoi peut être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique ;
- les prélèvements et les souches de légionelles isolées de patients en échec thérapeutique peuvent être adressés au CNR pour une étude de la sensibilité aux antibiotiques ;
- les sérums ayant une positivité lors du screening en ELISA ou pour confirmation du titre (en accord avec Santé publique France) ;
- les urines nécessitant une expertise par le CNR.

Concernant l'environnement, par :

- l'envoi des souches environnementales lors d'une investigation épidémiologique ;
- l'envoi de souches environnementales pour identification.

#### Mode de stockage

Le mode de stockage des échantillons et souches est résumé dans le tableau 7.

Depuis 2014 et le changement de système informatique (passage de MOLIS à GLIMS), une attention particulière a été portée sur l'informatisation de notre souchothèque et échantillothèque.

**Tableau 7.** Modes de stockage de la collection du CNR

<b>TYPE DE</b>	<b>Conservation</b>	<b>T°</b>	<b>Durée</b>
<b>Echantillons</b>			
<b>Respiratoires, LCR, Hémoc, Biopsie,...</b> si culture et/ou AgU et/ou PCR + si culture et/ou AgU et/ou PCR -	200 µL pour biologie moléculaire + tubes NUNC	- 20°C	Infinie
	Contenant d'origine	- 20°C	3 mois
<b>Tout prélèvement « important »</b>	Tubes NUNC	- 20°C	Infinie
<b>Urine</b> (non concentrée) + -	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	Infinie
	Contenant d'origine	+ 5°C	3 semaines
<b>Sérums</b>	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	5 ans puis ceux sélectionnés : durée infinie

#### **Souches**

<b>Souches extérieures</b>	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
----------------------------	---------------------	------	---------------------

<b>Souches cliniques</b>	1 émulsion dans sang de mouton	- 80°C	Infinie
	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
<b>Souches environnement « extérieur »</b>	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
<b>Souches environnement - eaux HCL</b>	2 émulsions sur billes	- 20°C	Tri / 3 ans

## ADN

<b>ADN de souches</b>	Microtubes	- 20°C	Infinie
<b>ADN de prélèvements cliniques</b>	Microtubes	- 20°C	Infinie
<b>ADN des eaux</b>	Microtubes	- 20°C	Infinie (après tri)
<b>Blocs PFGE</b>	Tubes NUNC	+ 5°C	Infinie

Les conservations de plusieurs aliquots d'un même échantillon ou souche sont réalisées dans des congélateurs différents.

Le stockage est réalisé en différentes conditions (-20°C et -80°C) et dans différents lieux de l'IAI en fonction de la fréquence d'utilisation du matériel stocké, à l'étage du CNR (principalement à -20°C), au sous-sol de l'Institut, dans une pièce de stockage (4 congélateurs -20°C et 2 congélateurs -80°C) ou hors bâtiment pour les ressources dites « mortes » dans un bâtiment prévu pour le stockage délocalisé (congélateur -20°C).

L'ensemble des congélateurs -80°C sera placé sous surveillance par sondes type SPY (logiciel SIRIUS). Concernant les congélateurs -20°C, certains seront placés sous surveillance SPY alors que d'autres seront suivi par des relevés de température classique.

### Mise à disposition des collections

Les souches sauvages d'origine clinique et/ou environnementale de la collection du CNR ainsi que les ADN de ces souches seront adressés aux laboratoires académiques, hospitaliers, ou environnementaux après demande motivée et sous le seul jugement des responsables du CNR.

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des Légionelles.

Les prélèvements de patients (urines positives ou sérum positifs) peuvent être adressés anonymisés à des laboratoires médicaux hospitaliers après demande motivée dans le contexte le plus souvent de contrôle d'une technique en cours de validation et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007).

