

**Rapport annuel
d'activité**

2018

**Centre National
de Référence
des Légionelles**

**Année d'exercice
2017**

Dr 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

* Un total de **1630 cas** de légionellose a été notifié en France en 2017, *versus* 1218 cas en 2016 soit une **augmentation de 34%**. C'est le nombre le plus important de légionellose déclaré en France au cours d'une année depuis la découverte de cette infection. Pour la très grande majorité, ces cas sont sporadiques. Une augmentation de cas a également été rapporté dans de nombreux pays européens, des hypothèses météorologiques ont été avancées. Quant aux sources de contaminations identifiées en France, les données de 2017 sont proches de celles des années antérieures ; mais une investigation environnementale a été réalisée pour seulement moins de 5% des cas déclarés. Ainsi, **malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires** de surveillance et traitement notamment des tours aéroréfrigérantes, des réseaux d'eau des établissements de Santé, des hébergements pour personnes âgées, et plus récemment des établissements recevant du public, le nombre de cas de légionellose ne diminue pas, voire augmente.

Les enjeux sont de maîtriser les sources de contamination potentielles et d'identifier d'autres sources non suspectées jusqu'à présent et de mieux appréhender les influences climatiques.

* La légionellose reste une infection sévère avec une **létaleté 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.

Le CNR a pour vocation à répondre à ces enjeux. Pour cela nous développons en **collaboration internationale** et notamment avec les CNR européens les outils nécessaires à l'investigation des cas et à l'identification des sources de contamination avec en premier lieu les outils de **Next Generation Sequencing**. Cela implique en parallèle une amélioration du nombre de souches disponibles et de favoriser le diagnostic des cas de légionellose notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires. La légionellose reste une infection sévère malgré la mise en place d'antibiothérapies adaptées. Un des objectifs majeurs est la meilleure compréhension des facteurs microbiologiques et de réponse de l'hôte associés à la **sévérité des cas de légionellose**. Une grande étude nationale coordonnée par le CNR a démarré en 2017 pour répondre à cette question (**étude translationnelle en santé PROGLEGIO** financé par la DGOS et l'ANR).

Faits marquants en 2017

* Près d'un tiers des investigations réalisés ont concernés un **domicile** en 2017 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).

* Gestion de la **première épidémie de fièvre de Pontiac** en France avec deux éléments microbiologiques marquants : (1) nous avons montré la nécessité de réaliser des prélèvements pulmonaires (de préférence) ou naso-pharyngée au cours de ses symptômes pseudogrippaux malgré l'absence de pneumonie (ce qui caractérise une fièvre de Pontiac) ; ceci a permis la mise en évidence de *Legionella micdadei* et/ou d'ADN de *Legionella* dans ces prélèvements et ainsi d'identifier l'agent causal et de réaliser un sérodiagnostic ciblé ; (2) l'expertise disponible au CNR de sérodiagnostic pouvant cibler l'ensemble des espèces de *Legionella* (de part la disponibilité de l'ensemble des antigènes cibles) a été utile dans ce contexte.

* **366 isolats ont été typés par séquençage complet**. Cette technologie a été particulièrement intéressante pour les cas à Lp1 **ST1**, le fort pouvoir discriminant de cette méthode étant indispensable pour ces isolats ST1 fréquemment isolés dans l'environnement et avec une distribution mondiale. Ces analyses ont notamment fortement suggéré la contamination de patients fortement immunodéprimés par l'eau des **cuvettes de toilette** à l'hôpital probablement par les aérosols produits lors du tirage de la chasse d'eau. Ces investigations pourraient être plus fréquemment proposées lorsque les investigations environnementales des cas nosocomiaux sont infructueuses.

Abstract

Public Health Issues

* A total of **1630 cases of Legionnaires' disease (LD)** was notified in France in 2017, versus 1218 cases in 2016, **an increase of 34%**. This is the largest number of LD notified in France since the discovery of this infection. These LD are mainly sporadic cases. An increase in LD notified cases was detected in many European countries, and meteorological assumptions have been proposed. The sources of contamination identified in France in 2017 are close to those of previous years; however, an environmental investigation was carried out for only less than 5% of the notified cases. Thus, despite the **implementation of numerous regulatory measures** for monitoring and treatment including cooling towers, water networks of health facilities, nursing home, and more recently public institutions, the number of LD cases does not decrease.

The challenge is to control potential sources of contamination and to identify other sources that have not been suspected so far and finally to better understand climatic influences.

* 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.

The NRC's mission is to respond to these issues. For this purpose, we are developing, in **international collaborations** especially with the European NRCs, the **Next Generation Sequencing** tools needed to investigate cases and identify sources of contamination. This implies in parallel an improvement of the number of available strains and to promote the diagnosis of the LD notably by the use of the PCR on pulmonary samples. Legionnaires' disease remains a severe infection despite the introduction of appropriate antibiotic therapy. A major goal is a better understanding of the microbiological factors and host response aspects associated to the severity of LD. A large national study coordinated by the NRC started in 2017 to answer this question (translational health **study PROGLEGIO** funded by DGOS and ANR).

Highlights in 2017

* Nearly one-third of the investigations were performed at **home** in 2017 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 role of the home (not regulated by the regulations).

* Management of the **first Pontiac fever outbreak** in France with two striking microbiological aspects: (1) we have shown the need to perform pulmonary (preferably) or nasopharyngeal sampling despite the absence of pneumonia (which characterizes a Pontiac fever); this allowed the detection of *Legionella micdadei* and / or Legionella DNA in these samples and thus to identify the causative agent and to carry out a targeted serodiagnosis; (2) the expertise available at the NRC for serodiagnosis that can target all *Legionella* species (due to the availability of all target antigens) was useful in this context.

* **366 isolates** were typed by **Whole Genome Sequencing**. This technology has been particularly interesting for the Lp1 ST1 cases. Indeed, the high discriminatory power of this method is indispensable for these ST1 isolates frequently isolated in the environment with a worldwide distribution. In particular, these analyzes strongly suggested the contamination of highly immunocompromised patients with water from toilet bowls in the hospital. These sampling could be more frequently proposed when environmental investigations of nosocomial cases are unsuccessful.

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.

Table des matières

1. Missions et organisation du CNR.....	10
2. Activités d'expertise.....	11
2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2017	11
2.1.1. PCR du groupe européen ESGLI détectant <i>L. pneumophila</i> et Lp1	11
2.1.2. Développement d'une PCR spécifique du ST1 (voir paragraphe 6.1.2)	11
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	11
2.2.1. Evaluation du prototype de test de la société Biosynex pour la recherche d'antigènes urinaires	11
2.2.2. Evaluation du test Monlab pour la recherche d'antigènes urinaires	12
2.2.3. Evaluation du lecteur pour le test immunochromatographique BinaxNOW® <i>Legionella</i> de la société Alere	12
2.2.4. Evaluation du test Legiolert™ commercialisé par la société IDEXX pour la recherche de <i>Legionella pneumophila</i> dans les eaux.....	13
2.2.5. Quantification l'ADN étalon de <i>Legionella</i> , matériel de référence certifié (CRM), par droplet PCR (ddPCR)	13
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	13
2.3.1. Institut Pasteur, Algérie	13
2.3.2. CNR des légionelles de Belgique	13
2.4. Collections de matériel biologique	13
2.5. Activités d'expertise.....	14
2.5.1. Synthèse de l'activité d'expertise.....	14
2.5.2. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses.....	15
2.5.3. Restitution des résultats	17
2.6. Activités de séquençage.....	17
Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	17
Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	17
Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?.....	18
3. Activités de surveillance.....	19
3.1. Description du réseau de partenaires	19
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	22
3.2.1. Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF).....	22
3.2.2. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR.....	24
3.2.3. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR.....	32
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	33
3.3.1. Définitions utilisées pour exprimer la résistance	33
3.3.2. Résultats & analyse des tendances.....	34
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	34
3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	34
3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC).....	35
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	36
4. Alerte.....	38

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 2017	38
4.2.	Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	38
5.	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	42
5.1.	Conseil et expertise aux professionnels de santé	42
5.2.	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	43
5.3.	Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	43
6.	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	43
6.1.	Activités de recherche en cours lors de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	44
6.1.1.	Projet présenté dans le rapport de 2016 – finalisé en 2017 avec une publication en 2017 (les abstracts n'ont pas été ajouté)	44
6.1.2.	Etudes démarrées en 2017	44
6.2.	Liste des publications et communications de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	47
6.2.1.	Publications nationales	47
6.2.2.	Publications internationales	47
6.2.3.	Communications nationales	48
6.2.4.	Communications internationales	48
6.2.5.	Conférences sur invitations	49
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	49
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	50
Annexe 1 :	Missions & organisation du CNR	52
Missions du CNR des Légionelles		52
1.	Apporter une expertise microbiologique	52
2.	Conseil	52
3.	Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique	52
4.	Contribuer à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel	52
Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés		53
Personnels affectés au CNR et Organigramme		53
Locaux		55
Principaux équipements :		56
Collections de matériel biologique		57
Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;		57
Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation		58
Démarche qualité du laboratoire		59
Accréditation		59
Structure qualité du laboratoire		59
Contrôles de Qualité Externes (CQE)		61
Audits		61
Logiciel de gestion de la qualité		62

Avancement de la démarche	62
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	63
Liste des techniques de référence pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux.....	63
Méthodes pour le diagnostic des légionelloses.....	63
Méthodes d'identification des légionelles.....	64
Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques.....	64
Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement.....	65
Détection et quantification des bactéries viables.....	65
Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique	65
Méthodes appliquées sur souches.....	65
Méthodes appliquées sur prélèvement clinique ou sur échantillons environnementaux.....	66
Liste des techniques recommandées par le CNR.....	66

Table des figures

Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2017	14
Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012-2017.....	15
Figure 3. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins une souche clinique ou au moins un prélèvement respiratoire pour mise en culture.	20
Figure 4. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins un prélèvement pour diagnostic et/ou expertise.....	21
Figure 5. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins une souche environnementale.	22
Figure 6. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2017 (Santé Publique France).	23
Figure 7. Distribution du taux d'incidence standardisé* de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2017 (Santé Publique France).....	23
Figure 8. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2017.....	24
Figure 9. Origine des souches reçues ou isolées en 2017 superposée à l'incidence de la déclaration par région (en fonction du lieu du laboratoire d'envoi)	25
Figure 10. Répartition par région (en fonction du lieu de résidence du patient) des souches isolées, rapporté au nombre de cas déclarés.....	26
Figure 11. Répartition des différents sous-groupes de <i>L. pneumophila</i> séro-groupe 1 parmi les 2280 souches d'origine clinique isolées entre 2008 et 2016 et parmi les 274 souches d'origine clinique analysées en 2017.....	28
Figure 12. Répartition des différents profils de <i>L. pneumophila</i> séro-groupe 1 en PFGE parmi les 361 souches d'origine clinique analysées en 2017.	29
Figure 13. Evolution de la distribution des 9 principaux ST associés à l'infection en France de 2008 à 2017.	31
Figure 14. Distribution en termes de séro-groupe des souches de <i>Legionella pneumophila</i> d'origine environnementale adressées au CNR en 2017.	32
Figure 15. Distribution en termes d'espèce des souches de <i>Legionella non pneumophila</i> d'origine environnementale adressées au CNR en 2017.	33
Figure 16. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000.....	36
Figure 17. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2017 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête (Positives = enquête ayant permis d'identifier la source de contamination du patient).	38
Figure 18. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques	39
Figure 19. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction de la date de début des signes (n=11).....	40
Figure 20. Organigramme fonctionnel du CNR	53
Figure 21. Espaces du R+1 de l'IAI (espaces en jaune) affectés au CNR des staphylocoques et des Légionelles.....	56
Figure 22. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).....	60
Figure 23. Organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie.....	61

Table des tableaux

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2013-2017.....	14
Tableau 2. Répartition en terme d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> des souches d'origine clinique isolées en France, 2011 – 2017.....	27
Tableau 3. Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2017.....	30
Tableau 4. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.....	32
Tableau 5. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2017.....	37
Tableau 6. Résultats des investigations réalisées en 2017 ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination selon le pulsotype.....	37
Tableau 7. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles.....	54
Tableau 8. Modes de stockage de la collection du CNR.....	57
Tableau 9. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR Légionnelles.....	59

1. Missions et organisation du CNR

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

Les évolutions intervenues lors de l'année 2017 sont les suivantes :

- Sur le plan organisationnel :

Déménagement des locaux du CNR en janvier 2017 vers l'Institut des Agents Infectieux (IAI) de l'Hôpital de la Croix Rousse. Le CNR est désormais installé au 1^{er} étage du bâtiment où il bénéficie de locaux spécifiquement adaptés à son activité, d'un environnement favorable à des activités transversales et d'un accès à des équipements spécialisés.

- Sur le plan des personnels affectés au CNR :

Cadre de Santé : remplacement d'Helena Rutschi par Aline Billoud en février 2017 ;

Techniciens :

arrivée de Corinne Fauchon en février 2017 (plan d'accompagnement social lié au changement de site) en remplacement de Jérémy Reboulet (départ en septembre 2017) ;

remplacement temporaire de Karine Droitcourt (par Noémie Fessy jusqu'en avril 2017, puis par Chanel Dieny-Barret (mai à septembre 2017) et par Charlotte Verrier (octobre à décembre 2017) ;

diminution de 20% de l'activité de Lucie Chaverot à partir de novembre 2017 ;

Biologistes : réorganisation du temps de travail des biologistes de l'IAI conduisant à l'arrivée de Pascale Girardo en janvier 2017 ;

Ingénieurs : départ de Maud baume (ingénieur Qualité) en juin 2017 pour une activité « qualité » transversale aux HCL

L'organigramme du CNR au 31 décembre 2017 était le suivant :



Noémie FESSY est recrutée sur un poste spécifique pour l'étude PROGLEGIO financé 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.

Éléments clés de l'année 2017 en termes de production d'expertise

- Mise en place d'une PCR diagnostic développée au niveau européen *L. pneumophila* (Lp) / Lp séro groupe 1 ;
- Evaluation de 2 kits de détection des antigènes urinaires (Biosynex, Monlab) et de l'impact d'un lecteur sur les performances du kit BinaxNow *Legionella*, Alere ;
- Evaluation d'une méthode simple de détection et quantification des *L. pneumophila* dans les eaux propres (Legiolert, IDEXX) ;
- Evaluation positive de l'utilisation de la ddPCR comme outil pour suivre la stabilité du matériau de référence, l'ADN étalon et pour certifier (attribuer une valeur à) un nouveau lot d'ADN ;
- Augmentation du nombre de prélèvements cliniques adressés au CNR pour isolement de légionelles (+65%), en lien avec une sensibilisation des biologistes et cliniciens sur l'importance d'isoler des souches pour réaliser des enquêtes épidémiologiques ;
- Doublement du nombre de prélèvements d'urines adressées au CNR pour expertise, en lien avec la commercialisation de nouveaux tests et lecteurs automatisés sur le marché français.

2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2017

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

En 2017, le CNR a mis en place une PCR en temps réel multiplex, 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.

2.1.2. Développement d'une PCR spécifique du ST1 (voir paragraphe 6.1.2)

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

2.2.1. Évaluation du prototype de test de la société Biosynex pour la recherche d'antigènes urinaires

En 2017, Le CNR a évalué un nouveau prototype de test immuno-chromatographique proposé par la société Biosynex pour la recherche des antigènes urinaires *Legionella*. Les performances de ce test réalisé à la fois sur urines concentrées et non concentrées ont été comparées à ceux du test BinaxNOW® d'Alere sur urines concentrées. La concordance de spécificité entre les 2

tests était correcte avec sur 200 urines rendues négatives par le test BinaxNOW®, 196 rendues également négatives par le test Biosynex sur urines concentrées et 195 rendues négatives par le test Biosynex sur urines non concentrées. Après chauffage des échantillons positifs, une seule urine concentrée est restée positive avec le test Biosynex. Le test de sensibilité sur urines positives a été arrêté en cours d'étude après seulement 22 échantillons analysés, les performances du prototype proposé par Biosynex n'étant pas satisfaisantes. En 2018, une seconde version prototype de ce test devrait être évaluée au CNR.

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

Le CNR a également initié une évaluation du test Monlab, test immuno-chromatographique pour la recherche d'antigénurie *Legionella* commercialisé par la société Orgentec. Les performances de ce test réalisé sur urines non concentrées ont été comparées à celles du test BinaxNOW® sur urines non concentrées. Cette évaluation a été réalisée en partenariat avec 2 sites utilisateurs de ce test, l'Hôpital d'Instruction des Armées de Begin et le site de Marne-la-Vallée du Grand Hôpital de l'Est Francilien. L'étude de spécificité a été réalisée par les sites partenaires sur 200 urines, toutes négatives avec le test BinaxNOW®. Trois échantillons se sont révélés positifs avec le test Monab ; parmi eux, 2 se sont négativés après chauffage de l'échantillon et le 3^{ème} a été confirmé négatif par une 3^{ème} technique réalisée au CNR. En 2018, l'étude de sensibilité sera réalisée par le CNR.

