

Rapport annuel d'activité

2020

**Centre National de Référence
des Légionelles**

**Année d'exercice
2019**

Pr Sophie Jarraud & Pr Gérard Lina

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

Résumé analytique

Enjeux de Santé Publique

Avec 1816 cas, l'année 2019 a été marquée par un **nombre de cas de légionellose encore élevé**, reflétant une augmentation constante depuis 4 ans (+49% de cas par rapport à 2016). L'année 2018 avait été une année record depuis la découverte de la maladie (2133 cas), due principalement à un pic en Juin 2018 identifié dans de nombreux pays européens. Plusieurs données semblent indiquer l'impact des conditions météorologiques dans la survenue de cet épisode. Malgré la mise en place de nombreuses mesures réglementaires en France, le risque de légionellose n'est pas totalement maîtrisé. **Les enjeux majeurs de Santé Publique** restent d'améliorer la prévention environnementale, d'identifier les sources de contamination, d'améliorer le diagnostic des cas de légionellose et de mieux comprendre l'impact des différents facteurs (environnementaux, bactériens, hôte) dans le développement de l'infection.

Pour la première fois depuis de nombreuses années, nous avons connu une épidémie de 28 cas légionellose dans la région de Strasbourg, impliquant le condenseur d'une chaufferie à biomasse collective, source de contamination jamais décrite dans la littérature. Ainsi, l'émergence de nouveaux systèmes de chauffage (ou refroidissement) pour lesquels il n'existe pour le moment pas de mesures réglementaires en France constitue un point de vigilance dans la maîtrise du risque de légionellose. Par ailleurs, les données 2019 montrent à nouveau, avec 77% d'investigations positives, que les réseaux intérieurs de distribution d'eau du domicile des cas, qui jusqu'alors ne font pas fait l'objet d'investigations systématiques restent importants à investiguer.

Nous disposons et avons mis en place des outils puissants d'interprétation des données de séquençage des génomes complets de *Legionella* pour discriminer les souches afin de mieux identifier les sources de contamination. Les données épidémiologiques cliniques ainsi que les analyses microbiologiques environnementales restent et apparaissent primordiales pour répondre à la question des sources de contamination non identifiées. Cette question implique en parallèle une amélioration du nombre de souches d'origine clinique disponibles et de favoriser le diagnostic des cas de légionellose notamment par l'utilisation de la PCR sur prélèvements pulmonaires, qui semble poursuivre son essor en 2019.

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

Faits marquants en 2019

- * Persistance d'un nombre de cas notifiés à *Santé Publique France* élevé, conduisant à une augmentation du nombre de souches cliniques typées par le CNR (441 isolats) ;
- * 517 isolats ont été typés par *Whole Genome Sequencing* (WGS) dans un contexte d'investigation de cas ou d'épidémie (210) ou dans un contexte de surveillance (307) ;
- * L'utilisation du WGS a permis de confirmer le rôle d'une chaufferie à biomasse d'un écoquartier lors de l'épidémie à Strasbourg ; et apparaît impliqué dans 2 cas diagnostiqués plus de 2 ans avant l'épidémie alors que la chaufferie était en fonctionnement ;
- * 23% des investigations réalisées ont concerné un domicile en 2019 et ont permis de confirmer cette source de contamination dans 77% des investigations réalisées. Ces données renforcent notre volonté de réaliser une étude commune avec SpF afin de mieux caractériser le rôle du domicile non encadré par la réglementation.
- * L'utilisation croissante de kits syndromiques par nos laboratoires partenaires semble permettre une meilleure détection des cas à *L. pneumophila* sérotype non 1, pour la plupart non détectés par l'antigénurie; le nombre d'isolats de *L. pneumophila* sérotype non 1 identifiés au CNR a été multiplié par 2,9 entre 2017 et 2019.
- * *L. longbeachae* reste l'espèce la plus fréquemment diagnostiquée après *L. pneumophila* ; la prévention et l'identification des sources de contamination particulières pour cette espèce reste un enjeu au niveau national
- * La large étude nationale translationnelle PROGLEGIO coordonnée par le CNR se poursuit dans l'objectif d'identifier des facteurs et/ou marqueurs associés à la sévérité des légionelloses.

Abstract

Public Health Issues

With 1,816 cases, 2019 was still marked by a high number of Legionnaires' disease (LD), rate which has been increasing over the last 4 years (+49% of cases compared to 2016). Despite the implementation of numerous regulatory measures in France, the risk of LD is not completely under control. The major public health challenges remain to improve environmental prevention, to identify the sources of contamination, to improve the diagnosis of LD cases and to better understand the impact of the various factors (environmental, bacterial, host) in the development of the infection.

For the first time in many years, we have had an outbreak of LD in the Strasbourg area including 28 cases, involving a collective biomass heating plant, a source of contamination never described in the literature. Thus, the emergence of new heating (or cooling) systems for which there are currently no regulatory measures in France constitutes a point of vigilance in controlling the risk of LD. In addition, the 2019 data show once again, with 77% of positive investigations, that the internal water distribution networks in the home of cases, which until now have not been systematically investigated, are still important to investigate.

We have implemented powerful tools for interpreting the sequencing data of *Legionella* genomes to discriminate strains in order to better identify the sources of contamination. Clinical epidemiological data as well as environmental microbiological analyses remain to be essential to answer the question of unidentified sources of contamination. At the same time, this question implies an improvement in the number of strains of clinical origin available and to promote the diagnosis of LD cases, particularly through the use of PCR on lung samples, which seems to continue to expand in 2019.

Finally, LD remains a severe infection despite the introduction of appropriate antibiotic therapy with an estimated overall lethality of more than 10%. One of the major challenges is the identification of factors and/or markers associated with the severity of LD.

Highlights in 2019

- * Persistence of a high number of notified cases to *Sante Publique France*, leading to an increase in the number of clinical strains typed by the CNR (441 isolates).
- * 517 *Legionella* isolates were typed by Whole Genome Sequencing (WGS) ;
- * The use of WGS confirmed the role of a collective biomass heating plant in an eco-neighbourhood during the Strasbourg outbreak; This new source appears to be involved in 2 cases diagnosed more than 2 years before the outbreak when the collective biomass heating plant was in operation;
- * 23% of the investigations carried out concerned a home in 2019 and confirmed this source of contamination in 77% of the investigations carried out. These data reinforce our aim to carry out a joint study with SpF in order to better characterize the role of home not covered by regulations.
- * The increasing use of syndromic kits seems to allow a better detection of *L. pneumophila* serogroup non 1 cases, mostly undetected by urinary antigen tests; *L. pneumophila* serogroup non 1 isolates identified was multiplied by 2.9 between 2017 and 2019.
- * *L. longbeachae* remains the most frequently diagnosed species after *L. pneumophila*; prevention and identification of specific sources of infection for this species remains a national challenge.
- * The large national translational PROGLEGIO study coordinated by the CNR is continuing with the aim of identifying factors and/or markers associated with the severity of LD.

Avant propos

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

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

Ce rapport a été rédigé par Camille Allam, Laetitia Beraud, Ghislaine Descours, Christophe Ginevra, Gérard Lina et Sophie Jarraud.

Table des matières

1. Missions et organisation du CNR	9
2. Activité d'expertise	10
2.1. Évolution des techniques	10
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.4. Collections de matériel biologique distribuées	12
2.5. Activités d'expertise	13
2.5.1. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses	13
2.5.2. Transmission des résultats expertisés	15
2.6. Activités de séquençage	16
3. Activités de surveillance	17
3.1. Description du réseau de partenaires	18
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	20
3.2.1. Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF)	20
3.2.2. Formes cliniques atypiques	21
3.2.3. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR	22
3.2.4. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR	25
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	25
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	27
3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	27
3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC)	28
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	29
4. Alerte	31
4.1. Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal	31
4.2. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	32
5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil	35
5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé	35
5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	36
5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	36
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	36
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	36
6.1.1. Etudes démarrées ou en cours en 2019	37
6.2. Liste des publications et communications de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	39
6.2.1. Publications nationales	39

6.2.2.	Publications internationales	39
6.2.3.	Communications nationales	39
6.2.4.	Communications internationales	40
6.2.5.	Conférences sur invitations	40
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	40
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	41
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR		44
Missions du CNR des Légionelles		44
1.	Apporter une expertise microbiologique	44
2.	Conseil	44
3.	Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique	44
4.	Contribuer à l'alerte en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel	44
Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés		45
Personnels affectés au CNR et Organigramme		45
Locaux		46
Principaux équipements :		47
Collections de matériel biologique		47
Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;		47
Collections de souches, antigènes et immun-sérums : nombre et caractérisation		49
Démarche qualité du laboratoire		50
Accréditation		50
Structure qualité du laboratoire		50
Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)		51
Audits		52
Logiciel de gestion de la qualité		52
Avancement de la démarche		52
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR		53
Liste des techniques de référence pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux		53
Méthodes pour le diagnostic des légionelloses		53
Méthodes d'identification des légionelles		53
Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques		54
Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement		54
Détection et quantification des bactéries viables		55
Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique		55
Méthodes appliquées sur souches		55
Méthodes appliquées sur prélèvements cliniques ou sur échantillons environnementaux		55
Liste des techniques recommandées par le CNR		55

Liste des figures

Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2019	13
Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2014-2019.	14
Figure 3. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des souches cliniques (A) ou des prélèvements respiratoires pour mise en culture, le diagnostic de légionellose étant retenu (B).	18
Figure 4. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.	19
Figure 5. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des urines (A) ou des sérums pour expertise (B).	19
Figure 6. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des souches environnementales pour identification (A) ou comparaison (B).	20
Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2019 (Santé publique France).	20
Figure 8. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2019 (Santé publique France).	21
Figure 9. Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2019 (Santé publique France).	21
Figure 10. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2019.	22
Figure 11. Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2015 à 2019 et représentation de ces STs (en pourcentage) en 2019.	24
Figure 12. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.	25
Figure 13. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2019, (A) en terme de séro groupe des souches de <i>L. pneumophila</i> ; (B) en termes d'espèce des souches de <i>Legionella</i> non <i>pneumophila</i>	25
Figure 14. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.	29
Figure 15. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2019 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête.	30
Figure 16. Minimum spanning tree of 21 <i>L. pneumophila</i> serogroup 1 ST62. Light blue charts represent environmental isolates from the collective biomass heating plant, dark blue charts represent the isolates from the patients, red numbers represent SNPs.	32
Figure 17. Espaces du R+1 de l'IAI (en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles.	47
Figure 18. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).	50
Figure 19. Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.	51
Figure 20. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.	56

Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2015-2019.	13
Tableau 2. Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de Legionella et de sérogroupes de L. pneumophila, 2013 – 2019.	22
Tableau 3. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2019.	30
Tableau 4. Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles.....	45
Tableau 5. Modalités de stockage de la collection du CNR.	48
Tableau 6. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.....	49

1. Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNR des légionelles (CNR-Legio) sont détaillées en Annexe 1.