### **Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation**

#### Collection de souches :

- souches de référence inscrites à l'ATCC soit 41 *L. pneumophila* et 56 *Legionella non pneumophila*
- souches de référence européennes du groupe EWGLI parfaitement caractérisées par différents marqueurs moléculaires (AFLP, PFGE, SBT, AP-PCR) (109 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale caractérisées par leur identification phénotypique, leur profil en champ pulsé, leur profil en Sequence Based Typing, et pour certaines souches le séquençage complet du génome (33 820)

Collection d'antigènes produits par le CNR et utilisés pour le sérodiagnostic : 200. Ces antigènes sont produits au CNR depuis 1980. Des échantillons fabriqués il y a plusieurs dizaines d'années sont encore utilisées.

Collection d'immun-sérums produits à partir des souches de référence chez le lapin : plus de 400.

Collection de sérums de patients : 26 660

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose : plus de 1300

Collection d'urines de patients atteints de légionellose : près de 300

**Tableau 8.** Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.

<b>Collection ou stockage échantillons</b>	<b>Nombre approximatif d'échantillons</b>	<b>conditions de conservation température</b>
Sérums	28900	-20°C
Souches patients	6350	-20°C et -80°C
Souches environnementales	28390	-20°C et -80°C
Souches de référence	207	-20°C et -80°C
Sérums de lapins immunisés	4 316	-20°C
Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
Prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	5000	-20°C
Urines	1000	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	4000	-20°C

### Démarche qualité du laboratoire

#### **Accréditation**

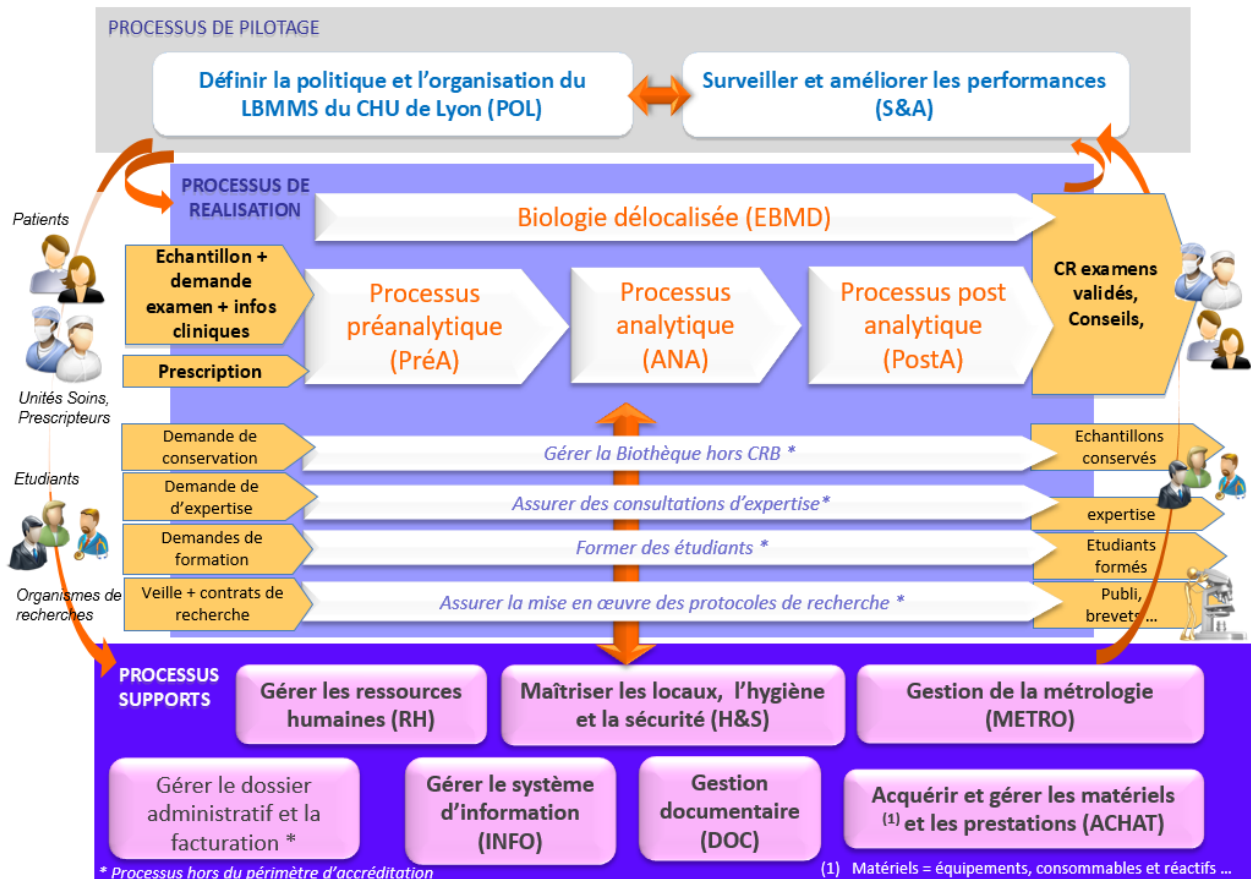
Le laboratoire de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (accréditation COFRAC n°8-3442) et le même système de management de la qualité est appliqué à tous les services du laboratoire. Le laboratoire de bactériologie des Hospices Civils de Lyon est accrédité pour la détection des antigènes de *Legionella* dans les urines et le CNR des Légionelles pour la PCR *Legionella* dans les prélèvements respiratoires. De plus, le CNR est accrédité pour la détection des *Legionella* dans les eaux propres par culture et PCR selon la norme NF EN ISO 17025 depuis juillet 2012 (accréditation COFRAC n°1-2423).