2.2.3. Evaluation du lecteur pour le test immunochromatographique BinaxNOW® Legionella de la société Alere

Le CNR a réalisé une évaluation du lecteur Alere qui a été présentée au cours des congrès *Legionella* (Rome, septembre 2017) et RICAI (Paris, décembre 2017). Le résumé était le suivant :

Introduction : La recherche d'antigènes urinaires est la méthode la plus utilisée pour le diagnostic de légionellose. L'utilisation couplée d'un lecteur aux tests rapides apporte objectivité et traçabilité des résultats. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du test BinaxNOW® *Legionella* couplé au lecteur Alere.

Matériels et méthodes : La sensibilité du lecteur couplé au test BinaxNOW® a été comparée à la sensibilité du test seul sur des échantillons d'urines surchargés en LPS (lipopolysaccharide) de *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Les performances ont également été évaluées sur urines non concentrées et concentrées par ultrafiltration. Le test était lu en parallèle par un opérateur et par le lecteur selon les données fournisseurs. Tous les résultats positifs étaient confirmés après chauffage de l'échantillon d'urines. Au total 201 urines fraîches et 48 urines positives congelées ont été analysées.

Résultats : L'étude d'urines surchargées en LPS a montré un gain de sensibilité du test BinaxNOW® grâce au lecteur permettant de détecter des concentrations jusqu'à 10 fois inférieures à celles détectables par la lecture visuelle. Sur les 201 urines fraîches, 200 étaient négatives. Parmi elles, 4 échantillons ont entraîné un résultat initialement positif qui s'est négativé après chauffage. Trois de ces faux positifs étaient uniquement liés au lecteur, le 4^{ème} étant faussement positif à la fois par lecture visuelle et automatisée. De plus, 2 problèmes de migration sur la carte test avec présence d'une bande verticale entraînant un faux positif au lecteur ont été observés. Parmi les 49 urines positives (48 congelées et 1 fraîche), 41 ont montré des résultats concordants avec les 2 méthodes de lecture. Trois échantillons étaient négatifs à l'œil nu et positifs au lecteur avant concentration, puis positifs avec les 2 méthodes après concentration. Enfin, 5 échantillons étaient positifs au lecteur sur urines concentrées et non concentrées, avant et après chauffage, alors qu'aucune bande n'était observée à l'œil nu.

Conclusion : Le lecteur apporte un gain de sensibilité démontré à la fois sur urines surchargées en LPS et sur urines connues positives. Par contre, il entraîne une perte de spécificité avec une augmentation du nombre de faux positifs (4/200). Le chauffage des échantillons d'urines a permis d'éliminer l'ensemble des faux positifs.

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

Fin 2017, le CNR a débuté l'évaluation du test Legiolert™ commercialisé par la société Idexx, 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. Un total de 125 échantillons d'eau potable « propre » a été testé par cette méthode et par la méthode de culture NF T90-431: 2017 : 72 échantillons étaient négatifs avec les deux méthodes, 10 étaient positifs à *Legionella anisa* (détectée uniquement par la méthode standard), 43 étaient positifs à *Legionella pneumophila* (35 détectés par les deux méthodes, 5 détectés uniquement par la méthode standard et 3 détectés uniquement par Legiolert). La concordance globale était de 81,4% entre les deux méthodes. Cette évaluation a été finalisée en 2018.

2.2.5. Quantification l'ADN étalon de *Legionella*, matériel de référence certifié (CRM), par droplet PCR (ddPCR)

La valeur du CRM, ADN étalon de *Legionella* utilisé pour quantifier l'ADN dans les échantillons d'eau par PCR, avait été assignée initialement en 2009 par PCR quantitative et dilution limite. Nous avons montré la possibilité d'utiliser la droplet digital PCR (ddPCR) (BioRad), méthode de PCR quantitative pour obtenir une quantification absolue et un suivi de la stabilité du matériel de référence. Cette méthode pourrait être utilisée pour certifier (attribuer une valeur à) un nouveau lot d'ADN avec une incertitude réduite, un protocole simple et un faible nombre d'échantillons à tester. Cette méthode est une méthode adaptée pour contrôler régulièrement la stabilité du CRM.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

2.3.1. Institut Pasteur, Algérie

Nous avons poursuivi la collaboration initiée en 2016 avec le Dr Kahina SOUAMI, Maitre-assistante en biologie clinique à la Faculté de Médecine d'Alger et au Laboratoire de biologie médicale de l'Institut Pasteur d'Algérie depuis plusieurs années. En 2017, nos échanges se sont poursuivis par messagerie électronique. Ils ont permis de la conseiller sur les techniques à utiliser pour faire le diagnostic de légionellose et l'isolement de légionelles à la fois de prélèvements cliniques et environnementaux. Pour les 18 cas de légionellose diagnostiqués (principalement par tests d'antigénurie) ou suspectés par le Dr Souami, nous avons analysé 16 échantillons d'urines et 15 prélèvements broncho-pulmonaires. Neuf cas ont été confirmés par un test urinaire, 3 par PCR spécifique de *Legionella pneumophila* séro groupe 1. Aucune souche n'a été isolée au CNR ; l'analyse des souches isolées en Algérie est en cours.

2.3.2. CNR des légionelles de Belgique

Discussion avec les CNR Belges pour la mise en place de méthodes permettant le sous typage des isolats Lp1 ST1.

2.4. Collections de matériel biologique

Le déménagement du CNR vers le site de l'Hôpital de la Croix-Rousse n'a entraîné aucun changement quant à ses collections de souches, prélèvements et ADN. Les congélateurs contenant ces collections ont été transférés pleins et dans des conditions permettant d'assurer leur conservation.

Les échantillons distribués en 2017 sont les suivants :

- 12 sérums positifs au CHU de Clermont Ferrand afin de l'aider dans sa démarche d'accréditation ;
- la souche de référence CIP107629 a été envoyée au CNR de Bruxelles

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

En 2017, 40 ADN étalon et 13 contrôles quantitatifs (raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement par le CNR à 16 laboratoires environnementaux dont 7 laboratoires à l'étranger (Belgique, Irlande, Canada, USA, Allemagne, Italie et Espagne).

En parallèle, l'ADN étalon et les contrôles quantitatifs sont distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, uniquement dans des laboratoires à l'étranger.

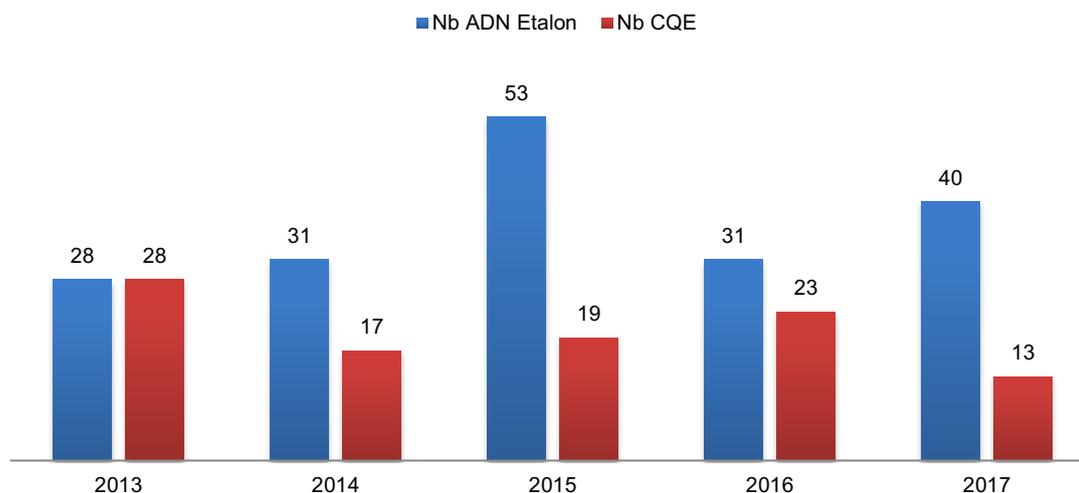


Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2017

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 2017 et son évolution depuis 2013.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2013-2017

Nombre de prélèvements ou souches	2013	2014	2015	2016	2017
EXPERTISE					
Expertise microbiologique					
Sérologie (IF)	1526	1393	1109	944	842
Culture de prélèvements cliniques	386	329	391	362	451
PCR sur prélèvements cliniques	193	236	309	284	254*
Co-culture de prélèvements pulmonaires	304	262	252	177	253
Expertise antigènes urinaires	16	27	41	55	110
Identification de souches cliniques**	323	340	346	300	377
Expertise souches environnementales	489	458	515	445	462
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	8	11	9	4	2
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	5	3	3	3	6
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	-	7	5	7	8
Développement et validation de tests diagnostiques (nombre d'échantillons ou de souches testé(s))					
Antigènes urinaires	378	100	250	440	249
Eaux chaudes sanitaires	-	-	-	-	125
Prélèvements pulmonaires					100

SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	51	46	64	74	65
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE PCR Lp1	575	480	604	510	607***
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	140	143	223	166	115
Isolats <i>Legionella</i> analysés en SBT	401	382	429	352	440****
Isolats <i>Legionella</i> (Lp1) analysés à l'aide de mAbs	581	502	584	448	491
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS			114	228	366

* 175 PCR *L. pneumophila* - *L. non pneumophila* (Diagenode) et 79 *L. pneumophila* - *L. pneumophila* séro groupe 1 (PCR européenne ESGLI).

** 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 2017 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2017.

*** 379 isolats cliniques (dont doublons) et 228 isolats environnementaux.

**** 244 STs ont été obtenus ou confirmés par WGS

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 2016 (+19,7%) et reflète l'augmentation de l'incidence en 2017 (Figure 2). Le nombre de prélèvements qui nous ont été adressés pour PCR est stable par rapport à l'année 2016.

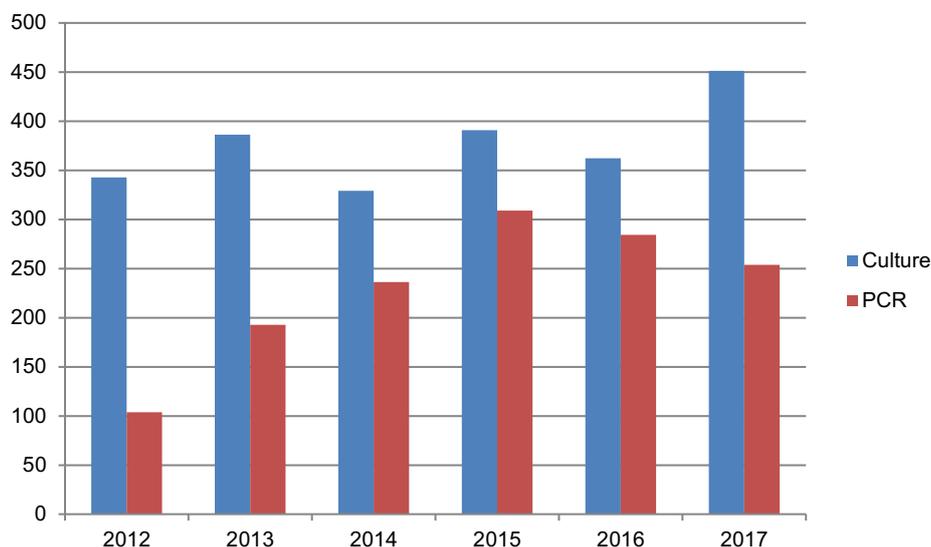


Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2012-2017

• Culture

En 2017, 451 prélèvements pulmonaires (patients avec antigène urinaire positif ou PCR positive) ont été mis en culture sur milieux gélosés selon la technique conventionnelle. La culture s'est révélée positive pour 161 prélèvements, soit 35,7% des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*), mise en œuvre sur les

prélèvements présentant une culture négative, a permis d'isoler 8 souches additionnelles. Au total, des légionelles ont été isolées pour 169 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, soit 37,5% des prélèvements. **Ces taux sont stables par rapport à 2016.** Ils sont faibles mais il peut s'agir de prélèvements pour lesquels la culture a déjà été tentée par les laboratoires expéditeurs. Enfin, ces données montrent que le CNR isole près de la moitié des souches disponibles au niveau national.

- **PCR**

Les PCR sont réalisées en première intention chez les patients présentant un tableau clinique évocateur de légionellose mais une antigénurie négative. Parmi les 175 PCR *Legionella* réalisées (kit commercial Diagénode), 44 ont été positives permettant de poser le diagnostic de 23 légionelloses à *L. pneumophila* et 11 à *L. non pneumophila*. Ce nombre est stable par rapport à 2016 – respectivement 23 et 15).

Une PCR spécifique du séro groupe 1 (Lp1) est réalisée depuis 2014 sur l'ensemble des PCR positives pour l'espèce *L. pneumophila* afin de préciser la prévalence des cas de *L. pneumophila* séro groupe non 1.

Enfin, une PCR ciblant l'espace intergénique 23S – 5S est réalisée sur l'ensemble des PCR positives pour *Legionella non pneumophila* afin d'identifier précisément l'espèce en cause ; en 2017, cette PCR a permis de caractériser plus précisément seulement un cas de légionellose à *L. maceachernii*.

2.5.2.2. Expertise de prélèvements urinaires

En 2017, 110 urines (provenant de 91 patients) testées avec différents kits par les laboratoires expéditeurs ont été analysées pour confirmation de résultats, dans différents contextes :

- le résultat observé dans le laboratoire expéditeur était faiblement positif ;
- le laboratoire expéditeur observait une discordance entre deux résultats, 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.

Fait marquant en 2017 : le nombre d'urines expertisées par le CNR a doublé.

Une majorité d'urines nous a été adressée pour :

- confirmation de résultats face à une **discordance entre le test immunochromatographique BinaxNOW® (Alere) lu à l'œil et le résultat rendu par le lecteur** (40% des cas) ; il en ressort un défaut de spécificité (résolu par un chauffage systématique des urines donnant un résultat positif) parallèle à une augmentation de sensibilité liée au lecteur ; quelques cas restant positifs après chauffage n'ont pu être ni confirmés ni infirmés par une autre technique au CNR ;
- **suspicion d'un résultat faussement positif avec de nouveaux tests utilisés par nos correspondants**, notamment le test Monlab distribué par Orgentec (20% des cas); plusieurs résultats n'ont pu être confirmés et une étude est en cours au CNR afin d'évaluer les performances de ce test (cf paragraphe 2.2.2).

2.5.2.3. Expertise pour sérologie

En 2017, le CNR a été sollicité pour l'expertise de **842 sérologies** par technique d'immunofluorescence. Comme ces dernières années, le nombre de sérologie est en diminution, sa place dans le diagnostic de légionellose étant très limitée. Il s'agit majoritairement de vérification de sérologies positives obtenues par des méthodes de criblage (majoritairement ELISA ciblant *L. pneumophila* séro groupe 1 à 7) afin d'être en adéquation avec les critères de définition de cas, ou encore de confirmation de titres obtenus par IF par le laboratoire expéditeur.

A noter en 2017, **une épidémie de fièvre de Pontiac** dans une usine belge, située près de la frontière, impliquant un certain nombre de cas français (cf paragraphe 4.2). Dans cette épidémie, la sérologie a pris une place importante dans le diagnostic, les antigènes urinaires des patients étant négatifs et les patients « non sécréteurs » ne permettant pas d'avoir à disposition des prélèvements respiratoires. De plus, le CNR dispose de techniques de sérologie permettant de cibler tous les sérogroupes de *L. pneumophila* et également d'autres espèces de légionelles (*L. anisa*, *L. longbeachae*, etc). Le diagnostic de la fièvre de Pontiac n'a pu être réalisé que grâce à la disponibilité d'une sérologie *L. micdadei*.

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
- 2 mois pour une sérologie.

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 Zépher, 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 a participé à un projet collaboratif avec un laboratoire de bioinformatique (LBBE) financé par la FRM dont un des objectifs était le transfert de connaissance du laboratoire de bioinformatique vers le laboratoire de biologie. Cette collaboration a été très bénéfique pour le

développement de scripts et de pipelines maison, l'installation et l'utilisation d'outils open source.

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, seaview, Chewbbaca...). 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 analyse 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 standards.

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. L'ensemble devrait être opérationnel en Août 2018.

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, 122 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 244 souches ont été séquencées. La sélection est essentiellement basée sur la disponibilité des appareils de la plateforme (un séquenceur supplémentaire Miseq a été acquis au cours de l'année 2017) 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).

Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (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.