Aucun changement notable sur le plan organisationnel n'est à noter pour l'année 2019.

Nom Prénom	Fonction / qualification
Sophie Jarraud	PU-PH, Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Equipe « Pathogénie des Légionelles » Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) Responsable du CNR-Legio
Gérard Lina	PU-PH - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux Responsable adjoint du CNR-Legio
Florence Ader	PU-PH - Service des maladies infectieuses Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine Lyon Est, Equipe « Pathogénie des Légionelles » Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Camille Allam	AHU - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud Charles Mérieux, Equipe « Pathogénie des Légionelles » Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Laetitia Beraud	PH - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon,
Ghislaine Descours	MCU-PH - Institut des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon, ISPB-Faculté de Pharmacie Lyon, Equipe « Pathogénie des Légionelles » Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Christophe Ginevra	Ingénieur (Hospices Civils de Lyon), Equipe « Pathogénie des Légionelles » Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
Helena Rutschi	Cadre de Santé, Hospices Civils de Lyon
Joelle Chastang Lucie Chaverot Corinne Fauchon Hanene Doudou* Isabelle Royet Marielle Siffert	Techniciennes (Hospices Civils de Lyon)
Noémie Fessy	Technicienne (financement étude PROGLEGIO)
Manon Robert, Blandine Bavitot, Toky Andriamaro	Secrétaire (Hospices Civils de Lyon)

* remplacement de Karine Droitcourt

L'engagement dans la démarche d'accréditation est effectif depuis 2012. 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* par PCR dans les prélèvements respiratoires (norme NF EN ISO 15189 – lignée de portée BA02) depuis 2016 ; l'antigénurie *Legionella* par immuno-chromatographie (norme 15189 – lignée de portée MG03) et ELISA (norme 15189 – lignée de portée MG01) depuis 2019 ; la sérologie *Legionella* par ELISA (norme 15189 – lignée de portée MG01) depuis 2019.

2. Activité d'expertise

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

Eléments clés de l'année 2019 en termes de production d'expertise

- Maintien d'une activité importante au CNR en relation avec les 1816 cas notifiés ;
- une souche est disponible pour 24% des cas de légionellose notifiés (441 isolats) ; le CNR a isolé 57,8% de ces souches ;
- 517 souches (clinique et environnementale) ont été typées par WGS, 210 dans un contexte d'investigation de cas ou d'épidémie, 307 dans un contexte de surveillance ;
- diminution (-29% entre 2018 et 2019, et -69% en 5 ans) des sérologies réalisées au CNR suite à la sensibilisation des laboratoires sur les sérums devant nous être envoyés (confirmation de titre) ;
- Le nombre de PCR à visée diagnostique réalisées au CNR poursuit sa décroissance, témoin de l'utilisation croissante de cette technique au niveau national ; associées à une culture, elles ont permis l'isolement de 35 souches cliniques de *L. pneumophila* sérotype non 1 ;
- Augmentation de la veille sur l'antibiorésistance (103 déterminations de CMI ; PCR résistance sur prélèvements) sans identification de résistance.

2.1. Évolutions des techniques

Le séquençage génome entier (NGS). Cette activité en plein développement est détaillée Chap. 2.6. En 2019, 66% des souches expertisées ont été séquençées ; un objectif à l'ensemble des souches cliniques est envisagé courant 2021 avec le développement d'une plateforme NGS au sein de l'Institut des Agents Infectieux et la mise à disposition d'un séquenceur. Les principales évolutions techniques en 2019 ont concerné l'évaluation d'un automate de pipetage nanovolume (le Mosquito, STPlabtech) pour la préparation des banques de séquençage qui permet de diminuer les coûts globaux de séquençage en divisant de façon importante les volumes réactionnels (diminution d'un facteur 10). Prise de contact avec Biomérieux et mise en place de l'infrastructure informatique pour utiliser l'application Bionumerics non plus seulement à des fins de gestion de base de données mais également à des fins analytiques en particulier pour l'analyse des données NGS.

Détermination de la résistance aux antibiotiques. Le CNR détermine les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide. Une réflexion sur l'évolution vers des méthodes en plaque commercialisée standardisée lyophilisée 96 puits et lecteur optique a été démarrée en 2019 ; une démarche proactive a été faite en 2019 pour le développement de telle plaque par un industriel, le développement et l'évaluation est encore en cours en 2020.

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

Comparison of *Legionella* K-set® and BinaxNOW® *Legionella* for diagnosing Legionnaires' disease on concentrated urine samples. Cette étude débutée en 2016 a été complétée en 2019 et soumise à European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Abstract: Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 urinary antigens is the most widely used technique for the diagnosis of Legionnaires' disease (LD). The aim of this study was to evaluate the performance of the *Legionella* K-set® immunochromatographic test, in comparison with the BinaxNOW® *Legionella* urinary antigen card (UAC) on concentrated urine samples (US).

A total of 250 concentrated US including 200 prospective US sent to the laboratory for urinary antigens' testing and 50 frozen US from patients with confirmed LD were tested. Positive US were retested after boiling (5min, 100°C). Each US leading to discordant results between the two tests was further tested using Binax™ *Legionella* EIA. Then, 10 additional positive non-concentrated US were tested using both tests.

On concentrated US, *Legionella* K-set® test showed concordant results with that of BinaxNOW® *Legionella*. All negative US with BinaxNOW® were negative with *Legionella* K-set® test. For the 50 frozen US, all were positive with BinaxNOW® and 49 were positive with *Legionella* K-set®, all confirmed after boiling except 3 US which led to uninterpretable results with *Legionella* K-set®, due to a migration defect. Three of the 10 additional positive non-concentrated US were found negative with *Legionella* K-set® and only 1 US remained negative after concentration. All these positive non-concentrated US were positive with BinaxNOW® *Legionella*.

To conclude, the performance of the *Legionella* K-set® test on concentrated US is comparable to that of BinaxNOW® *Legionella* UAC if performed on concentrated US.

Evaluation de la version 3.2. de la base de données Myla (BioMérieux) pour l'identification des *Legionella* par Maldi-Tof (base de données Maldi-Tof de BioMérieux). Le CNR utilisait la base de données SARAMIS pour identifier les souches environnementales de *L. non pneumophila*. Cette base de données ouverte permettait d'identifier un plus grand nombre d'espèces que la base de données Myla mais présentait l'inconvénient d'être plus sensible à la qualité du dépôt et donc d'avoir des performances technicien-dépendantes. La version 3.2. de la base de données Myla inclue de nouvelles espèces de *Legionella* (18 au total). Nous avons donc comparé les performances de cette base de données par rapport à la base de données SARAMIS.

Au total 43 souches ont été testées dont 39 appartenant aux espèces de la base de données Myla et 4 appartenant à des espèces non connues de la base Myla. 75% des souches ont été correctement identifiées (score d'identification = 99.9) par la base Myla alors que seul 71% des souches étaient identifiées par la base de données SARAMIS (score d'identification ≥85%). Les 4 souches appartenant à des espèces non incluses dans la base de données Myla n'ont pas pu être identifiées par la base de données Myla et 2 d'entre elles ont été identifiées par la base de données SARAMIS avec un score acceptable (≥85%). En base de données SARAMIS, aucune espèce n'a donné de fausse identification. Par contre, en base de données Myla, une souche de *Legionella gormanii* a été rendue *L. pneumophila* avec un score acceptable (99.9).

La base de données Myla est plus facile d'utilisation et présente de meilleures performances que la base de données SARAMIS sur les espèces les plus courantes. Les souches dont les espèces sont absentes de la base de données Myla représentent en 2019 : 2 souches environnementales envoyées au CNR et 0 souches cliniques. Cependant notre étude a montré un cas de mauvaise identification par la base de données Myla qui a rendu *L. pneumophila* au lieu de *L. gormanii*. Il est donc essentiel de confronter les résultats rendus par la base de données Myla aux autres tests réalisés (latex par exemple).

Evaluation de l'ajout du réactif Free DNA Removal Solution (FDRS) dans le kit iQ-Check™ Reference (Biorad) pour la quantification de l'ADN de *Legionella* dans les eaux. Un inconvénient majeur de la méthode PCR pour la quantification de *Legionella* dans les eaux est la détection d'ADN libre, non associé aux bactéries viables. Fin 2018 et en 2019, le réactif FDRS ajouté à la suite à l'étape d'extraction de prélèvements d'eaux et qui a pour but de limiter la quantité d'ADN libre détecté par PCR par une réaction enzymatique a été évalué au CNR en comparaison à la PCR Biorad sans ajout de ce réactif et à la culture sur des échantillons d'eaux chaudes sanitaires. Cette étude a fait l'objet d'un poster à ESGLI 2019, Athènes.