#### **Structure qualité du laboratoire**

La démarche qualité est gérée au niveau du pôle d'activité par une cellule qualité centrale que dirige le responsable qualité du laboratoire de biologie médicale. Le système qualité est articulé autour des processus dits de « pilotage », de « réalisation » et « supports », pour chacun desquels il existe un pilote et des participants au groupe de travail permettant de gérer et d'améliorer le processus (Figure 24).



## Cartographie des processus du LBMMS



**Figure 24.** Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001)

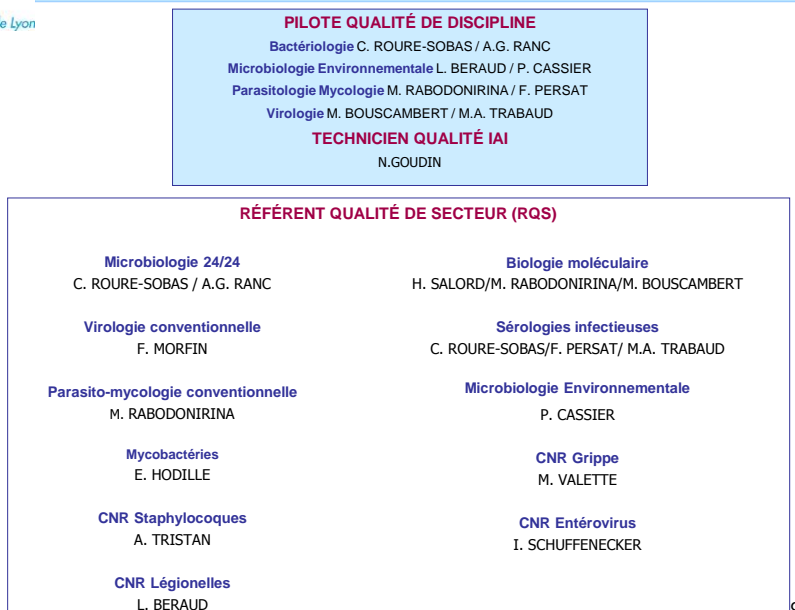
Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur. Pour le CNR des Légionelles, il s'agit de Laetitia Beraud.

La figure 25 représente l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valide en octobre 2018).

Un manuel qualité est disponible qui détaille l'ensemble des politiques et procédures mises en place pour répondre aux exigences d'accréditation de la biologie médicale.