3. Activités de surveillance

Éléments clés en 2017 :

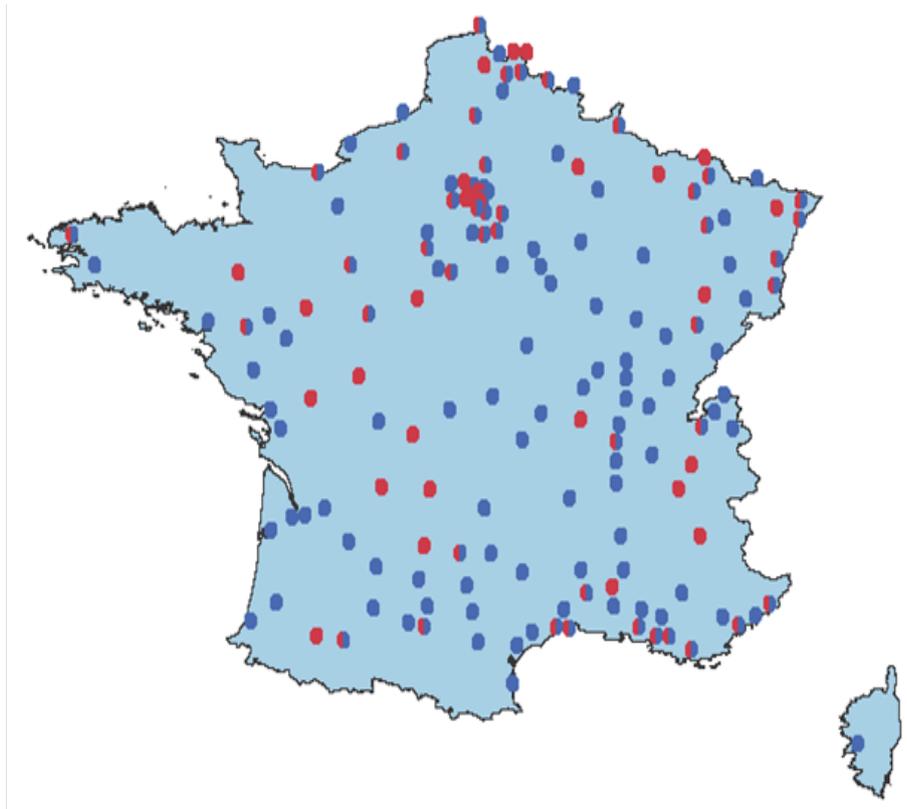
- augmentation (+34%) du nombre de cas notifiés à Santé publique France : 1630 *versus* 1218 cas en 2016 ;
- augmentation (+19%) du nombre de souches cliniques identifiées et typées par le CNR ;
- Moins de 5% de l'ensemble des cas de légionellose déclarés en 2017 a fait l'objet d'investigations microbiologiques à la recherche de la source de contamination ;
- Mais plus de 76 % des investigations se sont révélées positives ;
- Analyse de 366 isolats de Lp1 en WGS : 122 dans le cadre d'investigation et 244 à des fins de surveillance ;
- Investigation du 1^{er} épisode de fièvre de Pontiac en France
- mise en cause de l'eau de cuvettes de WC comme source de contamination à l'hôpital à l'aide de l'investigation épidémiologique et du typage par WGS.

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 2017, **94 partenaires** nous ont envoyé **186 souches cliniques**. Ces souches représentent la moitié des isolats cliniques isolées en France en 2017 ; L'autre moitié ayant été isolée au CNR. La majorité des laboratoires envoyant ces souches sont des centres hospitaliers, 2 sont des sous-traitants et seulement 2 sont des laboratoires hors institution (hors centre hospitalier ou clinique).

En parallèle, **171 partenaires** nous ont envoyés **451 prélèvements respiratoires** pour mise en culture (diagnostic déjà réalisé par antigénurie et/ou PCR). Parmi eux, nous recensons 143 laboratoires de centres hospitaliers, 1 sous-traitant et 27 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 envoient à la fois des souches cliniques et des prélèvements respiratoires lorsque la culture dans leur laboratoire est en échec, respectant ainsi nos recommandations.



Sources : données CNR 2017 – QGIS©3.0

Légendes :

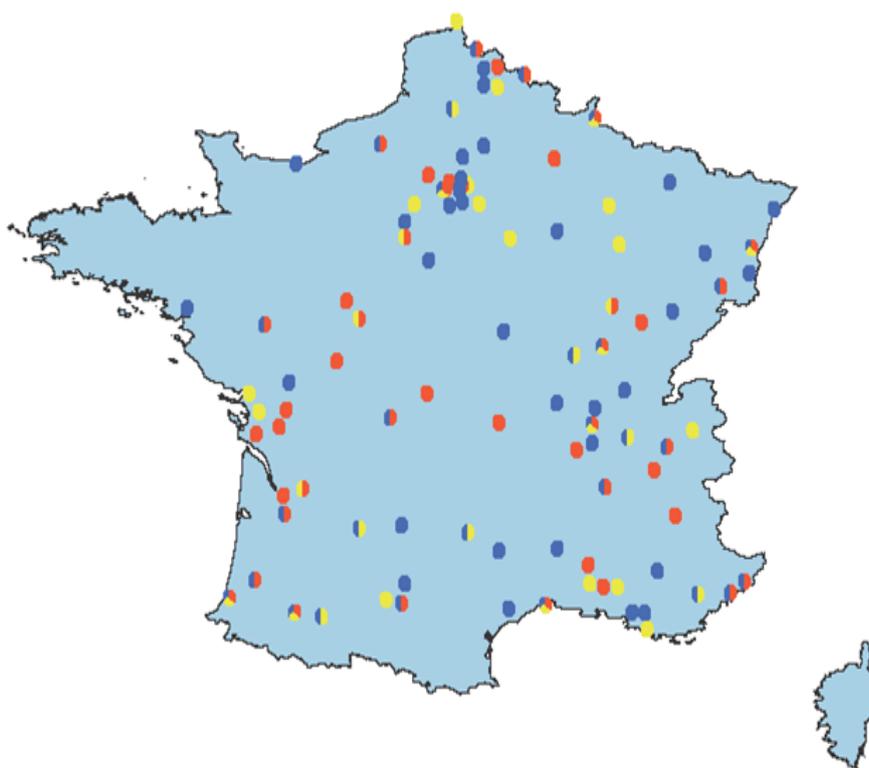
- Souches cliniques
- Prélèvement respiratoire pour mise en culture

Figure 3. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins une souche clinique ou au moins un prélèvement respiratoire pour mise en culture.

Le CNR est également sollicité pour aide au diagnostic de legionellose (**Figure 4**).

En 2017, **71 partenaires** nous ont envoyé des **prélèvements respiratoires pour diagnostic** (antigénurie négative ou non réalisée). 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, **43 partenaires** nous ont envoyés des **prélèvements d'urines** pour expertise et **53 partenaires** nous ont fait parvenir des sérums pour **diagnostic sérologique**.



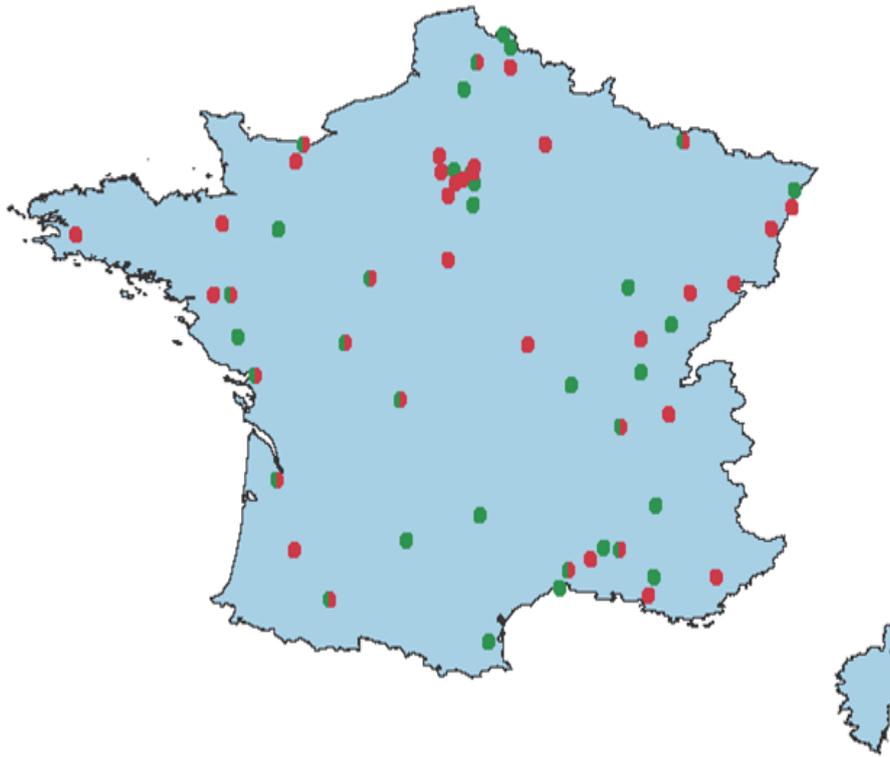
Sources : données CNR 2017 – QGIS®3.0

Légendes :

- Prélèvement respiratoire pour diagnostic
- Prélèvement d'urine pour expertise
- Sérologie

Figure 4. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins un prélèvement pour diagnostic et/ou expertise.

Par ailleurs, le CNR reçoit des **souches environnementales** pour identification ou dans le cadre d'investigation de cas pour comparaison avec la souche clinique du patient (**Figure 5**). En 2017, 35 partenaires nous ont envoyés des souches environnementales pour identification et 45 partenaires nous ont envoyés des souches environnementales pour comparaison avec une souche clinique.



Sources : données CNR 2017 – QGIS@3.0

Légendes :

- Souche environnementales pour identification
- Souche environnementales pour comparaison

Figure 5. Villes partenaires ayant envoyées en 2017 au moins une souche environnementale.

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 2017, **1 630 cas de légionellose** ont été notifiés en France. Parmi eux, 9 cas étaient des résidents des DOM et 32 étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine était de **2,4/100 000 habitants**. Le nombre de cas notifiés en 2017 était largement supérieur à celui de 2016 où 1218 cas avaient été notifiés (incidence de 1,8/100 000 habitants) et également supérieurs à ceux de 2005 (1527 cas) et 2010 (1540) (**Figure 6**).

Les caractéristiques des patients (âge / sexe) n'a pas évolué par rapport aux années précédentes.

3.2.2. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR

Parmi les 1630 cas de légionellose notifiés en 2017, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 377 cas soit 23,1% des cas. Ce pourcentage est comparable à celui des années précédentes (**Figure 8**).

Une souche additionnelle de *L. bozemanii* a été isolée chez une patiente présentant une fièvre de Pontiac (cf paragraphe 4.2).

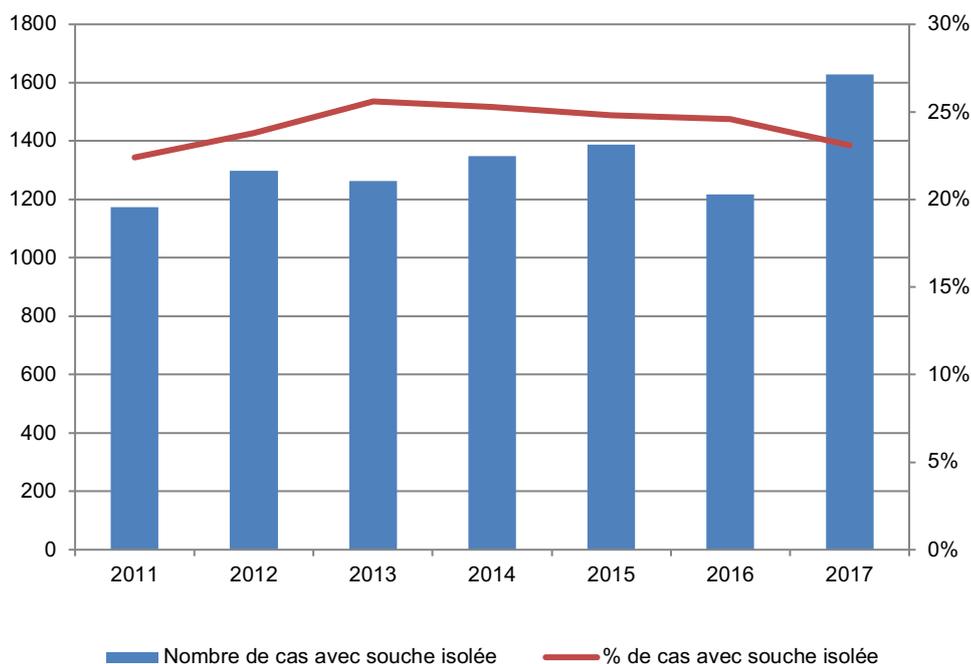
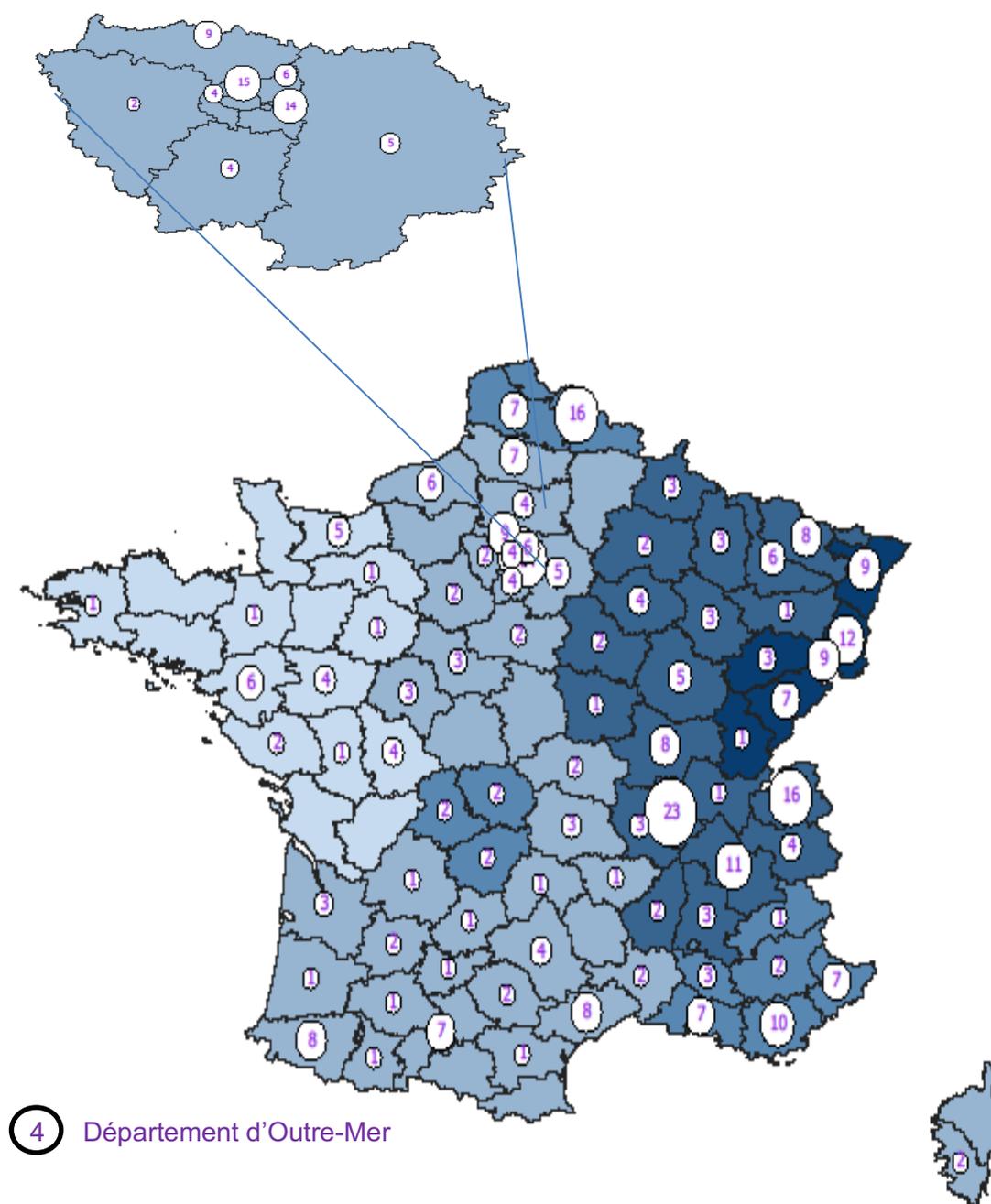


Figure 8. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2017.

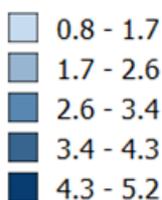
Le nombre de souches disponibles par région superposé à l'incidence de l'infection ou au nombre de cas déclarés est représenté Figure 9 et 10.