Material and Methods: A total of 101 sanitary hot waters from 7 hospitals were tested using 3 different methods: iQ-Check Quanti *L. pneumophila* and *L. spp.* Real-Time PCR with and without the additional FDRS Method, and *Legionella* Culture. For each method, 100 mL of water samples were filtered. FDRS method includes before the protocol of the Aquadien™ Bacterial DNA Extraction and Purification Kit an extra step of 30 minutes incubation (37°C) after adding 40 µl of FDRS.

Results: The presence and elimination of free DNA by using FDRS method could be suggested for case #1 to #4. For the majority of samples, DNA detection remained positive after FDRS method. However, FDRS protocol resulted in a range from 0,3 to 1,51 log reduction in signal for 34% and 27% of samples for *Legionella* and *Lp* quantification, respectively. Regarding *L. pneumophila*, 11.9% of samples became negative using FDRS step and give the same result than culture method. It has to be noted that no PCR inhibition was observed when using FDRS; moreover, for 13 samples (12.8%) FDRS method removed PCR inhibition observed before use of FDRS.

iQ-Check qPCR (w/o FDRS)	iQ-Check qPCR Test (w/ FDRS)	Culture	Number of samples found (x/101)
-----------------------------	---------------------------------	---------	------------------------------------

				L. spp	Lp
Case #1	+	-	-	2	12
Case #2	+	+1	+	23	14
Case #3	+	+2	-	75	19
Case #4 ₃	+	-	+	0	6
Case #5 ₄	-	-	+	0	3
Case #6	-	+	-	0	6
Case #7	-	-	-	1	41
Total	N/A	N/A	N/A	101	101

^{1,2} Legionella and/or Lp DNA quantification still positive but decreased by >0.3 log in comparison to iQ-Check® qPCR without FDRS (n=31) (₁n=7, ₂n=24); ³ Six culture positive for Lp4 (n=3), Lp5 (n=2) and Lp1 (n=1); ⁴ Three culture positive for Lp5

Conclusion: The results obtained suggest the ability of the fast treatment by iQ-Check FDRS solution to eliminate the free DNA contained in those water samples. The reagent FDRS will have to be evaluated on different types of water, especially complex water samples.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Public Health England et Cardiff University (UK)

En 2019, nous avons initié une collaboration avec Vicky Chalker (Public Health England) et Brad Spiller (Cardiff University) sur la problématique de l'antibiogramme de *Legionella*. Un étudiant en thèse, Edward Portal, a été accueilli et formé à la technique d'antibiogramme par microdilution en milieu liquide (Vandewalle-Capo., IJAA, 2017) réalisée au CNR, afin de comparer les résultats avec ceux obtenus dans leur laboratoire par la technique d'agar dilution sur des souches isolées au Royaume-Uni.

Cette collaboration s'est poursuivie en 2020 et a permis de soumettre une publication commune sur la standardisation des méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour *Legionella* (voir Chapitre 3.3).

Institut Pasteur de Casablanca au Maroc

Transfert des techniques de typage des *Legionella* : PFGE, Mab subtyping, SBT à Abdelwahid Assaidi de l'institut Pasteur de Casablanca au Maroc et analyse des souches par WGS.

2.4. Collections de matériel biologique distribuées

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

En 2019, 34 ADN étalon et 12 contrôles quantitatifs (raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement par le CNR à 12 laboratoires environnementaux dont 2 laboratoires à l'étranger (Japon, Italie) (Figure 1).

En parallèle, l'ADN étalon et les contrôles quantitatifs sont distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard, uniquement dans des laboratoires à l'étranger. Nous envoyons 4 fois par an de l'ADN étalon ou des contrôles quantitatifs à LGC à leur demande.

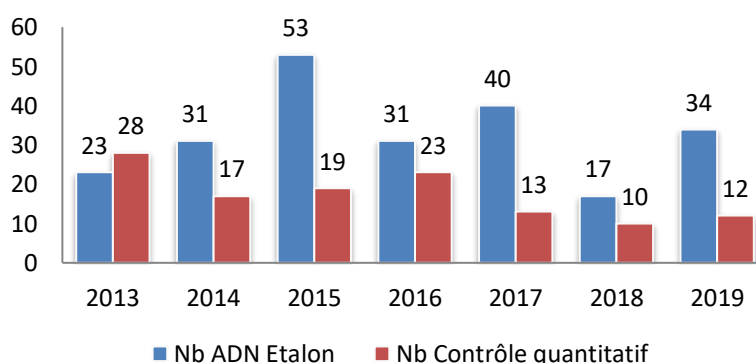


Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2019

Distribution de souches de *Legionella* et échantillons biologiques

Des souches sont distribuées à d'autres CNR ou à des laboratoires académiques pour des travaux de recherche : souche *L. pneumophila* ATCC 12821 envoyée à Maria Luisa Ricci dans le cadre de la mise en place de la recherche de souches antibiorésistantes dans son laboratoire de Rome en Italie ; souches *L. pneumophila* Paris CIP 107629, HL 0709 3014 et LG 0724 5003 envoyées à Julien Verdon de l'Université de Poitiers.

2.5. Activités d'expertise

La synthèse quantitative de l'activité du CNR pour l'année 2019 et son évolution depuis 2015 est présentée en tableau 1.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2015-2019.

Nombre de prélèvements ou souches	2015	2016	2017	2018	2019
EXPERTISE					
Expertise microbiologique (hors protocole de recherche clinique et évaluation de kits)					
Sérologie	1109	944	842	495	349 ₁
Culture de prélèvements cliniques	391	362	451	689	648 ₂
PCR sur prélèvements cliniques	309	284	254	226	213 ₃
Co-culture de prélèvements pulmonaires	252	177	253	434	150 ₄
Expertise antigènes urinaires	41	55	110	131	61
Identification de souches cliniques ₅	346	300	377	489	441
Expertise souches environnementales	515	445	462	472	485
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	9	4	2	5	6 ₆
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	3	3	6	3	4
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	5	7	8	5	103
SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	64	74	65	62	58
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE	604	510	607	349	11 ₇
Isolats <i>Legionella</i> analysés en AP-PCR	-	-	-	-	282 ₈
PCR Lp1			358	459	348
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	223	166	115	91	46
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou WGS)	429	352	440	650	596 ₉
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS	114	228	366	434	517

₁ parmi lesquelles 277 réalisées par technique ELISA et 153 par immunofluorescence ; correspondant à 335 patients.

₂ 101 cultures additionnelles en 2019 pour un protocole de recherche clinique.

₃ PCR réalisées : 162 PCR *L. pneumophila* - *L. non pneumophila* (Diagénodé) et 51 PCR *L. pneumophila* - *L. pneumophila* séro groupe 1 (PCR européenne ESGLI), auxquelles s'ajoutent respectivement 108 et 106 PCR pour un protocole de recherche clinique.

₄ 11 cocultures additionnelles pour un protocole de recherche clinique ; en 2019, analyse réalisée uniquement sur les prélèvements présentant une contamination importante par de la flore oro-pharyngée

₅ 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 2019 et non les souches reçues et analysées au CNR en 2019.

₆ 4 terreaux et 2 eaux d'appareil d'oxygénothérapie

₇ abandon de la technique en 2019 au profit du NGS et/ou de l'AP-PCR

₈ parmi lesquelles 45 souches cliniques et 237 souches environnementales

₉ 261 ont été obtenus après analyse par SBT, 517 obtenus ou confirmés par WGS

2.5.1. 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.

Expertise de prélèvements broncho-pulmonaires

Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour culture est relativement stable par rapport à 2018, en lien avec une incidence de la maladie qui reste élevée en 2019 (2,7/100.000 habitants) en France.

Le nombre de prélèvements qui nous ont été adressés pour PCR poursuit sa décroissance, reflétant le développement des techniques de biologie moléculaire (PCR multiplexe ou spécifique) dans nos laboratoires partenaires (Figure 2).

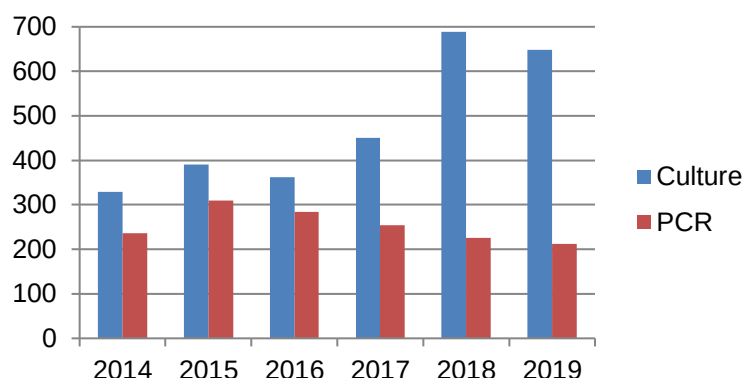


Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2014-2019.