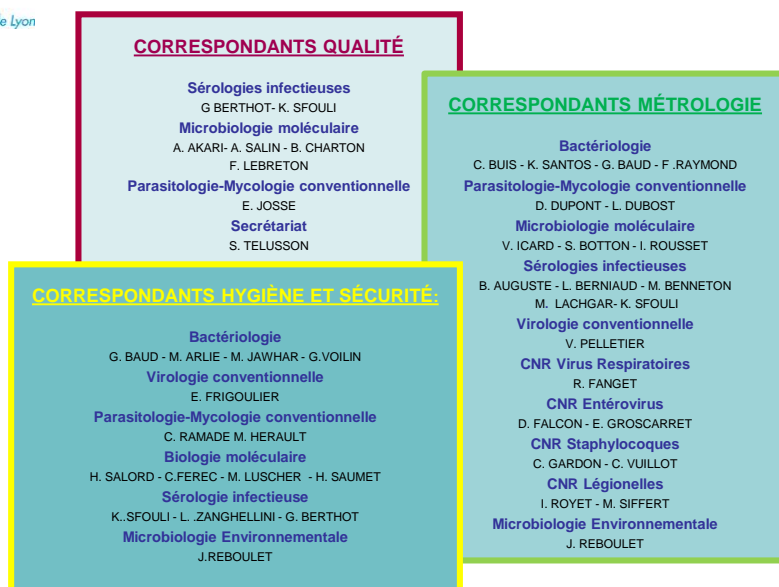
## Organigramme Qualité IAI



NE-RH-DE-012

\*RQS correspond au Référent Qualité de Site dans Kalilab, ici appliqué aux secteurs de l'IAI

## Organigramme Qualité IAI



NE-RH-DE-012

10

Figure 25. Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

### Contrôles de Qualité Externes (CQE)

Le CNR a participé en 2018 à 4 programmes de CQE différents concernant les analyses de PCR *Legionella* sur prélèvements (contrôle européen organisé par QCMD-ECDC, 10 échantillons par an), de mise en culture et dénombrement des *Legionella* dans les eaux (contrôle européen organisé par PHE, 2 échantillons 4 fois par an), de PCR *Legionella* dans les eaux (contrôle national organisé par AGLAE, 2 échantillons 2 fois par an) et de détection des antigènes urinaires (contrôle Labquality, 3 échantillons 4 fois/an).

Tous ces résultats sont analysés et revus en réunion régulièrement.

## **Audits**

Dans le cadre de l'accréditation selon la norme 17025, le CNR des Légionelles est audité depuis 2012 par des évaluateurs COFRAC pour vérifier le respect des exigences et la démarche d'amélioration continue mise en place. Ces audits ont toujours mis en avant la compétence des personnels du CNR et leur participation active dans la démarche qualité. Les évaluateurs ont à chaque fois accordée leur confiance au CNR et leurs rapports ont permis le maintien de l'accréditation (dernier audit effectué en novembre 2018).

De plus, des audits internes ont lieu également régulièrement, pour vérifier la mise en place du système qualité, selon la norme 17025 et selon la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire ou de laboratoires extérieurs formé à l'audit et donnent lieu à des rapports qui nous permettent de mettre en place des actions d'amélioration. En 2018, un audit du système de management de la qualité, un audit technique et un audit du prélèvement ont été réalisés.

## **Logiciel de gestion de la qualité**

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (300 documents qualité gérés pour le CNR des Légionelles), (ii) de suivre les compétences du personnel (formations, évaluations et qualifications), (iii) de gérer le matériel et ses maintenances.

Ce logiciel permet également de tracer les évènements indésirables (non-conformités ou réclamations) et de suivre les actions d'amélioration mises en place (plans d'actions, audits, revues, objectifs...).

Chaque personne du laboratoire a accès à ce logiciel et peut par ce biais s'impliquer dans la démarche qualité à différents niveaux.

## **Avancement de la démarche**

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR (diagnostic, identification et typage) d'ici 2020. Toutes les techniques de recherche d'antigénurie *Legionella* et de sérologie seront demandées à l'accréditation en 2019.

L'ensemble des activités font l'objet annuellement d'une revue au cours de laquelle l'atteinte des objectifs et le suivi des indicateurs qualité sont exposés et les axes d'amélioration pour l'année suivante sont décidés.

## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

### Liste des techniques de référence pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

#### Méthodes pour le diagnostic des légionelloses

- **Mise en culture** de prélèvements pulmonaires sur des milieux spécifiques (BCYE, BMPA, MWY)

Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. J Microbiol Methods. 2014, 98: 119-21.