Sources : données CNR et Santé Publique France 2017 – QGIS®3.0

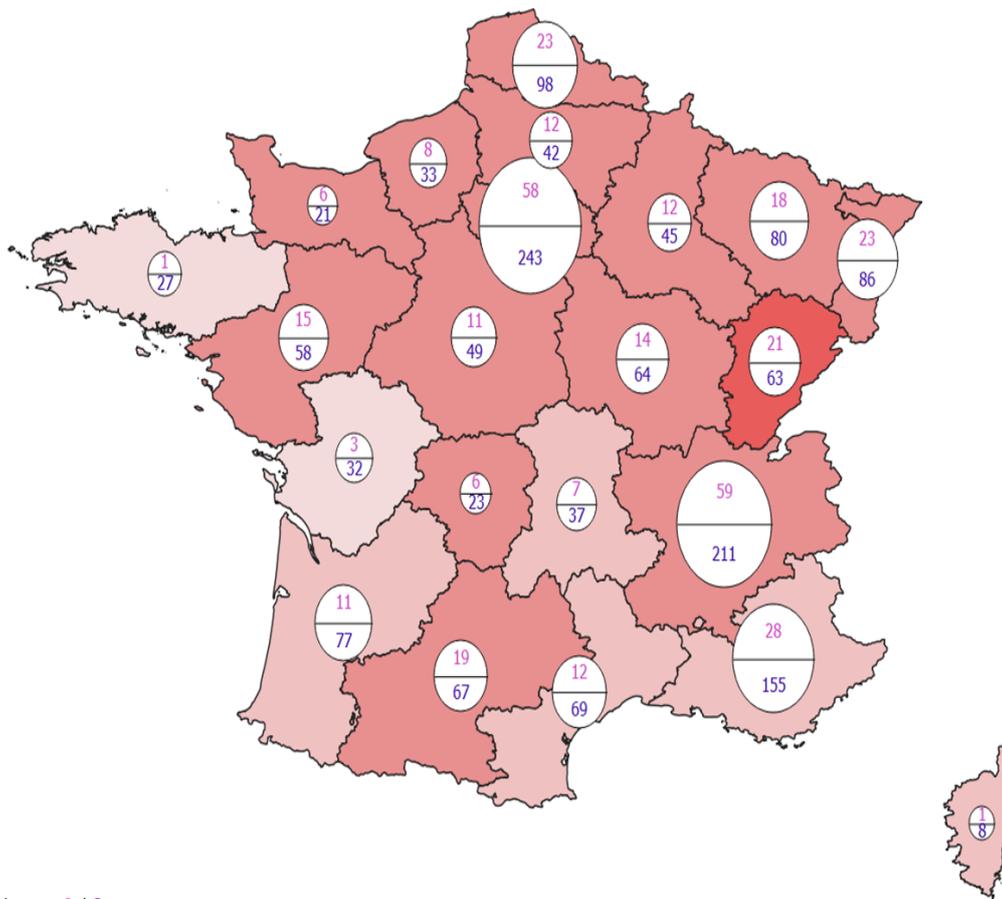
Légendes :

Incidence de déclaration 2017 par département (pour 100.000 habitants)



Chiffre : nombre de souches par département d'origine de la souche ou du prélèvement

Figure 9. Origine des souches reçues ou isolées en 2017 superposée à l'incidence de la déclaration par région (en fonction du lieu du laboratoire d'envoi)



Martinique : 0 / 2
 Ile de la réunion : 6 / 3
 Guadeloupe : 0 / 1
 Ressortissant étranger : 6 / 32

Sources : données CNR et Santé Publique France 2017 – QGIS@3.0

Légendes :

Rapport nombre de souches isolées / nombre de cas déclarés

- 0.040 - 0.100
- 0.100 - 0.200
- 0.200 - 0.300
- 0.300 - 0.330

59

 211
 nombre de souches / nombre de cas déclarés

Figure 10. Répartition par région (en fonction du lieu de résidence du patient) des souches isolées, rapporté au nombre de cas déclarés

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 monoclonaux (issus du CNR de Dresden) pour caractériser leur sérotype. Les souches de *L. 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 378 souches isolées, la majorité (373, soit 98,9%) était des *L. pneumophila* et 361 (95,8%) appartenaient au sérotype 1 (Lp1) (**Tableau 2**).

Tableau 2. Répartition en terme d'espèces de *Legionella* et de sérogroupes de *L. pneumophila* des souches d'origine clinique isolées en France, 2011 – 2017.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements						
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
<i>Legionella pneumophila</i>	259	304	321	333	342	296	373
séro groupe 1	248	294	305	313	328	281	361
séro groupe 2		2	2	3			1
séro groupe 3	2	6	9	6	3	1	5
séro groupe 4	4					1	
séro groupe 5	2		2	1	1		
séro groupe 6		1	2	2	4	6	2
séro groupe 7	2		1	2	3	1	1
séro groupe 8	1	1		2		1	1
séro groupe 10				3	1	3	
séro groupe 12							1
séro groupe 13						1	
séro groupe 14							
séro groupe indéterminé				1	2	1	1*
<i>Legionella non pneumophila</i>	4	3	2	7	4	4	5
<i>Legionella dumoffii</i>		1	1				1
<i>Legionella micdadei</i>	1			1		2	
<i>Legionella longbeachae</i>	1	1	1	5	2		
<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 cincinatiensis</i>							
<i>Legionella wadsworthii</i>							
<i>Legionella sainthelensis</i>							
<i>Legionella maceachernii</i>						1	
Total	263	307	323	340	346	300	378

* réaction croisée entre sérogroupes 3 et 6 en immunofluorescence directe

** fièvre de Pontiac

3.2.2.2. Typage phénotypique et moléculaire

• Sous-groupage des souches *L. pneumophila* séro groupe 1

Toutes les souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 d'origine clinique reçues au CNR des Légionelles sont systématiquement typées par utilisation d'anticorps monoclonaux (mAbs).

En 2017, 274 des 361 souches de Lp1 ont été analysées par sous-groupage. La répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* séro groupe 1 d'origine clinique montre une proportion importante (81,8%) et constante dans le temps des sous-groupes réagissant avec l'Ac mAb3/1 : France/Allentown, Knoxville et Philadelphia (**Figure 11**).

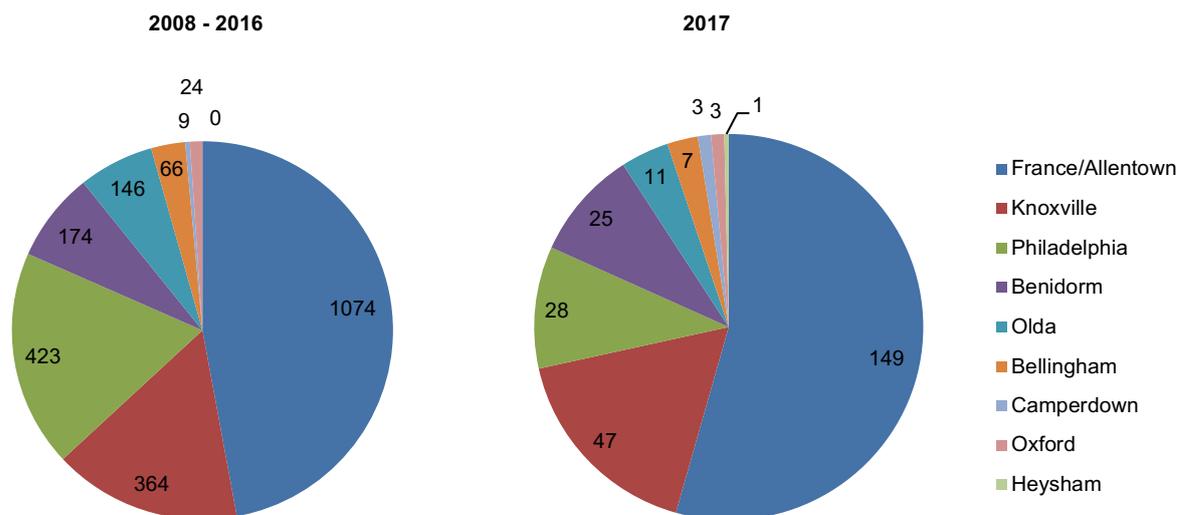


Figure 11. Répartition des différents sous-groupes de *L. pneumophila* sérotype 1 parmi les 2280 souches d'origine clinique isolées entre 2008 et 2016 et parmi les 274 souches d'origine clinique analysées en 2017.

En raison du pouvoir faiblement discriminant de la technique (9 sous-groupes) et du nombre exponentiel de souches analysées par WGS, **cette technique a été abandonnée en routine depuis octobre 2017**. Une PCR spécifique du gène codant l'Ac reconnu par les mAb3/1 (gène *lag*) est par ailleurs disponible au CNR.

• PFGE

Toutes les souches de *L. pneumophila* et de *L. non pneumophila* d'origine clinique reçues au CNR des Légionelles sont systématiquement typées par analyse des profils de macrorestriction de l'ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis* ou PFGE).

L'analyse systématique par PFGE des souches d'origine clinique depuis plus de 15 ans montre une diminution chaque année de la proportion de souches sporadiques (profil PFGE non connu dans notre base de données) par rapport à l'ensemble des souches analysées. Cette diminution est liée en grande part à l'incrémentation de notre base de données.

La caractérisation du caractère « sporadique » d'une souche est exacte au moment de l'analyse et de la comparaison à la base de données, mais évolue au cours du temps du fait de l'analyse des souches suivantes. Il est donc extrêmement difficile de mettre à jour ces données. La méthode PFGE a surtout une grande utilité lors des investigations de cas en raison d'un fort pouvoir discriminant, supérieur à celui du typage par *Sequence-Based Typing* (SBT). Un meilleur pouvoir discriminant est obtenu maintenant avec le séquençage de génome entier notamment en cas de profil identique en PFGE entre deux souches. La méthode PFGE est encore utile pour « screener » les souches à analyser en WGS. Un des objectifs est de développer d'autres outils de « screening » peu cher et peu consommateur de temps. La PCR ST1 que nous développons au niveau européen en est un des exemples (paragraphe 6.1.2). L'utilisation de la Maldi Tof comme outils de typage pourrait être un autre moyen (voir ePoster ECCMID 2017).

Parmi les 361 Lp1, 105 (29,1%) étaient des souches endémiques, parmi lesquelles 40 souches Louisa (11,1%), 27 souches Paris (7,5%), 22 souches Lorraine (6,1%), 15 souches Biarritz (4,2%) et 1 souche profil Mondial (0,3%). Parmi les autres souches, nous avons identifié 153 souches avec un profil déjà répertorié dans notre base de données (42,4%), 63 souches sporadiques (17,4%) et 40 souches de différents pulsotypes (A à K) (11,1%) (**Figure 12**).

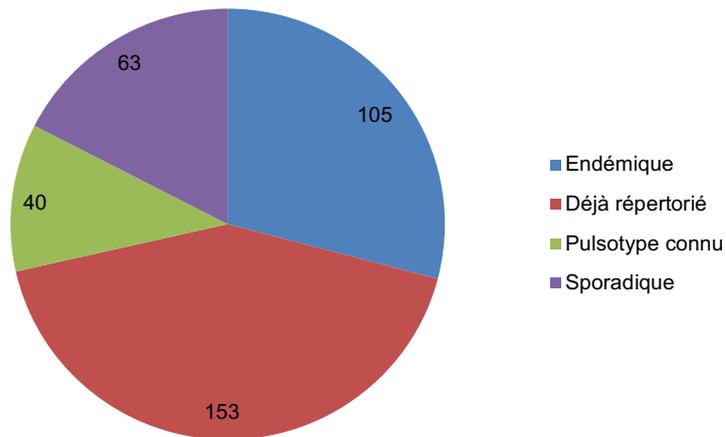


Figure 12. Répartition des différents profils de *L. pneumophila* séro groupe 1 en PFGE parmi les 361 souches d'origine clinique analysées en 2017.

- **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 2017, parmi l'ensemble des 440 isolats cliniques et environnementaux analysés, 244 ont été obtenus ou confirmés par WGS. L'ensemble des Lp1 analysées appartenait à 93 *Sequence Type* (ST) différents. Les ST les plus fréquemment retrouvés sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3. Nombre de souches appartenant aux 18 STs les plus représentés parmi les souches cliniques isolées entre 2008 et 2017.

ST	Années										TOTAL	%
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017		
23	39	39	53	55	50	55	55	68	41	67	522	18%
1	19	24	24	17	25	29	27	41	23	36	265	9%
47	23	15	31	29	27	26	17	20	15	24	227	8%
62	5	12	13	17	12	18	15	15	14	13	134	5%
146	6	14	14	5	11	17	5	17	12	8	109	4%
259	3	2	14	2	16	8	18	10	7	18	98	3%
20	7	10	8	8	8	7	12	9	9	10	88	3%
40	5	10	10	3	6	8	11	11	7	15	86	3%
82	6	3	9	16	9	7	8	7	1	9	75	3%
42	1	3	4	4	8	10	5	12	11	5	63	2%
701	0	6	4	4	6	7	11	6	11	8	63	2%
9	5	1	4	3	11	3	5	7	8	11	58	2%
48	2	5	2	8	3	3	5	7	5	9	49	2%
444	4	2	3	5	6	4	12	3	5	3	47	2%
94	3	3	7	0	7	9	8	2	2	6	47	2%
96	2	3	5	4	5	4	0	4	4	8	39	1%
224	2	1	4	2	3	3	3	4	8	8	38	1%
107	11	3	3	0	2	5	1	5	3	2	35	1%
44	1	3	3	3	4	4	3	6	2	3	32	1%
75	4	2	0	4	4	3	5	5	1	4	32	1%
37	3	0	0	2	1	2	10	4	7	2	31	1%
65	4	0	2	2	3	3	6	5	2	3	30	1%
435	4	1	5	2	2	4	4	1	3	2	28	1%
Autre	47	46	53	56	71	73	70	84	98	104	702	24%
TOTAL	206	208	275	251	300	312	316	353	299	378	2898	100%

Plus de la moitié des souches appartiennent à 9 ST ; l'évolution de ces ST au cours des 10 dernières années est représentée en Figure 13.

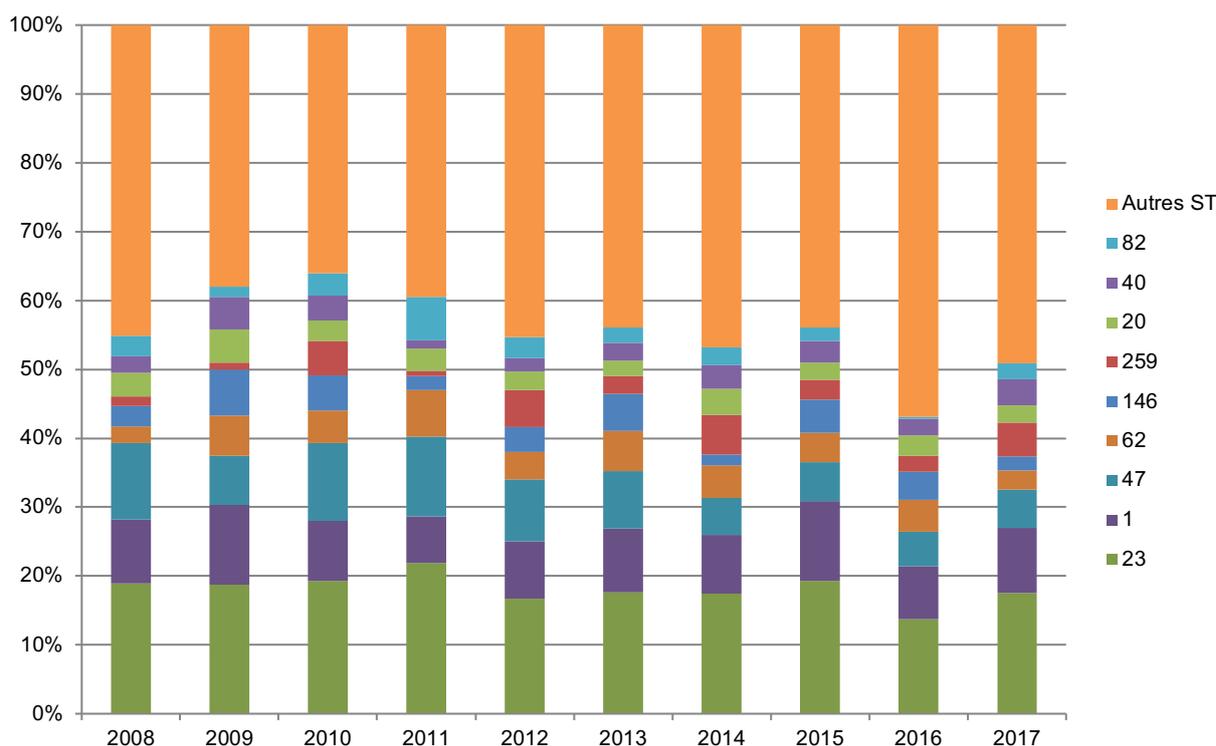


Figure 13. Evolution de la distribution des 9 principaux ST associés à l'infection en France de 2008 à 2017.

En 2017, on note une proportion élevée de souches de ST259, en lien avec une surincidence de cas de ST 259 dans la région d'Aurillac (cf paragraphe 3.4.1). En dehors de la France, ce ST a été identifié principalement aux Etats-Unis. Il a été montré récemment que ce ST appartient à une nouvelle sous espèce de *L. pneumophila* : *L. pneumophila* subspecies *raphaeli* (Kozak-Muiznieks NA, *et al.* Infect Genet Evol. 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 a été très utile pour discriminer des isolats ST1 ce qui est impossible par les autres méthodes disponibles. Ainsi l'investigation de légionelloses à Lp1 ST1 a permis par l'analyse phylogénique des données de NGS de confirmer la source de contamination pour un patient à son domicile, d'identifier une nouvelle source de contamination importante pour les patients immunodéprimés à l'hôpital (la cuvette des toilettes pour un ou deux cas nosocomiaux), et la persistance d'une source à l'hôpital ayant entraîné plusieurs cas nosocomiaux (dont 4 avec souches isolées) depuis 2009.