• Culture

En 2019, parmi les 648 prélèvements pulmonaires (patients avec antigène urinaire positif et/ou PCR positive, protocole de recherche clinique exclu) mis en culture sur milieux gélosés, la culture s'est révélée positive pour 262 prélèvements, **soit 40,4%** des prélèvements (dont 7 prélèvements recueillis chez un même patient). La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*, APT) mise en œuvre sur les prélèvements présentant une culture négative a permis d'isoler 4 souches additionnelles. Au total, des légionelles ont été isolées pour 266 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, **soit 41% des prélèvements de patients avec légionellose**. En dehors de l'année 2018 qui avait été exceptionnelle (culture positive dans seulement 31,8% des cas, mais nombre de cas record en France), ce taux est relativement stable par rapport aux années précédentes. Enfin, ces données montrent que sur les 441 souches de *Legionella* isolées en France en 2019, le **CNR a isolé plus de la moitié (255/441, soit 57,8%) des souches disponibles au niveau national**.

• PCR

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

En 2019, le CNR a réalisé 162 PCR à visée diagnostique pour des établissements extérieurs. Parmi celles-ci,

- 106 étaient négatives ;
- **46 étaient positives pour *L. pneumophila* dont 8 seulement pour le sérotype 1 ;**
- **10 étaient positives pour *Legionella non pneumophila* ;** la PCR 23S-5S réalisée dans un second temps a permis d'identifier 2 cas à *L. micdadei*, 2 cas à *L. longbeachae* et 1 cas à *L. anisa*.

La très grande majorité de ces PCR a été réalisée suite à un résultat d'antigénurie négative.

L'ensemble de ces données montre que la PCR peut avoir un grand intérêt en première ou deuxième intention pour diagnostiquer des cas de légionellose, à Lp non sg1 et parfois à Lp1 malgré une antigénurie négative, et renforce la volonté du CNR de promouvoir la PCR.

Expertise de prélèvements urinaires

En 2019, 61 urines correspondant à 54 patients et testées avec différents kits par les laboratoires expéditeurs ont été analysées, dans différents contextes :

- confirmation d'un résultat positif (envoi systématique ou utilisation d'un nouveau kit) (n=34);
- résultats discordants avant et après chauffage ou impossibilité de chauffage (n=10) ;
- résultat douteux (faible positivité par exemple) (n=6) ;
- résultats discordants entre deux antigénuries successives (n=4) ;
- résultats discordants entre deux résultats obtenus avec des kits différents suite à un changement récent de trousse diagnostique (tests BinaxNOW® Abbott, Sofia FIA Quidel, SD Biosensor et UriSign Servibio) (n=4) ;
- résultats discordants entre une lecture à l'œil nu et avec lecteur automatisé (test Abbott) (n=3).

La majorité des résultats obtenus par les laboratoires ont été confirmés (à l'exception des antigénuries très faibles pour lesquelles les conclusions sont difficiles en raison de techniques en limite de détection). Nous n'avons pas identifié de problématique majeure avec l'un des tests actuellement sur le marché.

Le nombre d'urines expertisées est en forte diminution par rapport à 2017 et 2018 qui avaient vu doubler le nombre de demandes au CNR. Cela s'explique d'une part par le nombre croissant de laboratoires ayant désormais un retour d'expérience (en particulier avec les fournisseurs proposant un lecteur automatisé), et d'autre part par un nombre de cas plus étalé dans le temps en 2019 par rapport à 2018 (pic en juin) où de nombreux laboratoires avaient identifié plusieurs cas d'antigénurie positive sur une période restreinte, ce qui avait mis en doute les performances de cette technique diagnostique pourtant fiable.

Expertise pour la sérologie

Conformément à la volonté du CNR de diminuer le nombre de sérum analysés, et en accord avec les recommandations du comité des CNR, la décroissance de l'activité de sérologie au CNR se poursuit : **-29% entre 2018 et 2019, et -69% en 5 ans.**

Pour les laboratoires disposant déjà d'une technique de screening ou sous-traitant le screening à un autre laboratoire, nous privilégions d'emblée une confirmation par immunofluorescence sans refaire de test de dépistage. Dans les cas où la technique de dépistage n'est pas réalisée, nous encourageons les laboratoires à abandonner cette méthode diagnostique ou à faire appel à d'autres laboratoires prestataires.

En 2019, 30 partenaires nous ont fait parvenir des sérums pour diagnostic ou confirmation sérologique, contre 46 en 2018.

Le CNR a réalisé 349 sérologies pour ces laboratoires extérieurs, correspondant à 335 patients : 277 sérologies par technique ELISA comme méthode de screening et 153 sérologies par technique d'immunofluorescence.

Parmi les 277 sérums testés par technique ELISA, 75 étaient douteux ou positifs et ont été expertisés par technique d'immunofluorescence ; 10 étaient positifs.

Parmi les 349 sérums analysés, 11 étaient positifs pour Lp1, et 18 pour les autres sérogroupes (Lp 2-4, Lp5-6 et Lp 7-10). A noter qu'il existe de nombreuses réactions croisées entre les sérogroupes de *Legionella pneumophila* non 1.

2.5.2. Transmission des résultats expertisés

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

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

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

2.6. Activités de séquençage

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

OUI

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

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

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

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

OUI

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

Expertise interne :

La plateforme possède également les ressources pour l'analyse et le stockage des données générées avec plusieurs stations de calcul informatique utilisables à distance, 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 Grenoble) 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 accès aux outils bioinformatiques développés par le service de bioinformatique (BIBS) du Centre de recherche en infectiologie de Lyon (CIRI) ainsi qu'à ceux développés par le service de bioinformatique du LBMC de l'ENS de Lyon.

Le CNR a accès aux formations proposées par le service BIBS du CIRI et le LBMC (formation R, gitlab, Nextflow...)

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

Le CNR utilise de nombreux outils open source inclus ou non dans des pipelines maison (samtools, bcftools, BWA, minimap2, bowtie, fastqc, trimmomatic, SPAdes, Pilon, Snippy, nullarbor, prokka, roary, Parsnp, Figtree, RaxML, Fasttree, seaview, Chewbbaca, unicycler, porechop, guppy, gubbins, albacore, deepbinner...). La DSII a également installé sur un serveur sécurisé le logiciel BIGSDG (open source), permettant notamment la gestion des bases de données NGS et des analyses de type cgMLST. Le CNR met en place conjointement avec la DSII et bioMérieux l'installation du logiciel Bionumerics, celui-ci sera évalué en 2020.

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'épidémies en particulier lorsque celles-ci impliquent des clones de *Legionella pneumophila* non différenciables par les techniques standard.

Surveillance

Le séquençage NGS est également réalisé dans le cadre de la surveillance ; il n'a pas été réalisé sur l'ensemble des isolats cliniques ou environnementaux en 2019, ce qui devrait être le cas pour les souches cliniques en 2020.

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.

Une analyse par cgMLST *ad hoc* peut être réalisée en complément de l'analyse phylogénétique

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

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

Dans le contexte d'investigation d'épidémies ou à la recherche de sources de contamination, 210 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, 307 souches ont été séquencées. La sélection est essentiellement basée sur la disponibilité des appareils de la plateforme ainsi que de notre capacité à détacher du personnel CNR (la plateforme étant sur un autre site des HCL dans la ville, nécessitant que le personnel soit délocalisé pour cette activité sur une journée). A terme notre objectif est d'analyser l'ensemble des isolats cliniques par WGS.

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

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

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

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

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

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

3. Activités de surveillance

Eléments clés en termes de surveillance :

- Plus de 220 partenaires sur tout le territoire Français ; forte interaction avec les Agences Régionales de Santé
- 3% de l'ensemble des cas de légionellose déclarés en 2019 a fait l'objet d'investigations microbiologiques (typage) à la recherche de la source de contamination soit 13% des cas avec souche ; 77% des investigations se sont révélées positives ;
- Augmentation du nombre d'isolats caractérisés par WGS (n=517 ; +18,9%) ;
- Caractérisation d'une épidémie de 28 cas à Strasbourg : confirmation par WGS d'une nouvelle source de contamination, une chaufferie collective à biomasse ;
- De façon constante, 50% des isolats cliniques appartiennent à seulement 9 *Sequence Type* dont ST23,

ST1, ST62, ST259 et ST47 ;

- Augmentation du nombre d'isolats cliniques de *L. pneumophila* sérotype non 1 : x1,6 par rapport à 2018, et x2,9 par rapport à 2017 ;
- Aucune antibiorésistance de *Legionella* n'a été détectée.
- Potentiel intérêt de la PCR sur sérum comme biomarqueur de sévérité

3.1. Description du réseau de partenaires

Nos partenaires sont répartis sur l'ensemble du territoire français. En 2019, **86 partenaires** nous ont envoyé **259 souches cliniques** (Figure 3A). Ce chiffre est inférieur à 2018 qui était une année caractérisée par une incidence de cas élevée (100 partenaires). Comme les années précédentes, ce sont majoritairement des laboratoires de centres hospitaliers qui réalisent la culture. Par son nombre important de laboratoire, Paris est la ville qui nous a envoyé le plus de souches en 2019 (15 souches). Strasbourg qui a connu une année particulière avec un épisode de cas groupés en décembre 2019 était le second partenaire en termes de nombre de souches envoyées (15 souches également). Enfin le laboratoire du centre hospitalier d'Annecy nous a adressé 14 souches. Ceci est à relier à une forte incidence constante sur cette région.

En parallèle, **176 partenaires** nous ont envoyé **648 prélèvements respiratoires** pour mise en culture (diagnostic déjà réalisé par antigénurie et/ou PCR) (Figure 3B). Ce nombre important de prélèvements reçus pour mise en culture semble indiquer une bonne sensibilisation des partenaires. Certains laboratoires nous adressent à la fois des souches cliniques et des prélèvements respiratoires lorsque la culture dans leur laboratoire est en échec, respectant ainsi nos recommandations.