- **Co-culture** des prélèvements pulmonaires sur **tapis ambien** réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline) ou par la technique *Amoebae Plate Test* (Test APT) nouvellement développée par le CNR et qui est la méthode utilisée depuis 2015.

Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Feb 8.

H. Hanneltel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, ESGLI 2016, Amsterdam, Pays-Bas.

- **Détection d'antigènes dans les urines** par immunochromatographie sur membrane (BinaxNOW *Legionella*<sup>®</sup>, ou autres), par immunofluorescence (Sofia<sup>®</sup>) et par ELISA (EIA Binax, ou autres).

Concentration des urines par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore<sup>®</sup>)

Chauffage des urines à 100°C pendant 5 min suivi d'une centrifugation à 1000 g pendant 15 min avant analyse pour éliminer les faux positifs (dénaturation protéique) quel que soit le test utilisé.

- **Sérodiagnostic** par ELISA (kit commercialisé) ou par immunofluorescence indirecte à l'aide d'antigènes préparés selon la méthode de Taylor *et al.* sur sacs vitellins d'embryons de poulet (Public Health Laboratory, Colindale, UK). Des antigènes polyvalents et monovalents de l'ensemble des sérogroupes et des espèces de *Legionella* sont ainsi préparés par le CNR.

- **PCR sur prélèvements pulmonaires**, sérum, sang sur EDTA ou autres prélèvements pathologiques :

Utilisation du réactif Diagénode<sup>®</sup> (*Legionella species and Legionella pneumophila* Real-time PCR)

**Le CNR des Légionelles est accrédité pour la PCR *Legionella* dans les prélèvements respiratoires.**

PCR en temps réel multiplexe, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al.* ; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015). Cette PCR cible une région spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* d'une part et une région spécifique du séro groupe 1 de cette même espèce permettant son identification simultanément à la détection de l'espèce.

PCR universelle 16S pour les produits pathologiques provenant de sites habituellement stériles

PCR spécifique du séro groupe 1 de *L. pneumophila* (Lp1) applicable aux prélèvements environnementaux et aux prélèvements cliniques

Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, Maurin M, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL; the DELPH-I group, Lawrence C, Buchrieser C. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1708-17.

PCR-séquençage de la région intergénique 23S-5S pour identifier les espèces de *Legionella* non *pneumophila*

Grattard F, Ginevra C, Riffard S, Ros A, Jarraud S, Etienne J, Pozzetto B. *Microbes Infect.* 2006;8:73-83.

### Méthodes d'identification des légionelles

- **Identification phénotypique** des sérogroupes des *L. pneumophila* par **immunofluorescence ou ELISA** à l'aide des Ac monoclonaux de Dresden (mise à disposition par Christian Lück, CNR des Légionelles, Dresden, Allemagne) ; agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, Prolab) ; immunofluorescence directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles

Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. *Typing methods for Legionella.* *Methods Mol. Biol.* 2013; 954:119-48.

- Identification génotypique des *L.* non *pneumophila* par **séquençage du gène mip** et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)) et par amplification et **séquençage de l'espace intergénique 23S-5S.**

- Identification des *Legionella* par la méthode **MALDI-TOF-MS.**

Le CNR dispose actuellement de MALDI-TOF (VITEK MSTM version 2.0)

Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. *J Med Microbiol.* 2010;59:273-84.

Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydiere AM, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Communication affichée, 28<sup>ème</sup> RICAI 2009, Paris.

Dauwalder , Ottaviani, R, Maffre I, Miclot A, De Respinis S, Monnin V, Mailler S, Welker M, Durand G, Gaia V, Girard V, Jarraud S. Validation of the VITEK<sup>®</sup> MS IVD and RUO databases for *Legionella* species identification. Communication affichée, ESGLI Meeting, London, UK, september 2015.

### Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

- Détermination des **CMI** (concentrations minimales inhibitrices) par microdilution en milieu liquide LGM

Vandewalle M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, *IJAA* , 2017

- Détermination des **CMIE** (concentration extracellulaire minimale inhibant complètement la multiplication intracellulaire) après infection de lignée cellulaire macrophagique

Descours G, Ginevra C, Ader F, Forey F, Lina G, Etienne J, Jarraud S. *Int J Antimicrob Agents.* **2011** Aug;38(2):188-9.