Dans le contexte de surveillance 244 isolats ont été analysés en NGS. De ces analyses ont été extrait le *Sequence Type*. Les données des séquences seront ré-analysées à la lumière de la méthode de cgMLST standardisé au niveau international qui sera disponible en août 2018.

- **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 2017, 115 prélèvements ont été analysés par cette technique. Nous avons obtenu un « Sequence Type » (ST) pour 13 prélèvements. Pour 37 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié. Une absence d'amplification a été observée pour 65 prélèvements analysés (56,5%) (**Tableau 4**).

Jusqu'en mai 2017, cette technique était utilisée au CNR sur tous les prélèvements de légionellose confirmée reçus au CNR pour lesquels la culture était négative. Cette technique présentant de faibles performances, elle n'est à présent réalisée que :

- sur les prélèvements montrant une PCR spécifique Lp1 positive ;
- sur les prélèvements adressés au CNR dans le cadre d'une investigation épidémiologique pour lesquels l'identification de la source de contamination est importante.

Tableau 4. Synthèse des résultats obtenus par la technique de Nested-SBT sur prélèvements pulmonaires.

Année	Nombres de gènes pour lesquels un résultat est disponible								Nombre total de prélèvements
	7 (%)	6	5	4	3	2	1	0 (%)	
2012	16 (14,3)	6	6	2	8	4	20	50 (44,6)	112
2013	16 (11,4)	6	4	5	7	11	11	80 (57,1)	140
2014	15 (10,5)	5	5	6	4	6	18	84 (58,7)	143
2015	11 (4,9)	13	13	11	10	19	36	110(49,3)	223
2016	10 (6,0)	6	4	8	7	10	13	108 (65,1)	166
2017	13 (11,3)	4	1	5	6	5	16	65 (56,5)	115

3.2.3. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR

En 2017, 392 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. Le CNR est notamment sollicité en cas de défaut ou de limite des réactifs d'agglutination ne permettant pas aux laboratoires environnementaux de conclure sur l'espèce ou le séro groupe précis de la souche de *Legionella*.

Parmi les 392 souches analysées, 343 (87,5%) étaient des *Legionella pneumophila* ; la répartition des séro groupes est présentée en Figure 14.

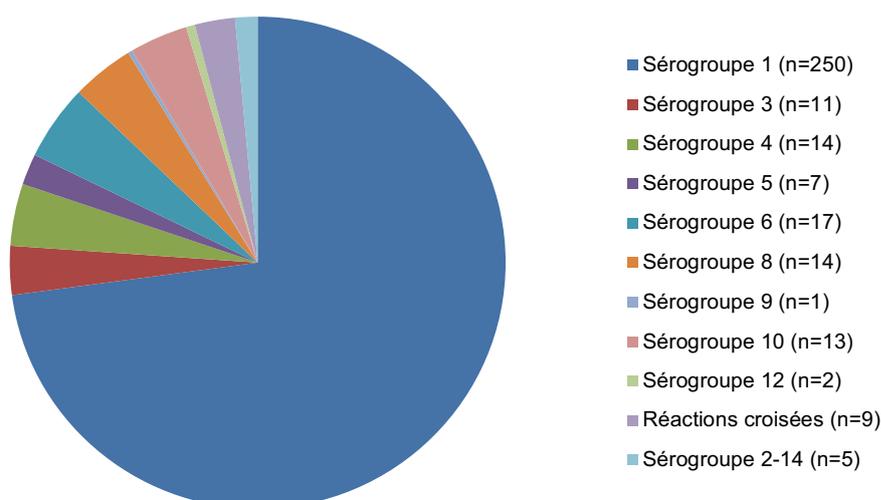


Figure 14. Distribution en termes de séro groupe des souches de *Legionella pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2017.

L'identification des 49 souches d'origine environnementale (12,5%) 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 15.

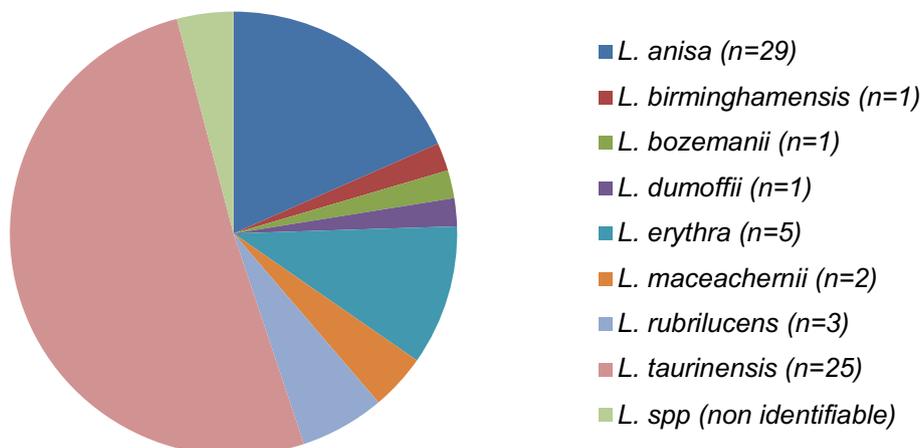


Figure 15. Distribution en termes d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila* d'origine environnementale adressées au CNR en 2017.

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 proposées, 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.

Néanmoins, l'utilisation d'un milieu en charbon (nécessaire pour obtenir une croissance de la souche) est sujette à débat car il 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 réalisés sur (i) 109 souches cliniques de la collection du CNR caractérisées sur la base de données cliniques et génomiques (WGS) et (ii) sur 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) (cf. paragraphe 6.2).

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 ; cf paragraphe 6.2);
- 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) (travaux menés en 2012);
- mutations dans le gène codant la sous-unité de l'ARN polymérase N (*rpoB*) (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 ciblée sur les gènes mutés en cas de résistance aux trois familles thérapeutiques (*rplD*, *rplV*, *rrl*, *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 2017, le CNR a répondu à 8 demandes d'antibiogrammes pour des souches cliniques isolées chez 7 patients ayant évolué défavorablement sous antibiothérapie. Il s'agissait de souches isolées après 10 jours à 6 semaines d'antibiothérapie ; nous disposions de la souche isolée au moment du diagnostic pour un seul patient.

La sensibilité de *Legionella* aux antibiotiques a été évaluée par réalisation d'un antibiogramme en microdilution. Comme pour les années précédentes, aucune résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones, à la rifampicine ou aux tétracyclines n'a été détectée phénotypiquement, 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 et incite ses correspondants à l'envoi de prélèvement en cas de suspicion. Du fait d'un faible nombre de demandes, 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 2017, **645 courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF. Ce chiffre est en augmentation par rapport à 2016 et en adéquation avec le nombre de cas diagnostiqué (496 courriers en 2014, 682 courriers en 2015, 493 en 2016). 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, de 1 à 5 contacts quotidiens sont réalisés par ce moyen.

- **Analyses communes**

Forte proportion de cas lié à la souche Lp1 ST259 à Aurillac.

La situation sur les cas de légionellose recensés à Aurillac entre 2008 et juin 2017 (réalisée par l'ARS et la CIRE Auvergne Rhone Alpes - participation de SpF et du CNR) montre que 22 cas de légionellose ont été diagnostiqués à Aurillac. Parmi les cas pour lesquels une souche a été isolée (n=12), 9 (75 %) présentaient le même profil (Pulsotype F, ST 259, sous-groupe Philadelphia). Les données du CNR montrent que cette souche est en augmentation en France mais ne représente que 2,7 % des souches isolées au niveau national. La survenue de trois cas groupés en 2012, 2015 et 2017, ajoutée à la forte proportion de cette souche en provenance d'Aurillac, peut suggérer qu'il existe une source commune localisée à Aurillac qui diffuserait de manière ponctuelle et épisodique des légionelles. Malgré les nombreuses investigations environnementales (Tars, laveurs d'air, compost industriel, réseaux d'eau), les prélèvements réalisés jusqu'à présent n'ont pas permis de mettre en évidence cette souche ST259 dans l'environnement. Cette souche appartient à la nouvelle sous espèce de *L. pneumophila* (sous-espèce *raphaeli*) décrite récemment (Kozak-Muiznieks NA, et al. Infect Genet Evol. 2018).

Investigation de l'épidémie de fièvre de Pontiac (paragraphe 4.2)

Investigation de l'épidémie de l'Hérault impliquant un cabinet de kinésithérapeute (paragraphe 4.2)

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

- **Expertise & envoi de données**

*Le CNR collabore au 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. Publication européenne de surveillance : *Beauté J. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. The European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Euro Surveill. 2017 Jul 6;22(27) (Investigateur)*

*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 du réseau EWGLI (www.ewgli.org). Au total, les données de 3338 souches françaises ont été renseignées sur le site sur un total de 12394 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.

***Expertise** sur une sérologie d'un patient de Malte, analysé en parallèle par le Danemark (Soren Uldum) et nous par ELISA et par notre méthode IFI. Résultat concordant entre nos deux laboratoires.

***Expertise de 32 sérums** de 16 patients Belges lors de l'épidémie de fièvre de Pontiac pour réaliser une sérologie spécifique *L. bozemanii* (non disponible au CNR de Belgique). Des séroconversions pour cette espèce ont été mises en évidence.

- Collaborations

*Développement d'une PCR spécifique des *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1 applicable directement sur prélèvements (cliniques et environnementaux) en collaboration avec plusieurs partenaires ESGLI (Israël et Anglais, et étendue à d'autres partenaires pour le versant environnemental (Belgique, Danemark et autres)

Ginevra C, Chastang C, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.

*Coordination avec Valeria Gaia (Suisse) et Soren Uldum (Danemark) d'une étude européenne sur l'évaluation des kits pour la détection des antigènes urinaires. Cette étude sera menée en 2017.

*Développement d'une PCR spécifique pour détecter le clone endémique ST47 de *L. pneumophila* en collaboration avec ESGLI

Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S; ESCMID Study Group for Legionella Clin Microbiol Infect. 2017 Apr;23(4):264. Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47.

- Collaborations

*Membre du comité scientifique du 9th international Conference on *Legionella*, 26 – 30 Septembre 2017, Rome, Italie

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

Parmi les 1630 cas de légionellose diagnostiqués en 2017 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2017), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **64 cas de légionellose**, soit **3,9 %** de l'ensemble des cas. Pour les 64 cas investigués, les profils génomiques des souches cliniques et environnementale(s) se sont révélés **identiques pour 49 cas (76%)**.

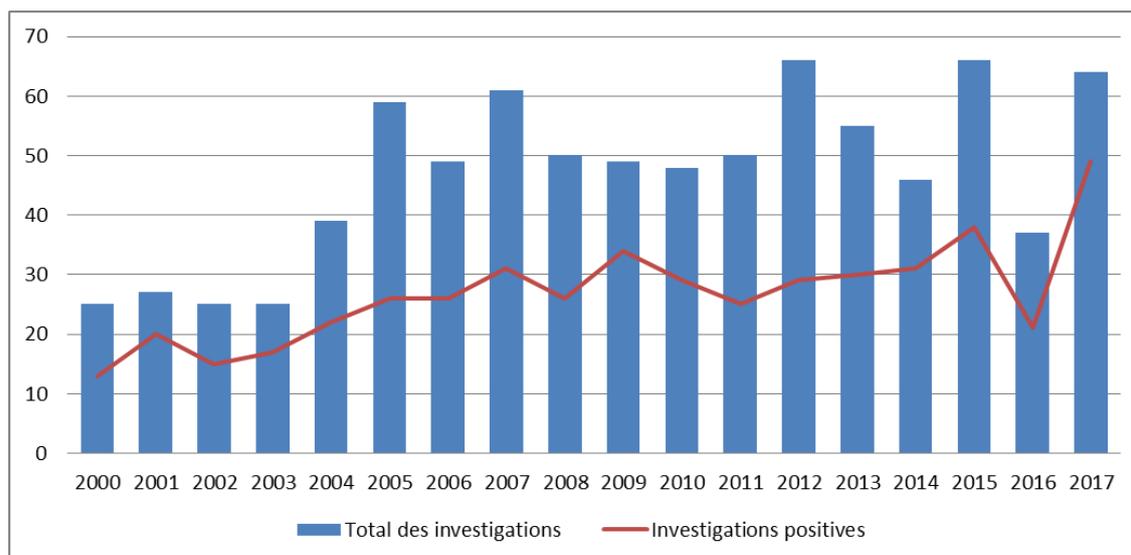


Figure 16. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2000.

Les souches environnementales comparées ont été isolées de réseaux d'eaux sanitaires appartenant à 10 hôpitaux, 5 EHPAD ou MR, 20 domiciles, 10 établissements de tourisme, 11 TARs et 4 autres établissements.

Parmi les 4 autres établissements, nous retrouvons un foyer de logement, un chantier de désamiantage et un logement de vacances. Le dernier établissement correspond à un cabinet de kinésithérapie ayant été la cause de cas groupés dans l'Hérault (cf paragraphe 4.2).

Pour les 64 cas de 2017, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination dans 9 établissements de santé, 5 EHPAD, 17 domiciles, 9 établissements de tourisme et 4 autres établissements publics (Tableau 5).

L'année 2017 se distingue par un **fort nombre d'investigations au domicile** des patients, et ces enquêtes se montrent très concluantes (85% de positivité).

Tableau 5. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2017

	Investigations positives		Investigations négatives		Investigations totales	
	N	%	N	N	%	
Hôpitaux	9	90%	1	10	15%	
EHPAD	5	100%	0	5	8%	
Domicile	17	85%	3	20	31%	
Tourisme	9	90%	1	10	15%	
Autre	9	100%	0	9	14%	
TAR	0	0%	11	11	17%	
TOTAL	49	75%	16	65	100%	

Parmi les investigations positives, 8 concernaient des souches Paris, 1 des souches Louisa, 1 des souches Lorraine et 4 des souches Biarritz. Ces profils dits endémiques ne permettent pas de conclure formellement au sujet de la source de contamination.

Tableau 6. Résultats des investigations réalisées en 2017 ayant permis d'identifier ou de suspecter la source de contamination selon le pulsotype.

	Profil des souches identique						Profil des souches différent		TOTAL
	Paris	Louisa	Lorraine	Biarritz	autre	total			
Domicile	3	0	0	3	11	17	3	20	
Tourisme	1	0	1	1	6	9	1	10	
Centre hospitalier	4	0	0	0	5	9	1	10	
EHPAD ou MR	0	0	0	0	5	5	0	5	
Autres	0	0	0	0	4	4	0	4	
TAR	0	0	0	0	0	0	11	11	
Cas groupés	0	1	0	0	4	5	0	5	
TOTAL	8	1	1	4	35	49	16	65	

Le nombre de TAR investigué est faible (11 cas en 2017) et diminue constamment ces dernières années ce qui est en accord avec les recommandations du guide de la Haute Autorité de Santé publique qui préconise de n'investiguer les TARs que dans un contexte de cas

groupés. De plus, aucune de ces enquêtes n'a permis d'identifier une TAR comme source de contamination en 2017.

Le nombre d'investigations est plus fort en 2017 en comparaison à 2016 du fait d'un nombre global plus important de cas notifié et d'investigations plus importantes en 2017 au domicile des patients et également d'établissements de tourisme.

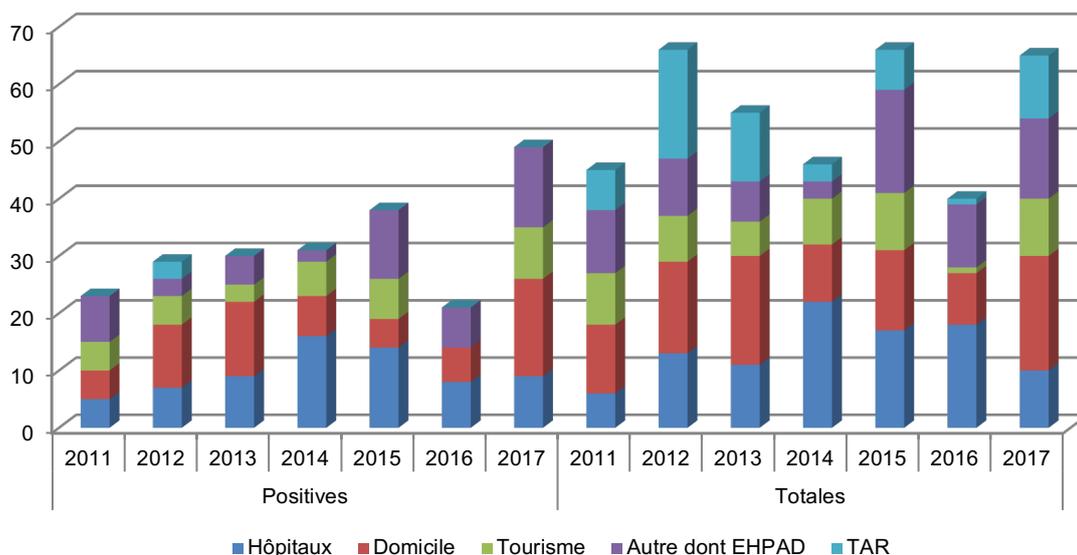


Figure 17. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2017 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête (Positives = enquête ayant permis d'identifier la source de contamination du patient).