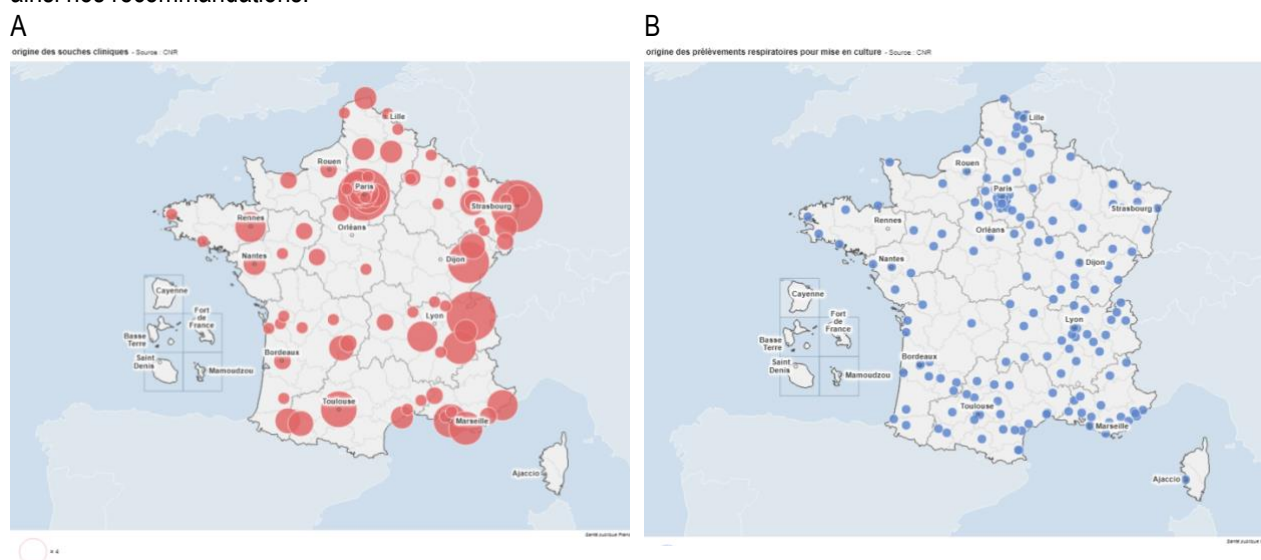


Figure 3. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des souches cliniques (A) ou des prélèvements respiratoires pour mise en culture, le diagnostic de légionellose étant retenu (B).

Le CNR est également sollicité pour l'aide au diagnostic de légionellose. En 2019, **79 partenaires** nous ont envoyé **151 prélèvements respiratoires pour diagnostic** (antigénurie négative ou non réalisée) (Figure 4). D'autres laboratoires que le CNR proposent la PCR *Legionella* sur prélèvements respiratoires et le développement des PCR multiplexes fait que cette technique est de plus en plus accessible à l'ensemble des partenaires sans avoir recours à nos services. Néanmoins, le recours au CNR semble rester d'actualité et l'augmentation du nombre de partenaires par rapport à 2018 (59) signe une sensibilisation des prescripteurs aux infections à *Legionella* autre que *pneumophila* sérotype 1.

De plus, **41 partenaires** nous ont envoyé des **prélèvements d'urines** (Figure 5A) pour expertise et **47 partenaires** nous ont fait parvenir des sérums pour **diagnostic ou confirmation sérologique** (Figure 5B).

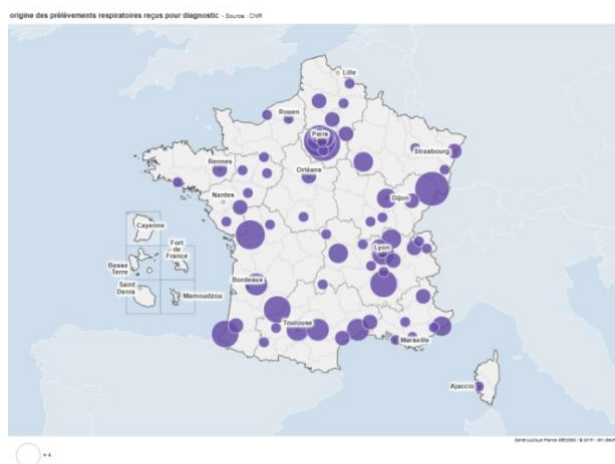


Figure 4. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.

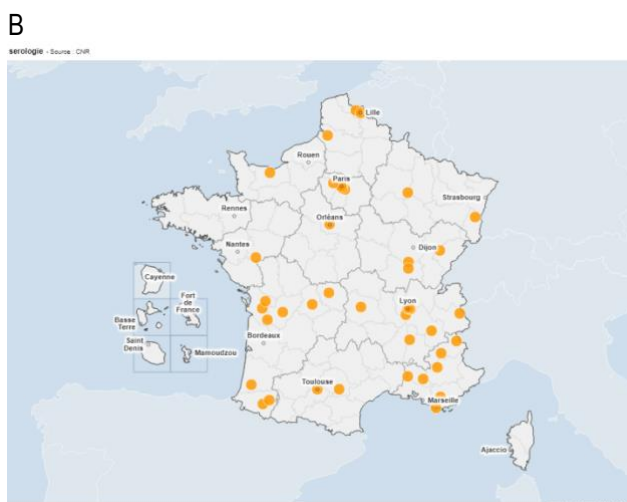
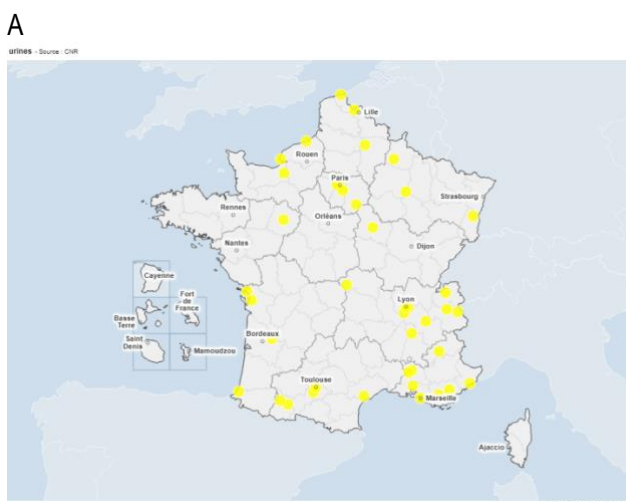


Figure 5. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des urines (A) ou des sérums pour expertise (B).

Par ailleurs, le CNR reçoit des **souches environnementales** pour identification ou comparaison avec une souche clinique dans le cadre d'investigations de cas.

En 2019, 31 partenaires nous ont envoyé des souches environnementales pour identification (Figure 6A) et 48 partenaires nous ont envoyé des souches environnementales pour comparaison avec une souche clinique (Figure 6B). Ces chiffres sont identiques à 2018 et sont représentatifs de la diversité de laboratoires environnementaux qui est plus faible que celle des laboratoires d'analyses médicales.

A

B

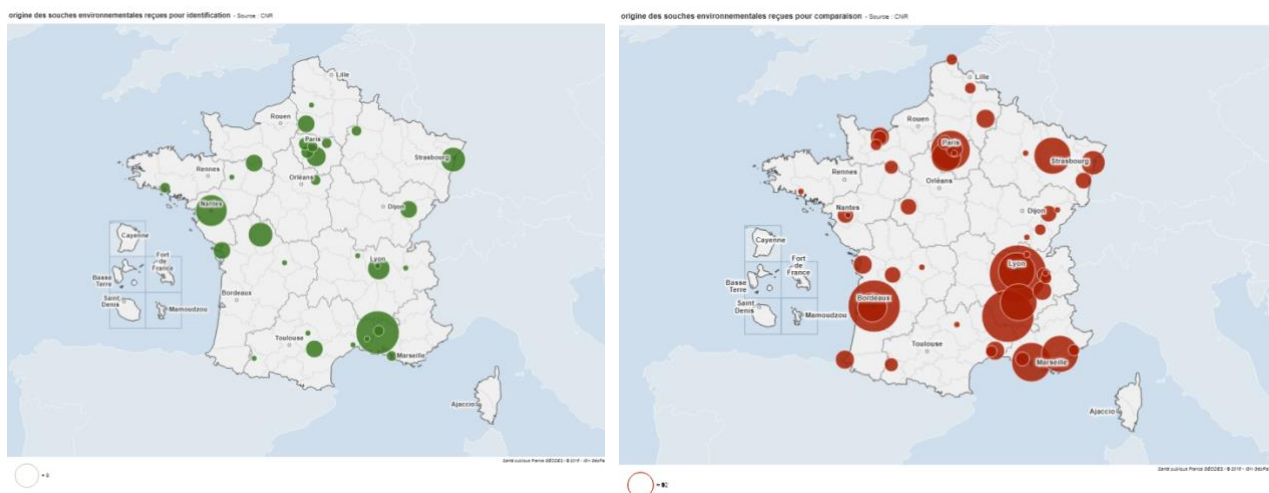


Figure 6. Villes partenaires ayant envoyé en 2019 des souches environnementales pour identification (A) ou comparaison (B).

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 2019, **1 816 cas** de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire. Parmi eux, 16 cas étaient des résidents des DROM (9 à la Réunion, 3 en Guadeloupe, 3 en Martinique et 1 en Guyane) et 37 étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France métropolitaine était de **2,7/100 000 habitants**.

Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2019 était nettement inférieur à celui de 2018 (-15%), année au cours de laquelle un nombre record de 2 133 cas avait été notifié (incidence de 3,2/100 000 habitants) (Figure 7). Bien que le nombre de cas en 2019 soit inférieur au nombre de cas notifiés en 2018, ce nombre reste important et la tendance à l'augmentation s'est poursuivie durant ces 3 dernières années.