- Détection par **PCR** en point final et en temps réel, suivies d'un **séquençage Sanger** ciblant les gènes impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine : *gyrA*, *rrl*, *rplD*, *rplV* et *rpoB* respectivement) ; ces PCR peuvent être réalisées sur souche ou directement sur prélèvement

Descours G, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Etienne J, Lina G, Ginevra C, Jarraud S. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: from molecular characterization to clinical investigations. Communication affichée, 24th ECCMID, Barcelone, Espagne, 10-13 juin **2014**.

Shadoud L, Almahmoud I, Jarraud S, Etienne J, Larrat S, Schwebel C, Timsit JF, Schneider D, Maurin M. Hidden selection of bacterial resistance to fluoroquinolones in vivo: the case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine.* **2015** Jul 17;2(9):1179-85.

- Identification des **sous populations résistantes** aux macrolides, quinolones et rifampicine par technique de **séquençage ciblé haut débit.**

## Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement

- **Culture** de prélèvement d'eau selon la norme NFT90-431 (Accréditation n°1-2324)
- Culture de matrice complexe tels que compost, terre, lagunes d'épuration ...
- Culture de prélèvements issus d'appareil d'oxygénothérapie
- **PCR** quantitative en temps réel selon la norme NFT90-471 : PCR quantitative détectant *L. pneumophila* et *Legionella* spp. avec un système commercialisé, le GeneCycler (GeneCycler®) (Accréditation n°1-2324)

Joly P, Falconnet PA, Andre J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, Maurin M, Etienne J, Jarraud S. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. Appl Environ Microbiol. 2006;72:2801-8.

Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, Andre J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Real-time PCR detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. Appl Environ Microbiol. 2007;73:1452-6.

**Le CNR est accrédité pour la détection des *Legionella* dans les eaux propres par culture et PCR selon la norme NF EN ISO 17025 depuis juillet 2012 (accréditation COFRAC n°1-2423).**

## Détection et quantification des bactéries viables

- Marquage de **bactéries viables** par différents marqueurs (TVC, Bac Light Kit, Dapi, Immunologique) et lecture au microscope à fluorescence

Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. Appl Environ Microbiol. 2008 ;74:4817-24.

- **Quantification de l'adhésion et de la multiplication des légionelles**

Par différentes méthodologies (microscopique, TECAN, PCR, cultivabilité) sur différents types cellulaires (U937, A549, amibes...)

## Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique

### Méthodes appliquées sur souches

- **Typage phénotypique** par ELISA ou immunofluorescence réalisé à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (mAbs) de Dresden de 24 mAbs permettant le sous-groupage des *L. pneumophila* séro-groupe 1 en 9 sous-groupes (souche Philadelphia, Knoxville, Olda, Oxford, etc.)
- « *Sequence Based Typing* » (**SBT**), méthode de référence Européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes
- Analyse des profils de macrorestriction de l'ADN total par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed-field gel electrophoresis* ou **PFGE**), interprétation avec BioNumerics
- Méthode de **spoligotypage** développée par le CNR permettant de discriminer les souches du clone endémique *Legionella pneumophila* Paris, technique sur membrane ou sur Luminex

Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):696-701.  
Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refregier G, Jacotin N, Sola C, Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2410-5.

- Identification des isolats porteurs du gène ***lag-1*** par PCR

- **Séquençage du génome entier** (Whole Genome Sequencing, **WGS**) applicable sur souche d'origine clinique et souche environnementale. Préparation des banques à l'aide du kit Nextera XT, séquençage paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) ou MiSeq de la plateforme des HCL.

Interprétation : analyse basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) (Bwa et Bowtie, sous un environnement Galaxy, Parsnp) et sur le cgMLST (standardisé au niveau international en Août 2018)

### **Méthodes appliquées sur prélèvements cliniques ou sur échantillons environnementaux**

- **Nested-SBT** : la technique de SBT peut être appliquée directement sur prélèvement clinique en s'affranchissant de l'isolement de souches. Cette méthode a été développée par le CNR. Le protocole est maintenant disponible sur le site de l'HPA (Health Public Agency).