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 2017

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 2017, le CNR a alerté Santé publique France suite à la découverte de souches de type Lorraine ST47 à Tourcoing dans un intervalle de temps court. L'enquête de l'ARS responsable de ce dossier n'a montré ni lien, ni source d'exposition commune pour les 2 patients.

- Alerte sur l'identification de souche ST259 à Aurillac (voir paragraphe 3.4.1)

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

• Cas groupés dans l'Hérault

L'ARS a déclaré une sur-incidence de cas de légionellose dans l'Hérault avec une première alerte suite à la déclaration de 4 cas entre le 21/12/2016 et le 01/01/2017, chez des personnes résidant dans le quartier Gambetta de Montpellier. Au total 18 cas relatifs à cette situation ont été retenus entre mi-décembre 2016 et juillet 2017. L'analyse des expositions potentielles des cas a montré que 8 cas (dont 5 survenus en juillet), faisaient partie de la patientèle d'un même cabinet de kinésithérapie, dont l'expert en génie climatique missionné par l'ARS pour intervenir dans le cabinet de kinésithérapie. Parmi les 8 cas, 4 ont eu des séances de balnéothérapie précédées et/ou suivies de douche et 3 n'en ont pas eu. L'expert a manipulé l'ensemble des

installations sans port d'équipement de protection individuelle. L'analyse des trajets urbains des dix autres cas atteints de légionellose mais n'ayant pas fréquenté le cabinet de kiné durant les 14 jours d'incubation possible de leur maladie relève pour 6 cas, un ou plusieurs passages hebdomadaires sur le cours Gambetta où se situe le cabinet. Les 4 autres cas ont fréquenté le quartier. Parmi les dix cas qui n'ont pas eu de soins dans le cabinet de kinésithérapie, un cas habite à l'étage supérieur du cabinet.

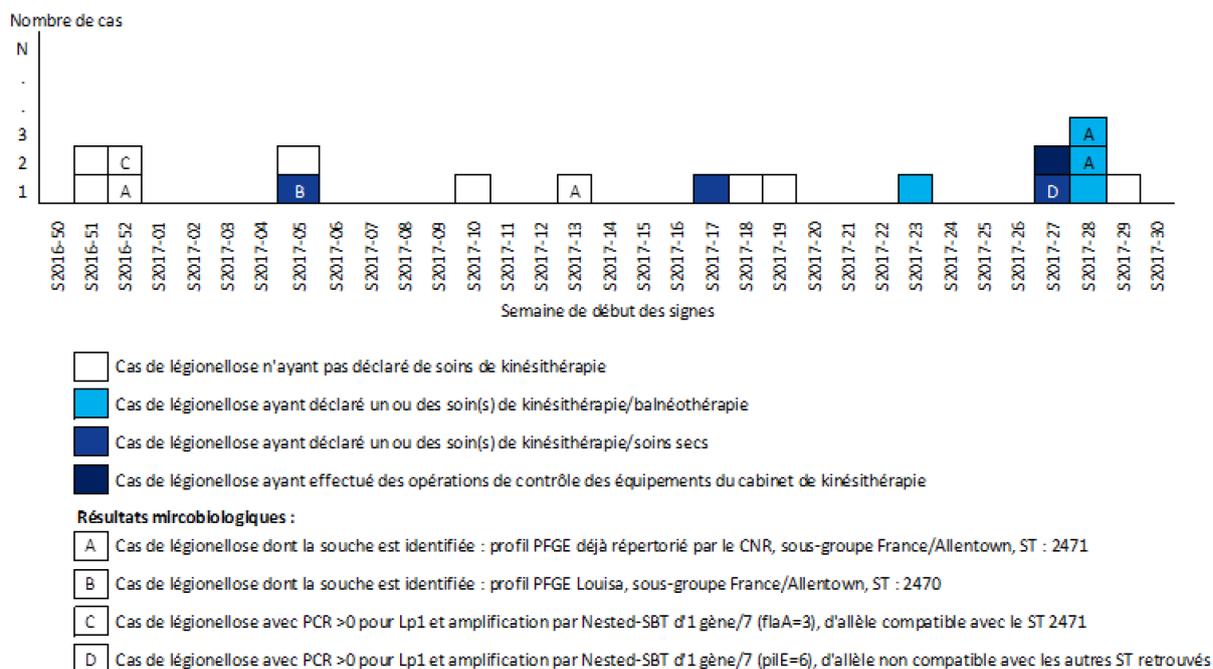


Figure 18. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction du début des signes cliniques

L'investigation du cabinet de kiné a mis en évidence des anomalies sur le réseau d'eau chaude sanitaire (températures insuffisantes), des désordres (fuites) autour des équipements de la piscine, et l'absence d'entretien d'une installation de pompe à chaleur air-air avec circuit d'eau secondaire et cassettes réfrigérantes, qui climatise et chauffe l'ensemble des locaux. L'arrêt de la pompe à chaleur a été demandé par l'ARS le 12 mai 2017 puis un arrêt complet des installations le 12 juillet 2017. De plus les investigations *in situ* ont permis de constater que la bouche d'extraction de la pompe à chaleur et l'aération du local technique du cabinet débouchaient sur la terrasse du patient domicilié dans l'immeuble. Ces constatations sont des arguments en faveur d'une source commune localisée dans le cabinet de kinésithérapie avec une exposition simultanée de la patientèle et des riverains et passants.

L'enquête environnementale a ainsi permis de confirmer le cabinet de kinésithérapie comme source d'infection avec des souches environnementales identiques à 5 souches cliniques disponibles. Pour un des patients, l'eau chaude sanitaire dans une résidence pour personnes âgées a pu être identifiée comme source de l'infection.

Ce cas groupé est atypique pour 2 raisons : (1) un centre de kinésithérapie est responsable de cas chez des personnes n'ayant pas fréquenté l'établissement ; (2) au niveau microbiologique deux souches étaient présentes au niveau de la source de contamination, les patients se sont contaminés par l'une ou par l'autre de ces deux souches (ce qui est rarement observé).

- Cas groupés nosocomiaux à Martigues

Une déclaration de 4 cas nosocomiaux de légionellose entre juin et octobre 2017 au CHU de Martigues a été faite par l'ARS. Cet établissement avait déjà fait l'objet d'une enquête pour 2 cas de légionellose en 2014 et un cas en 2009. La comparaison des souches cliniques avec des souches environnementales isolées dans deux services en 2017 ainsi que d'une souche isolée en 2009 a permis de montrer des souches identiques de type endémique Paris, ST1.

L'analyse par NGS a permis de confirmer le caractère nosocomial de ces 7 cas de légionellose diagnostiqués entre 2009 et 2017 ; les isolats appartiennent tous au même cluster et partagent le même ancêtre commun le plus récent. Des mesures correctives au niveau du réseau d'eau ont été mises en place.

- Suspicion de cas groupés de légionellose en Seine-Saint-Denis

Au cours du mois de juillet 2017, 11 cas de légionellose à *Legionella pneumophila* séro groupe 1 sont survenus chez des résidents du nord et du centre du département de la Seine-Saint-Denis. Cette augmentation marquée de cas n'était pas observée ailleurs en Ile-de-France et suggèrait une possible source commune de contamination environnementale localisée dans le département.

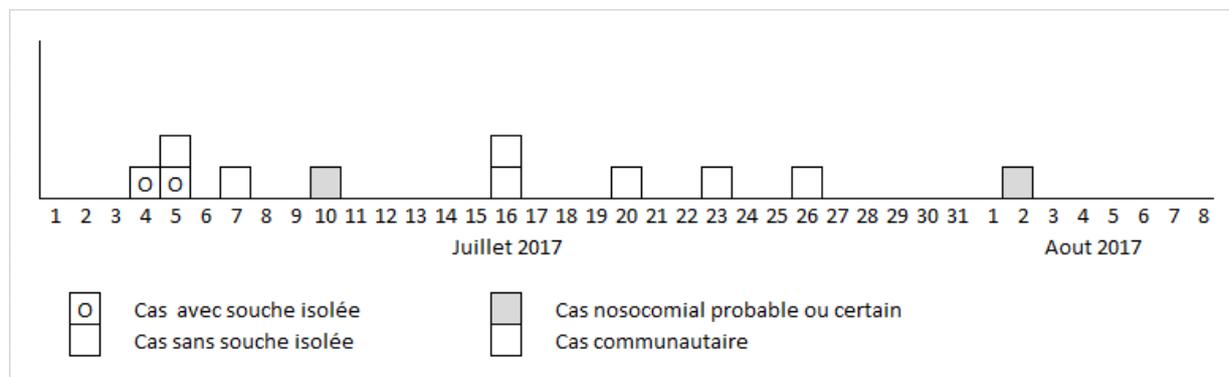


Figure 19. Courbe épidémique des cas de légionellose en fonction de la date de début des signes (n=11).

Sur ces 11 cas, 2 étaient des cas nosocomiaux probables ou certains. Le CNR a reçu 6 prélèvements ce qui a permis d'isoler 5 souches cliniques pour ces patients. Cependant aucune souche n'était identique, ce qui n'est pas en faveur d'une source commune de contamination. Une enquête environnementale sur des TARs environnantes a permis d'isoler des souches de *Legionella pneumophila* qui étaient également différentes de celles des patients. Au final, aucun lien épidémiologique entre les patients n'a pu être mis en évidence et aucune surincidence n'a été observée depuis.

- Suspicion d'épidémie de fièvre de Pontiac liée à une exposition environnementale des salariés de l'usine Clarebout Potatoes à Neuve Eglise (Belgique)

Epidémie de 127 cas de syndromes pseudogrippaux au sein de l'usine Clarebout Potatoes ayant touché 76 Français et 51 Belges. Le 26/07/2017, le service des urgences du CH Armentières signalait à l'ARS Hauts-de-France l'admission de 7 personnes présentant un syndrome pseudo-grippal avec altération de l'état général, asthénie, hyperthermie jusqu'à 41°C, douleurs abdominales et vomissements pour une personne. Les examens biologiques standards retrouvaient des marqueurs de syndrome inflammatoire (CRP >100, élévation de la PCT) associé à une perturbation de la NFS (hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles). Les radiographies thoraciques effectuées ne présentaient pas d'anomalie. Ces personnes avaient toutes pour point commun de travailler dans la section réception, tri, nettoyage des pommes de terre au sein de l'entreprise Clarebout Potatoes sur le site de Neuve Eglise (Nieuwkerk), situé à la frontière franco-belge en Belgique. L'entreprise emploie près de 90% de français. L'analyse des premiers éléments cliniques et épidémiologiques et d'exposition rapportés par les patients était compatible avec l'hypothèse d'une épidémie de fièvres de Pontiac. Le fait qu'aucun cas secondaire n'ait, à ce jour, été identifié dans l'entourage familial des cas survenus chez les salariés de l'usine, est en faveur d'une exposition environnementale des salariés à un agent non transmissible à durée d'incubation moyenne courte (24-48 heures), au sein de l'entreprise. La courbe basée sur la date de passage aux urgences (n=74) est marquée par un début très brusque le mercredi 26 juillet et une augmentation modérée sur les

2 jours suivants. Le pic atteint le jeudi 28 est suivi d'une baisse franche régulière sur les jours suivants. Les derniers cas ont été signalés le 3/08 (2 cas). La majorité des patients sont sortis après quelques heures d'observation et des prescriptions de traitements symptomatiques et antipyrétiques. Les recherches de virus grippaux, et antigénurie légionelle et pneumocoque sont toutes négatives. L'AVIQ (Belgique) a réalisé des prélèvements environnementaux, notamment sur le réseau d'eau de l'usine et les tours aéroréfrigérantes. Cependant, l'entreprise a effectué une désinfection des lieux ce qui a diminuer les chances de retrouver des bactéries, en particulier les légionelles sur le site. Des résultats de recherche par PCR de *Legionella* sont revenus positifs mais les taux ont été jugés "non décisifs" par les autorités belges.

Des sérologies ont été réalisées pour les patients ainsi que dans certains cas des prélèvements nasopharyngés ou respiratoires bas. Le CNR-L a reçu des prélèvements pour 73 patients Français :

- Echantillons « respiratoires » (7), 3 expectorations et 4 aspirations nasopharyngées ou écouvillons de gorge : La culture a été positive pour un échantillon (crachat) à *Legionella bozemanii*. Les autres cultures sont négatives. La PCR *Legionella* spp et *L. pneumophila* a été réalisée sur 6 échantillons « respiratoires ». La PCR *Legionella* non *pneumophila* a été positive pour 3 échantillons, dont une PCR positive à *Legionella bozemanii* qui correspond au prélèvement positif en culture.

- Sérologie (123 sérums, 73 patients) : la sérologie *L. pneumophila* a été réalisé par ELISA ou IF ; la sérologie *L. non pneumophila* a été réalisée par IF pour les espèces *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae* pour l'ensemble des 123 sérums.

- 105 sérums montrent un résultat négatif : titre \leq à 64 pour toutes les espèces

- 18 sérums montrent un titre \geq 128 pour au moins une des espèces.

L'existence de réactions croisées en sérologie entre les différentes espèces est connue. Le titre en *L. bozemanii* est augmenté pour tous ces sérums, seul ou associé à d'autres espèces ; de plus le titre en *L. bozemanii* est souvent le plus élevé. Ces résultats associés à la mise en culture de *L. bozemanii* à partir d'un prélèvement pulmonaire pour un patient sont en faveur de cette espèce comme agent pathogène. Néanmoins les résultats de sérologie ne permettent pas d'écarter une contamination par plusieurs *Legionella* non *pneumophila* voire *L. pneumophila* séro groupe 4.

Au total, pour 18 patients une infection par *L. bozemanii* peut être évoquée

- 1 patient avec une souche *L. bozemanii* isolée

- 2 patients avec une PCR *L. non pneumophila* positive

- 12 patients avec une séroconversion en *L. non pneumophila*, dont *L. bozemanii*

- 3 patients ayant des titres élevés répétés en *L. non pneumophila*, dont *L. bozemanii*

Pour 2 patients, des titres élevés en *L. pneumophila* séro groupe 4 ont été observés (1 autre patient montre une séroconversion en Lp4 et *L. bozemanii*).

Le CNR de Belgique nous a envoyé un échantillonnage de 32 sérums issus de 16 patients (testé négatif en *L. pneumophila* par le CNR Belge) pour analyser les *L. non pneumophila*. Les résultats étaient similaires : 6 séroconversions en *L. non pneumophila* ; 2 titres élevés en *L. non pneumophila* et 1 séroconversion en *L. pneumophila* séro groupe 4 (1/256) (associé à une séroconversion en *L. non pneumophila*). L'espèce *L. bozemanii* était toujours positive.

Cette épidémie est la première épidémie décrite de fièvre de Pontiac en France. La mise en culture d'une *Legionella* (ici *L. bozemanii*) est exceptionnelle au cours de fièvre de Pontiac caractérisée par l'absence de pneumonie (ce qui était le cas pour la patiente). Cet isolement a été possible grâce à la préconisation de réaliser un prélèvement en systématique même en absence de symptomatologie pulmonaire. Une demande de prélèvement devrait être plus systématique dans le cadre de fièvre de Pontiac. La PCR a par ailleurs permis la mise en évidence d'ADN de *L. non pneumophila* pour 2 autres prélèvements. Ce prélèvement pulmonaire positif a été d'une grande utilité pour cibler les sérologies réalisées.

- **Légionelloses nosocomiales liées à une contamination par la cuvette des toilettes en service d'Hématologie**

Deux cas de légionellose nosocomiale ont été diagnostiqués par antigènes urinaires chez des patients occupant la même chambre dans une unité d'hématologie à 5 mois d'écart. Pour l'un des patients l'origine nosocomiale était certaine, pour l'autre possible. Les LBA des deux patients ont permis d'isoler une souche *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 de type Paris, ST1, sous-groupe Philadelphia. L'investigation a été réalisée par l'Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales et le laboratoire de bactériologie du CH de St Antoine (Paris).

La douche et les robinets de l'évier de la salle de bain disposant de filtres, une contamination par la cuvette des toilettes *via* des aérosols a été suspectée. L'analyse de souches isolées de prélèvements réalisés au niveau de la cuvette des toilettes de la chambre des patients ainsi que sur le réseau d'eau par WGS (Nextera XT Illumina technology) a permis de montrer un fort lien de clonalité entre les souches cliniques et les souches environnementales permettant ainsi de confirmer la contamination de ces patients par des aérosols provenant des toilettes. Notamment 0 SNPs a été mis en évidence entre la souche d'un patient et l'eau la cuvette des toilettes de la chambre de ce patient.

En pratique, ces données montrent la possibilité pour les patients fortement immunodéprimés de se contaminer avec les aérosols produits lors du tirage de la chasse d'eau des toilettes. Ces données pourraient expliquer certains cas de légionellose d'origine nosocomiale en France dont la source n'a jamais été identifiée malgré les investigations étendues réalisées dans les services.