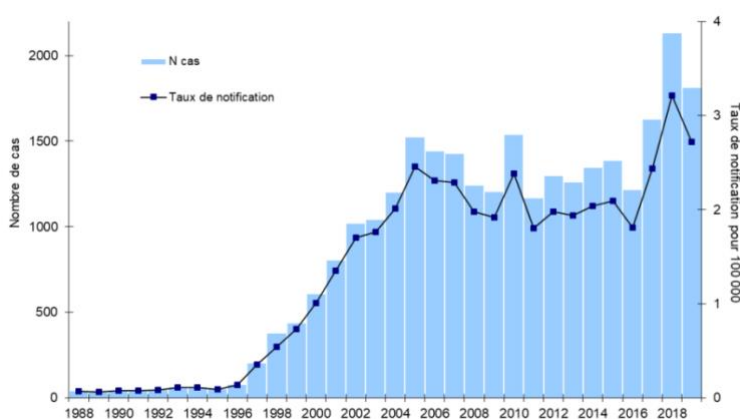


Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2019 (Santé publique France).

Parmi les 1816 cas, 1 769 (97%) étaient des cas confirmés et la détection des antigènes solubles urinaires était la principale méthode diagnostique utilisée (1 716 cas, 94%).

Une **PCR sur prélèvement respiratoire** était positive pour 249 cas (14%), **proportion en augmentation par rapport à 2018** (14% versus 8%, $p < 10^{-6}$). Pour 46 (2,5%) d'entre eux, la PCR était l'unique méthode de diagnostic biologique (versus 39 cas, 1,8% en 2018). Quelques cas ont été uniquement diagnostiqués par culture ($n=13$) ou par sérologie ($n=2$) (Figure 8).

La grande majorité des cas de légionellose (95,4%) était due à l'espèce *Legionella pneumophila* sérotype 1 (Lp1) (1 732/1 816).

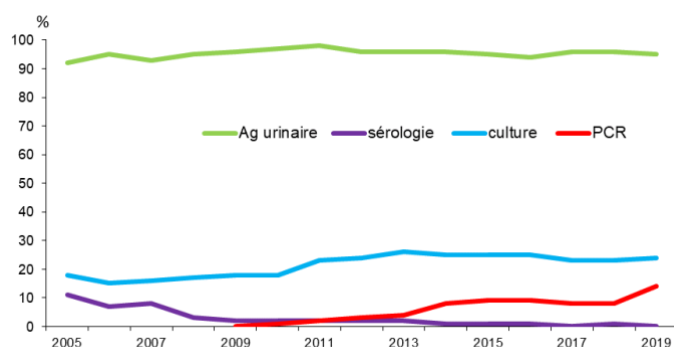


Figure 8. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2019 (Santé publique France).

Le gradient géographique Ouest-Est du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose était marqué, comme observé les années précédentes. L'incidence variait de 1,2/100 000 habitants en Bretagne à 4,8/100 000 habitants en Provence-Alpes-Côte d'Azur (Figure 9).

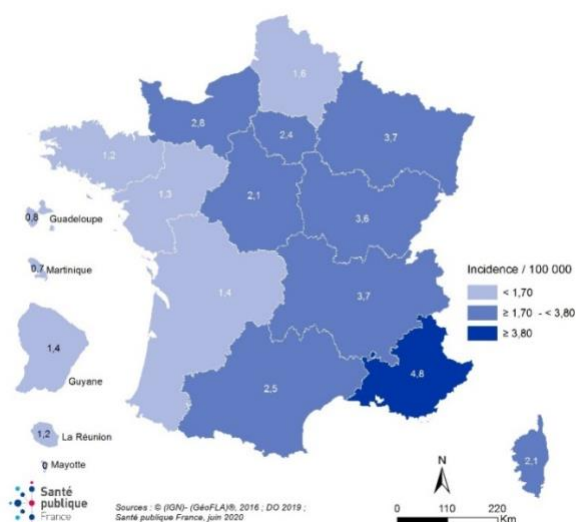


Figure 9. Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2019 (Santé publique France).

3.2.2. Formes cliniques atypiques

Les infections atypiques dues à *Legionella*, notamment extra-pulmonaires, sont surveillées par le CNR. Ces formes sont exceptionnelles mais une veille est importante pour repositionner la place de *Legionella* dans de telles infections. En 2019, nous avons décrit l'implication de *L. pneumophila* dans une fasciite nécrosante fatale (présentation orale acceptée au congrès SFM en 2019 et poster à ESGI 2019 à Athènes).

Confirmation du rôle de *Legionella pneumophila* dans une fasciite nécrosante fatale par la technologie de séquençage MinION. Marine Ibranossyan^a, Christophe Ginevra^{a,b}, Camille Allam^{a,b}, Marie Darien^c, Olivier Harou^d, Laetitia Beraud^a, Florence Ader^{a,b}, Ghislaine Descours^{a,b}, Pierre-Emmanuel Bonnot^e, Sophie Jarraud^{a,b}

Les infections cutanées à *Legionella* sont rares. Nous rapportons ici un cas de fasciite nécrosante à *Legionella pneumophila* sérotype 8 (Lp8) localisée sur une thrombose veineuse profonde (TVP) d'un cathéter d'hémodialyse chez un patient immunodéprimé.

Un homme de 66 ans est hospitalisé en état de choc hémodynamique et insuffisance rénale aiguë ; il est eupnéique mais ne présente aucun signe infectieux. Le patient est rapidement hémodialysé après pose d'un cathéter de Sheldon dans la veine fémorale. Un scanner thoraco-abdominopelvien objective des opacités alvéolaires bilatérales et des masses rétropéritonéales pour lesquelles l'anatomo-cytopathologie conclut à un lymphome B diffus à grandes cellules. A J10, le patient devient fébrile et une TVP de son cathéter est diagnostiquée. La culture conventionnelle du cathéter retiré et les hémocultures restent stériles. La chimiothérapie est alors initiée à J16. A J28, le patient présente une pneumonie avec toux et des crépitations en base gauche. Un érythème persistant autour du point

d'insertion du cathéter s'étend alors rapidement au flanc droit. Une chirurgie agressive de débridement diagnostique une fasciite nécrosante confirmée par l'histologie. Le patient décède d'une défaillance multiviscérale à J32. La culture conventionnelle des biopsies reste stérile. Pour documenter la pneumonie, une PCR *Legionella* réalisée sur le LBA de J31 revient fortement positive ; la culture spécifique isole des Lp8. De manière rétrospective, *L. pneumophila* est mise en évidence par PCR sur les tissus cutanés excisés. L'analyse d'un abcès prélevé au bloc par séquençage 16S MinION (Oxford Nanopore Technologies) identifie Legionellaceae pour 99,6% des 561 458 reads identifiés, sans autre germe pathogène associé et confirme le rôle exclusif de *Legionella* dans cette fasciite nécrosante. Pour objectiver le début de l'infection, des PCR *Legionella* réalisées rétrospectivement sur des sérums prélevés à J16, J19 et J24 montrent des charges croissantes de *L. pneumophila*.

Les fasciites nécrosantes à *Legionella* sont des entités rarement décrites. Deux hypothèses physiopathologiques peuvent être envisagées ici : une inoculation de *Legionella* par le cathéter suivie d'une dissémination hématogène et d'une pneumopathie secondaire, ou plus probablement, une pneumonie à *Legionella* non diagnostiquée à l'admission suivie d'une dissémination hématogène et d'une multiplication au site de TVP du cathéter.

3.2.3. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR

Parmi les 1816 cas de légionellose notifiés en 2019, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 441 cas soit **24,3% des cas**. Ce pourcentage est stable par rapport aux années précédentes (Figure 10).

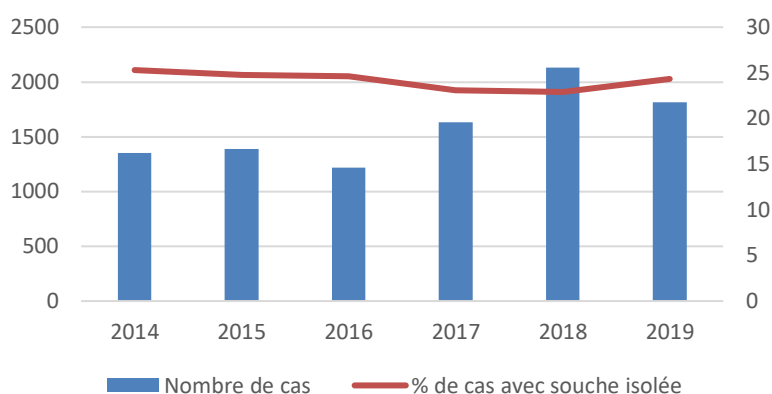


Figure 10. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2011 – 2019.

* **Espèces et sérogroupes des souches cliniques.** Le séroroupe des souches *L. pneumophila* est identifié par agglutination de latex (réactif Oxoïd et Prolab) et/ou immunofluorescence. Les souches *Legionella* non *pneumophila* sont identifiées par séquençage du gène *mip* et, lorsque cela est possible, par MALDI-TOF (Vitek MS). Parmi les 441 souches isolées, la majorité (433/441, 98%) étaient des *L. pneumophila* dont 398 Lp1 et 35 appartenant à d'autres sérogroupes (Tableau 2).