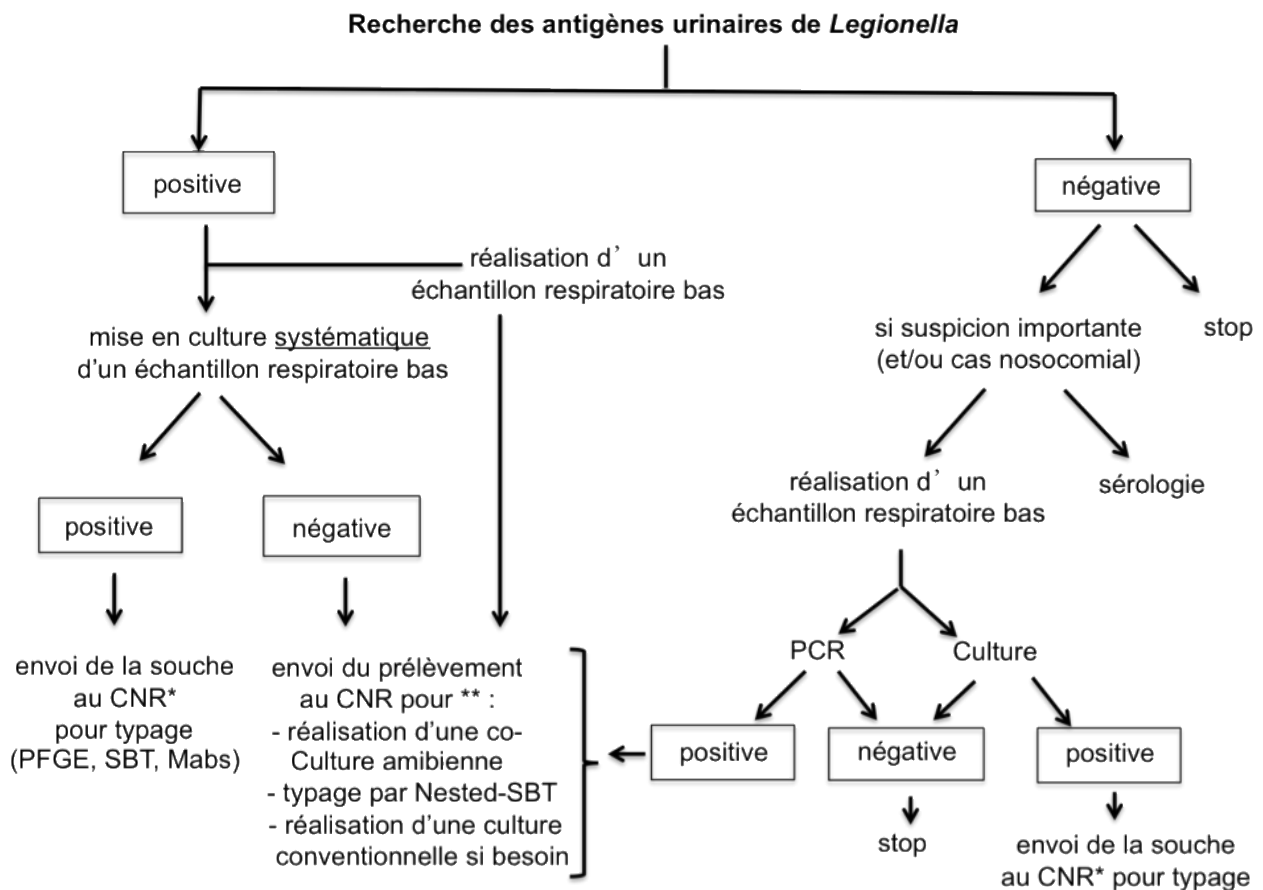
Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M. J Clin Microbiol. 2009;47:981-7.

### **Liste des techniques recommandées par le CNR**

#### **Diagnostic**

Une proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose est présentée en Figure 26.