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 ;**

ARS Rhone-Alpes Auvergnnes, 23 Mars 2017 : "rencontre ARS - intervention CNR légio". (Anne Gaëlle Ranc et Laetitia Beraud)

Participation à la Journée régionale de formation sur le risque infectieux lié à l'environnement, 10 Octobre 2017, Tours : La légionellose en France aujourd'hui – S. Jarraud

Module de formation initiale des ingénieurs d'études sanitaires, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) (1h30), 14 Novembre 2017, Rennes (S. Jarraud)

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

En 2017, le CNR a accueilli pendant 2 jours une technicienne du laboratoire environnemental du CH de Montpellier. Ce stage permet de découvrir les techniques de diagnostic et typage réalisé au CNR ainsi que les dispositions mise en place pour l'accréditation.

- **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 (645 courriers en 2017).

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 dispose d'un site internet (<http://cnr.univ-lyon1.fr>)

Dernière mise à jour : Janvier 2018

Dernier rapport : activités de 2016

Réactualisation de fond prévue en 2018

- **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).

Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation.

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 pour l'ECDC (Sophie Jarraud) (depuis 2010).

ANSES – groupe de travail « q-PCR légionelles » dont l'objectif est l'analyse d'un rapport mandaté par le ministère de l'écologie relatif à la pertinence des méthodes analytiques par culture et par q-PCR pour le contrôle réglementaire des eaux de circuits de refroidissement des tours aéroréfrigérantes (6 réunions à l'ANSES en 2017, Maud Baume).

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

Interview France 3 pour 2 cas de légionellose diagnostiqués à Oullins (proche Lyon) alors que des *Legionella* avaient été détectées dans la piscine : information générale sur les risques liés aux légionelles.

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 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1. Projet présenté dans le rapport de 2016 – finalisé en 2017 avec une publication en 2017 (les abstracts n'ont pas été ajoutés)

* **Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *L. pneumophila* aux macrolides**

Descours G, Ginevra C, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Kay E, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in Legionella pneumophila. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3).

* **Caractérisation d'une pompe à efflux (LpeAB) impliquée dans la tolérance de *L. pneumophila* aux macrolides**

Massip C, Descours G, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Gilbert C. Macrolide resistance in Legionella pneumophila: the role of LpeAB efflux pump. J Antimicrob Chemother. 2017;72(5):1327-1333.

* **Distribution des CMI de macrolides, fluoroquinolones et rifampicine chez *L. pneumophila* sauvage et corrélation entre le profil du clone ST1 et sa sensibilité diminuée aux macrolides médiée par LpeAB**

Vandewalle-Capo M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Gilbert C, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of Legionella pneumophila identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. Int J Antimicrob Agents, 2017;50(5):684-689.

* **Apport du LPS purifié pour l'évaluation de kits commerciaux permettant la détection d'antigènes urinaires de *Legionella***

Ranc AG, Carpentier M, Beraud L, Descours G, Ginevra C, Maisonneuve E, Verdon J, Berjeaud JM, Lina G, Jarraud S. Legionella pneumophila LPS to evaluate urinary antigen tests. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89(2):89-91.

* **Analyse par NGS de cas nosocomiaux liés au clone endémique ST1 de *L. pneumophila***

David S, Afshar B, Mentasti M, Ginevra C, Podglajen I, Harris SR, Chalker VJ, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J. Clin Infect Dis. 2017 May 1;64(9):1251-1259. Seeding and Establishment of Legionella pneumophila in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease.

* **Détection spécifique du clone endémique ST47 de *L. pneumophila***

Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S; ESCMID Study Group for Legionella Clin Microbiol Infect. 2017 Apr;23(4):264. Rapid detection and evolutionary analysis of Legionella pneumophila serogroup 1 sequence type 47.

6.1.2. Etudes démarrées en 2017

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 Unité de Soins Intensifs 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 sont prévus, 7 centres sont ouverts à l'inclusion (Hospices Civils de Lyon, St Antoine Paris, Bichat Paris, CH Tourcoing, CHU Strasbourg, CHU Nantes, CHU Besançon) et 6 sont en cours de signature de convention avec les HCL ou d'ouverture de site (CHU Grenoble, CHU Saint Etienne, CH Angoulême, CHU Dijon, CHU Lille, Tenon Paris). Nous souhaitons étendre ces centres investigateurs.

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 2017, 12 patients ont été inclus et le laboratoire a recueilli près de 150 prélèvements. Les premières données très préliminaires de PCR semiquantitatives montrent que la cinétique de disparition de l'ADN de *Legionella* dans les poumons est variable (jusqu'à des persistances de 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. Seule l'analyse d'un grand nombre de patients permettra de confirmer ces hypothèses.

L'analyse des microbiotes de ces patients va être réalisée prochainement. Des études préliminaires sur d'autres échantillons ont montré l'impact important du type de prélèvement. La diversité bactérienne est élevée dans l'échantillon d'expectoration mais ne reflète pas l'infection par *Legionella* (retrouvé en très faible % par rapport au LBA). Des aspirations bronchiques et des LBA ont été demandées pour ce projet (Voir étude ci-dessous). Les autres analyses sont en cours.

Caractérisation des récidives 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 comme objectif de mieux caractériser les facteurs susceptibles d'être responsables des récidives et/ou de ces échecs thérapeutiques. Pour cela nous avons réalisé :

- **une description précise des caractéristiques cliniques des patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques** (publication en cours).

- **une étude de l'évolution génétique de *Legionella* et l'évolution du microbiote dans ces contextes**

Nous avons séquencé le génome de 32 isolats cliniques issus d'infection persistante et avons montré l'absence de mutation (0 SNPs observé) sur des souches isolées après des infections de plus de 2 mois. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (C. Buchrieser, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris), nous avons analysé la variation du microbiote pulmonaire au cours de l'infection chez plusieurs patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques (une publication est en cours).

- Lung microbiome composition during *Legionella*-associated pneumonia and antibiotic treatment, Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser, IBPS International Symposium on Symbiosis short talk, 15-17 mars 2017, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris France
- Characterization of the lung microbiome in Legionella-associated pneumonia and its evolution during antibiotic treatment. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. FEMS 11-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne Poster Discussion Sessions

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

Ginevra C, Chastang C, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J

Background: *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). A rapid and specific detection method for this particular ST is expected to be advantageous and underpin epidemiological investigations and risk assessments.

Methods: A collection of 131 *Lp* genomes, including 49 ST1 genomes was analysed 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.

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.

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. Further validation of this assay using environmental and clinical samples is ongoing and will be followed by a multi-site evaluation. 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).

Digital PCR for Detection and Quantification of Fluoroquinolone Resistance in *Legionella pneumophila*.

Hennebique A, Bidart M, Jarraud S, Beraud L, Schwebel C, Maurin M, Boisset S. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9).

The emergence of fluoroquinolone (FQ)-resistant mutants of *Legionella pneumophila* in infected humans was previously reported using a next-generation DNA sequencing (NGS) approach. This finding could explain part of the therapeutic failures observed in legionellosis patients treated with these antibiotics. The aim of this study was to develop digital PCR (dPCR) assays allowing rapid and accurate detection and quantification of these resistant mutants in respiratory samples, especially when the proportion of mutants in a wild-type background is low. We designed three dPCRgyrA assays to detect and differentiate the wild-type and one of the three gyrA mutations previously described as associated with FQ resistance in *L. pneumophila*: at positions 248C→T (T83I), 259G→A (D87N), and 259G→C (D87H). To assess the performance of these assays, mixtures of FQ-resistant and -susceptible strains of *L. pneumophila* were

analyzed, and the results were compared with those obtained with Sanger DNA sequencing and real-time quantitative PCR (qPCR) technologies. The dPCR_{gyrA} assays were able to detect mutated *gyrA* sequences in the presence of wild-type sequences at up to 1:1,000 resistant/susceptible allele ratios. By comparison, Sanger DNA sequencing and qPCR were less sensitive, allowing the detection of *gyrA* mutants at up to 1:1 and 1:10 ratios, respectively. When testing 38 respiratory samples from 23 legionellosis patients (69.6% treated with an FQ), dPCR_{gyrA} detected small amounts of *gyrA* mutants in four (10.5%) samples from three (13.0%) patients. These results demonstrate that dPCR is a highly sensitive alternative to quantify FQ resistance in *L. pneumophila*, and it could be used in clinical practice to detect patients that could be at higher risk of therapeutic failure.

Quantification of *Legionella* DNA Certified Reference Material (CRM) by digital droplet PCR (ddPCR)

The prevention of LD is achieved through monitoring of *Legionella* levels in waters. This can be done by quantifying *Legionella* DNA using PCR based methods and to ensure calibration of these methods, a CRM has been available since 2009. In this study, a novel method of absolute quantification of DNA (ddPCR) was qualified for *Legionella* DNA quantification and tested on the CRM.

The ddPCR method for quantifying *Legionella* DNA could be useful for future reference materials, as it can be used to assign a value to a new batch with reduced uncertainty and less time-consuming protocol. The advantage is its independence from pre-existing standards as well as lesser number of samples to be tested, which make it the preferred method for stability monitoring (publication en cours).

6.2. Liste des publications et communications de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Publications nationales

6.2.2. Publications internationales

1. Descours G, Ginevra C, Jacotin N, Forey F, Chastang J, Kay E, Etienne J, Lina G, Doublet P, Jarraud S. Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother.** **2017**;61(3).
2. Massip C, Descours G, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Gilbert C. Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. **J Antimicrob Chemother.** **2017**;72(5):1327-1333.
3. Vandewalle-Capo M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Gilbert C, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. **Int J Antimicrob Agents,** **2017**;50(5):684-689.
4. Ranc AG, Carpentier M, Beraud L, Descours G, Ginevra C, Maisonneuve E, Verdon J, Berjeaud JM, Lina G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* LPS to evaluate urinary antigen tests. **Diagn Microbiol Infect Dis.** **2017**;89(2):89-91.
5. Hennebique A, Bidart M, Jarraud S, Beraud L, Schwebel C, Maurin M, Boisset S. Digital PCR for Detection and Quantification of Fluoroquinolone Resistance in *Legionella pneumophila*. **Antimicrob Agents Chemother.** **2017** Aug 24;61(9).
6. David S, Afshar B, Mentasti M, Ginevra C, Podglajen I, Harris SR, Chalker VJ, Jarraud S, Harrison TG, Parkhill J. Seeding and Establishment of *Legionella pneumophila* in Hospitals:

Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease. **Clin Infect Dis.** 2017 May 1;64(9):1251-1259.

7. Lanternier F, Ader F, Pilmis B, Catherinot E, Jarraud S, Lortholary O. Legionnaire's Disease in Compromised Hosts. **Infect Dis Clin North Am.** 2017 Mar;31(1):123-135.

6.2.3. Communications nationales

- Communications orales

1. Carrillo G, Ginevra C, Jaboulay C, Jarraud S, Doublet P and Kay E. Evolution of virulence traits during mutation accumulation evolution experiment in *Legionella pneumophila*, SFM, Paris 9-11 octobre 2017

- Communications affichées

1. Botelho-Nevers Elisabeth, Grattard Florence, Viallon Alain, Allegra Séverine, Jarraud Sophie, Paul Verhoeven, Marcuccilli Adrien, Lucht Frédéric, Pozzetto Bruno, Berthelot Philippe. Fréquence de la légionellose dans une cohorte prospective de patients hospitalisés pour pneumopathie infectieuse dans un CHU. 18^{ème} Journée Nationale d'Infectiologie, St Malo, 21-23 Juin 2017
2. Hennebique, M. Bidard, S. Jarraud, L. Beraud, C. Schwebel, M. Maurin, S. Boisset. Détection et quantification de la résistance aux fluoroquinolones chez *Legionella pneumophila* par PCR digitale. Poster commenté. 37^{ème} RICAI, 18 – 19 Décembre Paris
3. Ginevra C, Nesa D, Descours G, Campese C, Tankovic J, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Légionellose chez les patients immunodéprimés : méfiez-vous des toilettes ! 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 18-19 Décembre 2017, Paris.
4. Beraud L, Montoya A, Ranc AG, Descours G, Ginevra C, Lina G, Jarraud S. Apport du lecteur AlereTM pour la détection des antigènes *Legionella* urinaires. 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 18-19 Décembre 2017, Paris.

6.2.4. Communications internationales

- Communications orales

1. Dauwalder O, AG. Ranc, P. Courault, S. Bidah, S. Mailler, I. Maffre, A. Miclot, R. Ottaviani, A. Bricout, C. Chavent, M. Arsac, C. Vidal, C. Ginevra, L. Beraud, G. Descours, M. Welker, F. Vandenesch, G. Durand, V. Girard, S. Jarraud. Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: the MALDI-TOF mass spectrometry could be an efficient screening method. ePoster mini oral session, ECCMID Vienna 22-25 april 2017

- Communications affichées

1. Beraud L, Montoya A, Ranc AG, Descours G, Ginevra C, Lina G, Jarraud S. Performance of the BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen rapid test in conjunction with the AlereTM Reader. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
2. Ginevra C, Nesa D, Descours G, Campese C, Tankovic J, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Legionnaires' disease in immunocompromised patients: beware of toilets! 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
3. Ginevra C, Chastang C, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, and Moran-Gilad J. Specific real-time PCR for detection and

identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.

4. Carrillo G., Ginevra C., Jaboulay C., Doublet P., Jarraud S., Kay E. Evolution of virulence traits during mutation accumulation evolution experiment in legionella pneumophila. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
5. Vandewalle M., Guillemot J., Chapalain A., Lina G., Doublet P., Jarraud S., Ginevra C. Effect of human antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila*. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
6. Leenheer D., Pelaz C., Morin M., Hallin E., Klingenberg D., Jarraud S., Ginevra C. Rapid adaptations to the accidental human host in *Legionella pneumophila*. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
7. Ginevra C., Chastang C., David S., Mentasti M., Yakunin E., Chalker V.J., Chalifa-Caspi V., Valinsky L., Jarraud S., Moran-Gilad J. Specific real-time PCR for detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1. 9th International Conference on *Legionella*, September 26th-30th 2017, Roma, Italy.
8. L. Gomez-valero, C. Rusniok, G. Schroeder, D. Carson, S. Mondino, A.E. Perez-cobas, M. Rolando, S. Reuter, J. Dermatas, J. Crumbach, S. Descorps-declere, G. Frankel, S. Jarraud, E. Hartland, C. Buchrieser. The Legionella genus genome: a global view of the genus evolution. FEMS 11-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne.
9. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Lung microbiome composition during *Legionella*-associated pneumonia and antibiotic treatment, IBPS International Symposium on Symbiosis short talk, 15-17 mars 2017, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris France
10. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser. Characterization of the lung microbiome in Legionella-associated pneumonia and its evolution during antibiotic treatment. FEMS 11-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne
Poster Discussion Sessions

6.2.5. Conférences sur invitations

- Nationale

1. Jarraud S*. La légionellose en France aujourd'hui. Journée régionale de formation sur Risque infectieux lié à l'environnement en ES, EMS et en ville, 10 octobre **2017**, Tours (35 min)

- Internationale

1. Jarraud S*, Diagnosis and *Legionella* typing of atypical forms of legionellosis, International congress Legionella **2017**, 26-30 September 2017, Rome, Italie (30 min)

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 de nombreux 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 pour la détection des légionelles dans l'environnement

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**

- Accréditation

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.

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

Coordination avec l'Angleterre 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).

- Coordination d'une évaluation multicentrique européenne de l'ensemble des tests urinaires disponibles

Le protocole de cette étude a été élaboré. Il reste à contacter l'ensemble des distributeurs (pour la plupart déjà intéressés) et à réaliser cette évaluation dans une dizaine de centres européens (Coordination avec Valeria Gaia (Suisse) et Soren Uldum (Danemark) (Projet du groupe de travail ESGLI)

- Evaluation 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.

*** 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 (366 isolats ont été analysés en 2017) avec pour objectif de caractériser la majorité des isolats cliniques et des isolats environnementaux lors des investigations quand nécessaire par cette technologie dans les deux prochaines années.

La mise en place d'une base de données commune européenne de cgMLST (disponible en août 2018) à laquelle nous avons participé devrait permettre au CNR d'avoir une nouvelle vision des grands clones circulant en France et ainsi d'évoquer plusieurs pistes de travaux.

- **Investigation des domiciles**

Le nombre de cas de légionellose ne diminue pas malgré la mise en place de nombreuses mesures règlementaires. En 2017, 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 devient une priorité et devrait constituer l'objectif d'une étude commune avec Santé Publique France dans ces deux prochaines années.

- **Mise en place d'outils pour évaluer la résistance de *Legionella* aux biocides et étude de l'impact de l'utilisation des biocides sur le risque «légionellose»**

Nous avons pour objectif de démarrer une étude de la sensibilité des *Legionella* aux biocides. Aucune donnée n'est disponible sur l'impact des biocides sur la diversité des espèces et souches de *Legionella* dans les réseaux d'eaux traités, et plus particulièrement sur la persistance de certains clones associés à l'infection, dont le clone ST1 qui est particulièrement associé aux cas nosocomiaux de légionellose. L'impact de la pompe à efflux LpeAB (voir plus loin) sera notamment évalué.

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

- **Utilisation du NGS pour la compréhension de l'infection**

Le développement de différents outils bio-informatiques nous permet de 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. 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).