Tableau 2. Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupes de *L. pneumophila*, 2013 – 2019.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements						
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<i>Legionella pneumophila</i>	321	333	342	296	373	478	433
séro groupe 1	305	313	328	281	361	456	398
séro groupe non 1	16	20	14	15	12	22	35
séro groupe 2	2	3			1		6
séro groupe 3	9	6	3	1	5	6	6
séro groupe 4				1			
séro groupe 5	2	1	1				2
séro groupe 6	2	2	4	6	2	5	4
séro groupe 7	1	2	3	1	1		4
séro groupe 8		2		1	1	2	5
séro groupe 10		3	1	3		2	2
séro groupe 12					1	1	
séro groupe 13				1			
séro groupe 14						1	1
séro groupe indéterminé*		1	2	1	1	5	5
<i>Legionella non pneumophila</i>	2	7	4	4	5	11	8
<i>Legionella dumoffii</i>	1				1	1	
<i>Legionella micdadei</i>		1		2		1	
<i>Legionella longbeachae</i>	1	5	2			8	5
<i>Legionella anisa</i>			1		1		
<i>Legionella tucsonensis</i>							
<i>Legionella gormanii</i>					1		
<i>Legionella bozemanii</i>		1	1	1	1**		2
<i>Legionella feeleyi</i>					1		
<i>Legionella cincinnatiensis</i>							
<i>Legionella wadsworthii</i>							
<i>Legionella saintelensis</i>						1	
<i>Legionella maceachernii</i>				1			
<i>Legionella jordanis</i>							1
Total	323	340	346	300	378	489	441

* réaction croisée en immunofluorescence directe

** fièvre de Pontiac

Parmi les **8 cas d'infections à *Legionella non pneumophila*** pour lesquels une souche a été isolée, nous savons que pour 4 d'entre eux c'est un diagnostic positif par PCR *Legionella* spp qui a poussé à faire la culture. Pour un cas, la PCR et l'antigénurie étaient négatives mais la culture a été réalisée. Pour les 3 derniers, nous n'avons pas pu recueillir l'information ; les souches avaient été identifiées dans le laboratoire d'origine par MALDI-TOF, et l'identification a été confirmée par MALDI-TOF et PCR *mip* suivi d'un séquençage au CNR.

Parmi les **35 cas d'infections à *L. pneumophila* séro groupe non 1** avec souche disponible, la souche à séro grouper nous a été adressée directement pour 16 cas ; parmi ces 16 cas, nous savons que la culture a été réalisée suite à une PCR (n=4) ou une antigénurie (n=1) positive. Pour les 19 autres cas, le prélèvement nous a été adressé pour mise en culture au CNR suite à une PCR (n=18) ou une antigénurie (n=1) positive.

Nous observons un **nombre croissant de souches de *L. pneumophila* séro groupe non 1 isolées** depuis 2017, en lien avec l'utilisation croissante de PCR multiplexées ciblant pour la grande majorité uniquement l'espèce *pneumophila*. Cette tendance sera à suivre dans les années à venir.

* Résultats du typage des isolats cliniques

- **Sequence Type (ST).** Un ST 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 2019, parmi l'ensemble des 596 isolats cliniques et environnementaux analysés, le ST de 517 isolats a été obtenu ou confirmé par

WGS. L'ensemble des Lp analysées appartenait à 118 *Sequence Type* (ST) différents. Comme les années précédentes, plus de la moitié des souches appartiennent à 9 STs; l'évolution de ces ST au cours des 5 dernières années est représentée en Figure 11.

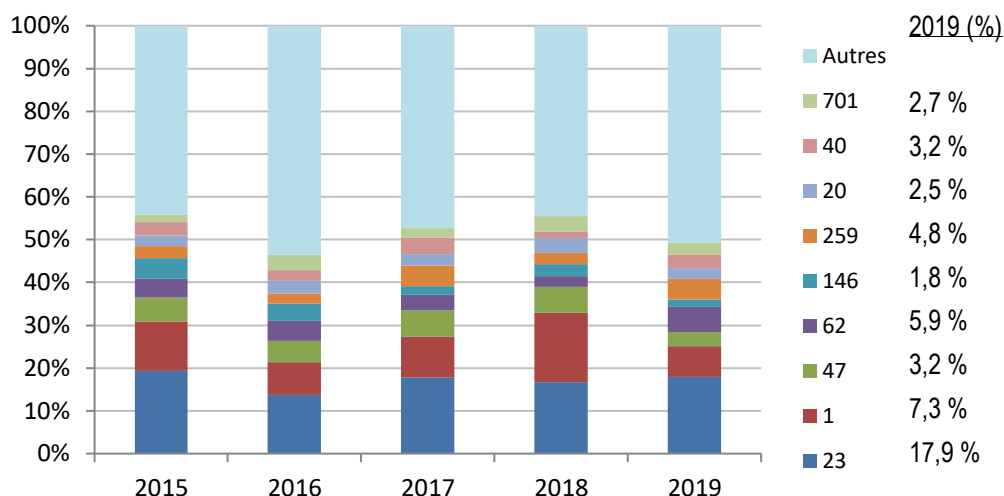


Figure 11. Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2015 à 2019 et représentation de ces STs (en pourcentage) en 2019.

- **AP-PCR.** Notre objectif est de basculer progressivement vers une base de données de souches génotypées exclusivement par WGS. Dans l'attente, toutes les souches cliniques sont typées soit en SBT soit en WGS. Concernant les souches environnementales, nous avons mis en place un premier criblage par AP-PCR de ces souches à tester par la suite en SBT et/ou en NGS si elles présentent des caractéristiques communes avec les souches cliniques correspondantes (pour des raisons de coût). Dans ce contexte, 286 souches ont été typées par AP-PCR en 2019.
- **NGS.** Un total de 517 souches a été analysé par WGS, 210 souches dans un contexte d'investigation à la recherche de la source de contamination et 307 dans le contexte de surveillance (Figure 12) (voir § « 2.6 Activités de séquençage »).
 - Dans le contexte d'investigation, l'analyse NGS soit à l'aide du cgMLST, soit à l'aide d'une analyse phylogénétique plus fine, a été très utile pour discriminer des isolats ST1, 23 et 62 ce qui est impossible par les autres méthodes disponibles (voir § 4.2).
 - Dans le contexte de surveillance, ont été définis le *Sequence Type* (ST) et le *core genome Sequence Type* (cgST) des souches.

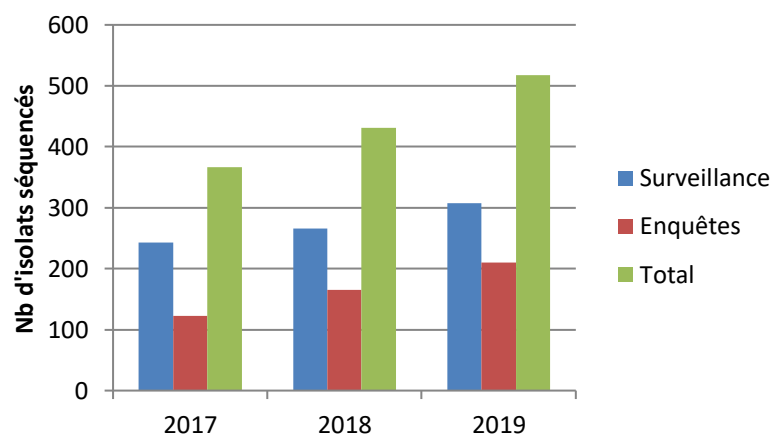


Figure 12. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.

- **Typage en cas de culture négative.** En cas de culture et co-culture ambiante négatives, la technique de SBT nichée ou nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. Cette technique présentant de faibles performances, elle n'est à présent réalisée que de façon ciblée, à la demande des ARS lors d'investigations épidémiologiques et uniquement sur les prélèvements montrant une PCR spécifique Lp1 positive. En 2019, 46 prélèvements ont été analysés par cette technique. Nous avons obtenu un *Sequence Type* (ST) pour 11 prélèvements. Pour 35 autres prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié.

3.2.4. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR

En 2019, 485 souches environnementales ont été envoyées par des laboratoires extérieurs. Les souches environnementales sont adressées au CNR pour identification précise (séro groupe ou espèce) ou typage lors de l'investigation de cas. Parmi ces 485 souches, 443 (91,3%) étaient des *Legionella pneumophila* ; la répartition des sérogroupes est présentée en Figure 13A. Le CNR allemand de Dresden (Christian Luck) ne met plus à disposition les anticorps monoclonaux de l'ensemble des sérogroupes de *L. pneumophila* ; nous utilisons dorénavant des latex monovalents commercialisés (Prolab) expliquant la hausse des sérogroupes non identifiés (14 en 2018 versus 36 en 2019). L'identification des 42 souches d'origine environnementale (8,7%) 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 13B.

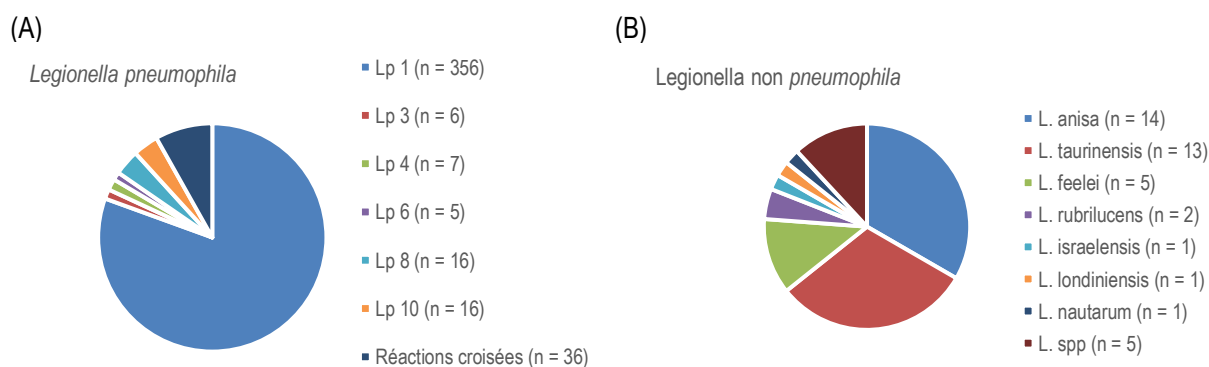


Figure 13. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2019, (A) en terme de séro groupe des souches de *L. pneumophila* ; (B) en termes d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila*.