- **Détection des antigènes urinaires**
  - Pour toute urine détectée positive et quel que soit le réactif utilisé, il est recommandé de tester une seconde fois les urines après chauffage (5 minutes à 95°C +/- 5°C, puis centrifugation 15 min à 1000 g et analyse du surnageant).
  - Pour certains réactifs, une concentration des urines avant analyse est fortement recommandée pour augmenter la sensibilité ; cette concentration peut être réalisée par ultrafiltration par centrifugation. Pour d'autres réactifs, ce prétraitement est proscrit.
- **Culture de prélèvements pulmonaires :**
  - Il est recommandé d'utiliser au moins 2 milieux : 1 BCYE (sans antibiotique) + 1 milieu BMPA (ou MWY). Ces 2 milieux BMPA ou MWY sont à privilégier
  - Le milieu GVPC n'est pas recommandé car de moins bonne sensibilité.
  - Les milieux sont incubés en aérobiose à 35°C (+/- 2°C) pendant 10 jours en atmosphère humide pour éviter le dessèchement des géloses. Une culture en présence de 2,5% de CO<sub>2</sub>, favorise la croissance de certaines espèces de légionelles mais n'est pas obligatoire. Par contre, une atmosphère avec 5% de CO<sub>2</sub> peut inhiber la croissance des légionelles.
  - Le CNR souhaite **recevoir les prélèvements pulmonaires** en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive)
    - si la culture est positive (envoi avec la souche)
    - si le laboratoire ne réalise pas la culture ou si celle ci est négative
    - les analyses réalisées par le CNR (Figure 5) dans un but épidémiologique ne seront pas facturées.



\* toutes les souches de légionelles d'origine clinique doivent être envoyées au CNR. Les souches sont majoritairement typées par **Whole Genome Sequencing (WGS)**

\*\* les prélèvements respiratoires bas peuvent être adressés au CNR pour culture, co-culture amibienne et typage par SBT directement sur prélèvement en cas de recherche d'antigène urinaire positif ou en cas de forte suspicion de légionellose. Cet envoi pourra être demandé par l'ARS lors d'une investigation épidémiologique.

**Figure 26.** Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.

- PCR

Elle fait partie des critères de définition d'un cas de légionellose. Cette méthode sera employée en cas d'antigénurie négative et de suspicion de légionellose ou en 1<sup>ère</sup> intention.

- Sérologie

Elle présente un intérêt limité depuis l'apparition des tests urinaires et de la PCR sur prélèvement pulmonaire.

- Identification

Elle est réalisable :

- par MALDI TOF-MS : *L. pneumophila* et *Legionella* spp ;
- par amplification et séquençage du gène *mip* pour les *Legionella* non *pneumophila* (non identifiable par MALdi Tof);
- par agglutination de particules de latex pour *L. pneumophila* et les différents sérogroupes notamment le sg1 ;
- par immunofluorescence.



- Typage

- Whole Genome Sequencing et analyse basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) : pour cette méthode une connaissance des génomes de *Legionella* peut être importante car cette méthode utilise le mapping des reads sur une souche de référence à identifier.
- Méthode standardisée au niveau européen : le *Sequence Based Typing*. La méthode SBT est décrite sur le lien [www.ewgli.com](http://www.ewgli.com) et peut être utilisée par tout laboratoire.

Afin de détecter les cas groupés et d'identifier les sources de contamination, il est préférable que ces analyses soient centralisées au CNR.

- Sensibilité aux antibiotiques

Les méthodes disponibles au CNR sont les suivantes :

- CMI en milieu liquide BYE ou CMIE (concentration extracellulaire minimale inhibant complètement la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila*) réalisée à l'aide de macrophages.
- PCR détectant les résistances aux macrolides, quinolones et rifampicine

Cette recherche doit être préconisée en cas d'échecs thérapeutiques, définis par une absence d'amélioration clinique associée ou non à la persistance de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires (par culture ou PCR) malgré une antibiothérapie bien conduite.

Cette recherche étant très rare pour un laboratoire, il est préférable qu'elle soit réalisée par le CNR.