- **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 avec la mise en place de nouveaux centres investigateurs pour augmenter l'inclusion des patients

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

Nos travaux récents 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. Nos objectifs seront (1) de définir le rôle de LpeAB dans la tolérance de *L. pneumophila* aux macrolides dans des environnements pulmonaires ou hydriques, et donc dans sa capacité à évoluer vers un niveau de résistance supérieur ; (2) d'identifier d'autres fonctions de cette pompe à efflux comme l'efflux d'autres composés ou un rôle dans le cycle intra-cellulaire de *Legionella* comme cela a été décrit pour d'autres bactéries ; (3) de caractériser les mécanismes de régulation de LpeAB : en effet LpeAB est surexprimée par les clones ST1 résistants aux macrolides précédemment sélectionnés *in vitro*, en cas de mutations en amont de la séquence codante (RBS ou promoteur) ou en présence de macrolides à concentration sub-inhibitrice. L'ensemble de ces études devrait nous permettre de mieux appréhender le rôle de LpeAB dans la pathogénie du clone mondial ST1 de *L. pneumophila* et ses mécanismes de régulation dans un contexte infectieux.

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

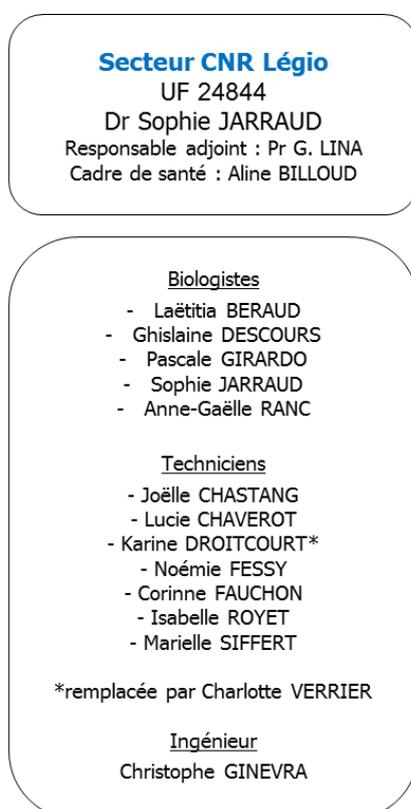
- augmentation inhabituelle de cas,
- apparition de cas groupés,
- modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles),
- modification des profils de résistance,
- apparition de souches inhabituelles,
- ect,....

Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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).



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

Figure 20. Organigramme fonctionnel du CNR

L'ensemble des personnels est présenté Figure 20. 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 7. Personnels affectés à l'activité du CNR des légionelles

Noms et qualifications	Coordonnées
Sophie Jarraud (directeur) PH - IAI MCU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 38 sophie.jarraud@univ-lyon1.fr
Gérard Lina (Directeur adjoint) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 94 gerard.lina@chu-lyon.fr
Jérôme Etienne (Physiopathologie et épidémiologie) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 26 73 28 76 jerome.etienne@chu-lyon.fr
Florence Ader (infectiologie) PH - Service des maladies infectieuses PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 15 60 florence.ader@univ-lyon1.fr
Laetitia Beraud (environnement, évaluation de réactifs) PH - IAI	Tél : 04 72 07 18 44 laetitia.beraud@chu-lyon.fr
Pascale Girardo (gestion informatique) Praticien attaché - IAI	Tel : 04 72 07 16 87 pascale.girardo@chu-lyon.fr
Anne-Gaëlle Ranc (épidémiologie) Assistante hospitalière - IAI Assistante universitaire - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 45 anne-gaelle.ranc@chu-lyon.fr
Ghislaine Descours (résistance) PH - IAI MCU - Faculté de Pharmacie	Tél : 04 72 07 16 50 ghislaine.descours@chu-lyon.fr
Christophe Ginevra (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique) Ingénieur IAI	christophe.ginevra@chu-lyon.fr
Techniciens (Hospices Civils de Lyon)	
<p>Isabelle Royet Karine Droitcourt* * remplacée par Charlotte Verrier 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>	
Cadre	
Aline Billoud	aline.billoud@chu-lyon.fr

Secrétaires	Tél : 04 72 07 11 45 Fax : 04 72 00 37 54
Manon Robert	manon.robert@chu-lyon.fr
Blandine Bavitot	blandine.bavitot@chu-lyon.fr

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 m² sont occupés par la Microbiologie :

- le R+5 de 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 21). 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 21. 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 InVS 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 Shimatsu 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, Enterovirus 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 tableau 8.

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 8. Modes de stockage de la collection du CNR

TYPE DE	Conservation	T°	Durée
Echantillons			
Respiratoires, LCR, Hémoc, Biopsie,... 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
Tout prélèvement « important »	Tubes NUNC	- 20°C	Infinie
Urine (non concentrée) + -	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	Infinie
	Contenant d'origine	+ 5°C	3 semaines
Sérums	Tube stérile à hémolyse	- 20°C	5 ans puis ceux sélectionnés : durée infinie

Souches

Souches extérieures	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
Souches cliniques	1 émulsion dans sang de mouton	- 80°C	Infinie

	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
Souches environnement « extérieur »	2 émulsions sur billes	- 20°C	Infinie
Souches environnement - eaux HCL	2 émulsions sur billes	- 20°C	Tri / 3 ans

ADN

ADN de souches	Microtubes	- 20°C	Infinie
ADN de prélèvements cliniques	Microtubes	- 20°C	Infinie
ADN des eaux	Microtubes	- 20°C	Infinie (après tri)
Blocs PFGE	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 suivis 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 adressées 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 qui figure en annexe 10.

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

Tableau 9. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR Légionelles

Collection ou stockage échantillons	Nombre approximatif d'échantillons	conditions de conservation température
sérums	26 600	-20°C
souches patients	5 920	-20°C et -80°C
souches environnementales	27 890	-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...)	1600	-20°C
urines	360	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	1 950	-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 CNR des légionelles est accrédité pour la détection des antigènes de *Legionella* dans les urines et 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 22).

Cartographie des processus du LBMMS

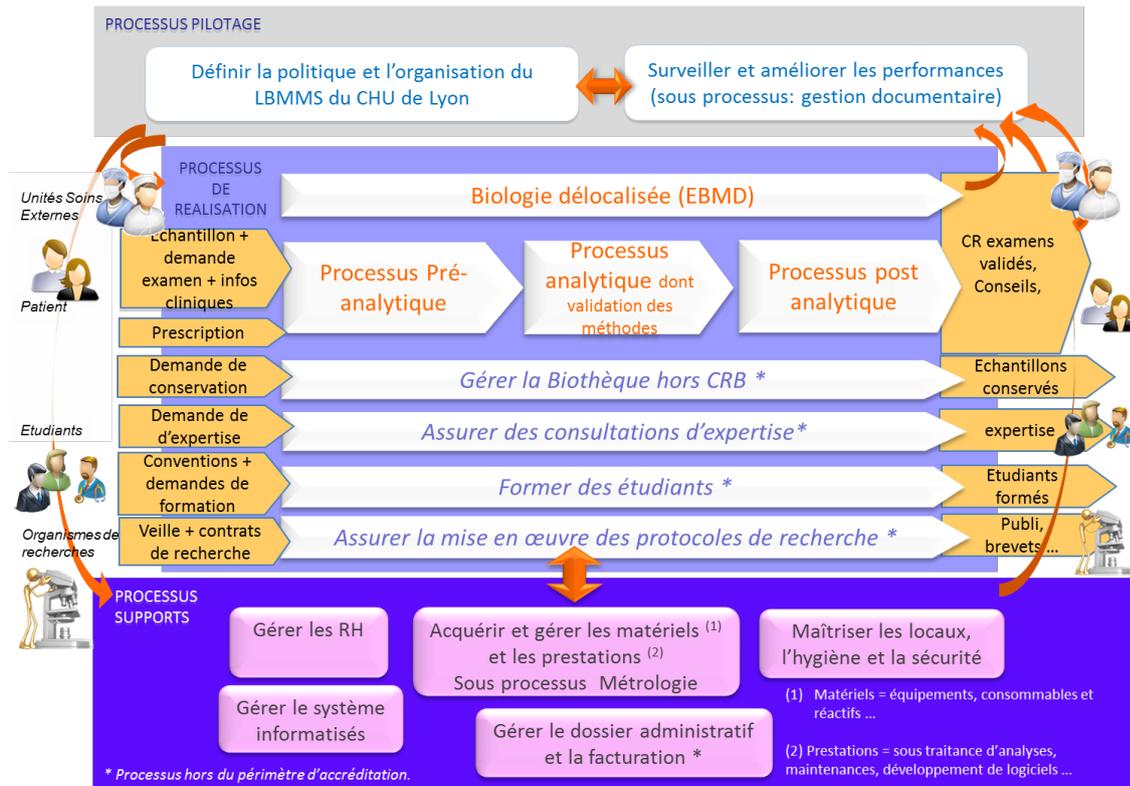


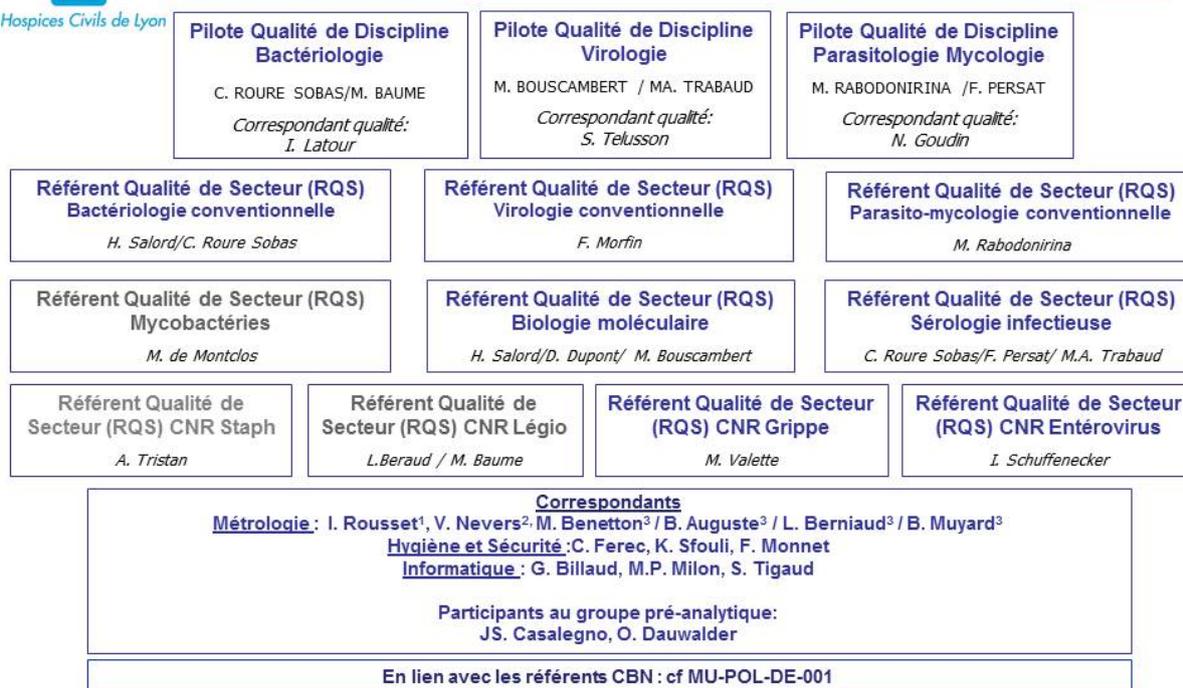
Figure 22. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001)

Chaque service du laboratoire a également nommé un référent qualité qui déploie la démarche dans son secteur.

La figure 23 représente l'organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie (valide en décembre 2017).

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. Il est complété par un manuel qualité spécifique pour les activités environnementales du CNR des légionelles.

Organigramme Qualité I.A.I



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

¹ Plateau de Biologie Moléculaire / Bactériologie

² Plateau de Biologie Moléculaire / Virologie

³ Plateau de Sérologies Infectieuses

Figure 23. Organigramme qualité du laboratoire de Bactériologie

Contrôles de Qualité Externes (CQE)

Le CNR a participé en 2017 à 4 programmes de CQE différents concernant les analyses de PCR et de *Sequence Based Typing* sur les souches de *Legionella* (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 5 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 annuellement 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 juillet 2017 pour le renouvellement de l'accréditation prévu tous les quatre ans).

De plus, des audits internes ont lieu également tous les ans, pour vérifier la mise en place du système, 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.

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.

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

Le CNR des légionelles est accrédité pour la détection des antigènes de *Legionella* dans les urines et 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).

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 amibien** 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*[®], ou autres), par immunofluorescence (Sofia[®]) et par ELISA (EIA Binax, ou autres).

Concentration des urines par centrifugation à l'aide des tubes Amikon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore[®])

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[®] (*Legionella species and Legionella pneumophila* Real-time PCR)

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

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, bioMérieux); 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) 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^{ème} 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[®] 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**.

Billy P.A. Développement d'un outil de détection des sous-populations résistantes aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine par séquençage ciblé haut débit chez *Legionella pneumophila*. Thèse d'exercice en Médecine, sous la direction du Dr S. Jarraud et Christophe Ginevra, Octobre 2015, Lyon

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.

- Détection des bactéries viables par utilisation du PMA associé à une PCR

Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G, Etienne J, Ginevra C. J Microbiol Methods. 2012 Feb;88(2):319-21.

- **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**
- **MLVA**
- **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 prélèvement clinique 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.

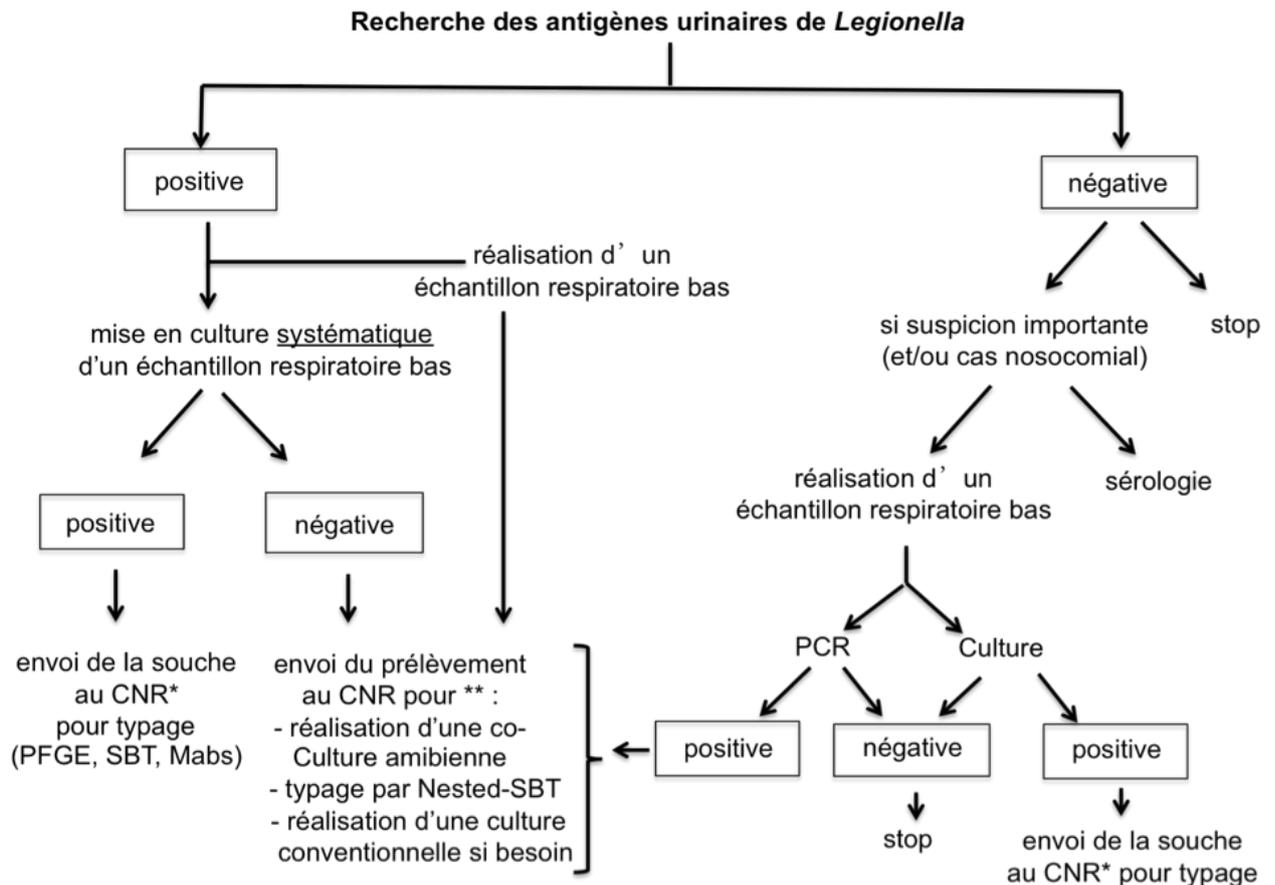
Liste des techniques recommandées par le CNR

Diagnostic

Une proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose est présentée Figure 24.

- **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 CO₂, favorise la croissance de certaines espèces de légionelles mais n'est pas obligatoire. Par contre, une atmosphère avec 5% de CO₂ 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 24. 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^{ère} 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 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.