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

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

• Techniques phénotypiques

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

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20171208.pdf.

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

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

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

• Techniques moléculaires

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

- mutations ribosomiques associées à une résistance aux macrolides (d'après des travaux du CNR, Descours *et al.*, Ribosomal mutations conferring macrolide resistance in *Legionella pneumophila*, AAC, 2017);
- mutations sur l'ADN gyrase associées à la résistance aux fluoroquinolones (d'après la collaboration avec le laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes à Grenoble, CNRS UMR5163, Institut Jean Rouget, M. Maurin et D. Schneider) (2012);
- mutations dans le gène *rpoB* codant la sous-unité de l'ARN polymérase N (cluster I) associées à la résistance à la rifampicine (d'après les travaux du CNR, 2015).

Nous possédons également un outil NGS développé au CNR et présentant une meilleure sensibilité que les outils précédents. Après réalisation d'une PCR en temps réel ciblant les gènes mutés en cas de résistance aux trois familles thérapeutiques (*rpID*, *rpIV*, *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.

Résultats & analyse des tendances

La demande d'étude de la sensibilité aux antibiotiques est peu prescrite par les cliniciens du fait principalement du message énoncé depuis de nombreuses années concernant l'absence de résistance pour *Legionella*. En 2019, le CNR a réalisé 5 antibiogrammes par microdilution pour des souches cliniques isolées de patients en échec thérapeutique à la demande de cliniciens.

Pour permettre néanmoins une veille sur cette antibiorésistance, nous avons été pro-actifs dans le développement de méthodes permettant cette détection.

Cette veille a été réalisée sur une cohorte de patients inclus dans le protocole de recherche PROGLEGIO (voir § 6.1.1.2) afin de vérifier si l'évolution péjorative de la légionellose n'est pas associée à la résistance de *Legionella* aux antibiotiques ou à l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante. La résistance a été évaluée par différentes méthodes : (1) par détermination de la **CMI** en milieu liquide pour les antibiotiques d'intérêt (azithromycine, érythromycine, clarithromycine, ciprofloxacine, lévofloxacine, ofloxacine, doxycycline et rifampicine) pour 98 souches isolées de 58 patients - aucune résistance n'a été mise en évidence pour ces isolats cliniques ; (2) **par recherche de mutation** sur la cible de l'antibiotique d'intérêt sur **les génomes complets** de 86 souches isolées de 56 patients (souche initiale et terminale) - aucune mutation des différentes cibles des antibiotiques d'intérêt n'a été identifiée pour l'ensemble de ces génomes ; (3) **par recherche de mutation** sur la cible de l'antibiotique d'intérêt par PCR directement **sur prélèvements cliniques**, pour s'affranchir de la culture – *gyrA* pour les fluoroquinolones (333 prélèvements / 85 patients), les cibles rRNA *rrl* (47 prélèvements / 38 patients), *rpID* et *rpIV* (38 prélèvements / 38 patients) pour les macrolides et la cible *rpoB* pour la rifampicine (38 prélèvements / 38 patients) - aucune mutation n'a été identifiée pour l'ensemble de ces prélèvements.

De plus dans l'objectif de tester systématiquement l'ensemble des souches cliniques isolées en France, nous avons contacté en 2019 la société Biocentric pour développer une technique standardisée et entièrement automatisée (technique UMIC combinée à un lecteur TECAN). Les gammes d'antibiotiques ont été définies en collaboration avec le CNR des IST bactériennes pour que les microplaques d'antibiogrammes soient adaptées aux *Mycoplasma* et *Legionella*. Cette technique a été évaluée en 2020 au CNR.

L'EUCAST a dès 2017 édité des recommandations sur comment tester la susceptibilité aux antibiotiques de

L. pneumophila. En l'absence de consensus, la méthode retenue a été l'utilisation de la méthode de gradients avec un milieu BCYE du fait de la disponibilité des réactifs. Cette méthode pose deux problèmes, l'utilisation d'un milieu avec du charbon connu pour inhiber l'activité des certains antibiotiques, et du test de gradients dont la reproductibilité fait parfois défaut. Nous avons proposé à l'EUCAST de modifier les recommandations pour la détermination de la CMI de *L. pneumophila* par une méthode en microdilution avec un milieu sans charbon, le milieu LGM. L'EUCAST a donné son accord et attend les résultats de l'évaluation de cette méthode pour la révision du « Guidance document for antimicrobial susceptibility testing of *Legionella pneumophila* ».

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 SpF sont pluri-hebdomadaires (téléphoniques, courriers électroniques, courriers postaux) et ont pour objectifs : de valider les cas de légionellose posant problème ; de discuter 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 sous la forme d'un fichier Excel partagé et adressé sur une interface de partage sécurisé. 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 le courrier des résultats des investigations sur l'interface de partage. Cette information est également transmise par le CNR à l'ARS qui a demandé l'analyse.

En 2019, des **courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF pour **743 patients**. Par ailleurs, de nombreux contacts avec les ARS sont réalisés par messagerie électronique (envoi des demandes de comparaison, demande d'information, demande de résultats,...). En moyenne, 1 à 5 contacts quotidiens sont réalisés par ce moyen.

Une **réunion annuelle SpF/DML – CNR** est organisée pour discuter des analyses communes en cours ou à venir. Elle a eu lieu cette année à Lyon le 17 Octobre 2019 en présence de Daniel Levy-Bruhl, Christine Campese et l'ensemble de l'équipe du CNR.

Avis demandé par SpF concernant la **fiche de déclaration obligatoire** : une discussion a été amorcée concernant notamment les éléments de confirmations biologiques et les facteurs favorisants présents sur la fiche de DO. La PCR pourrait comme cela a été proposé au niveau européen par les membres de ELDSNet devenir un critère diagnostique de légionellose confirmée. A l'inverse, le rôle de la séroconversion pourrait être minimisé.

- **Analyses communes**

* Etude portant sur l'**incidence de la contamination par *Legionella pneumophila* via l'utilisation d'appareil d'apnée du sommeil, ou de machine à pression continue entre 2011 et 2019**. Ce travail a fait l'objet d'un abstract accepté au congrès ECCMID 2020 et une publication est en cours de rédaction.

Legionnaires' disease and sleep apnea devices: retrospective analysis of a 9-year-investigation and contribution of Whole Genome Sequencing

Camille Allam, Christine Campese, Christophe Ginevra, Laetitia Beraud, Aline Prugne, Delphine Morel, Ghislaine Descours, Sophie Jarraud

Background: Legionnaires' Disease (LD) is due to inhalation of *Legionella* contaminated aerosols. Apnea therapy devices are increasingly employed for patients with obstructive sleep apnea and can represent a high risk of contamination with inhalation of aerosolized bacteria if not properly maintained or filled with tap water. However, the incidence of Lp transmission through such medical devices is not well described.

Materials/methods: We report a 9-year retrospective study on sleeping apnea devices (SAD) exposure in LD patients notified in France. The exposition to such devices reported on the mandatory notification and the number of microbiological and epidemiological investigations were collected. *Legionella* PCR and culture of SAD water,

typing using Sequence-based typing (SBT), nested-SBT (nSBT) or whole genome sequencing (WGS) were performed on samples / strains sent to the French National Reference Centre for *Legionella*.

Results: A total of 12 985 LD were reported in France between 2011 and 2019. SAD exposition was indicated for 106 (0.8 %) cases (0 to 1.4% per year). During this period, a comparison between SAD water and clinical samples was requested for 19 cases (18%). Regarding environmental samples, 1/16 *Legionella* culture and 7/12 *Legionella* qPCR were positive. Three comparisons gave results. One of them showed a difference between clinical ST (ST1) and water nSBT (ST36), another showed compatible results between water complete nSBT (ST1) and clinical nSB (6/7 amplified genes). For the last case, we isolated endemic ST23 strains from patient and water samples, and WGS analysis showed they were phylogenetically closely related.

Conclusions: SAD and any aerosolization systems are potential sources of *Legionella* infection if misused but are rarely investigated. We confirmed for the first time by WGS comparison this contamination source. Environmental investigations are often difficult to achieve, SAD water being in insufficient quantity or frequently thrown after device cleaning. However, it is important to mention that tank or rinse water could be better investigated and probably help to resolve the investigation with current qPCR and/or WGS sensitive techniques.

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

- **Expertise & envoi de données**

* Le CNR collabore avec le réseau européen de surveillance des légionelloses **ELDSNet** (European Legionnaires' Disease Surveillance Network) de l'ECDC. Le CNR participe tous les ans aux réunions et aux activités de ce réseau (réunion à Athènes en 2019). Dans ce cadre, S. Jarraud est nommé comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau européen. En 2019, le CNR a notamment participé à la décision d'ajouter la PCR dans la définition des cas de légionellose confirmée au niveau européen.

* Le CNR a participé à la 1^{ère} campagne d'évaluation externe de la qualité proposé en 2019 par l'ECDC. Cet EEQ auquel 34 laboratoires (27 européens et 7 non européens) ont participé permettait l'analyse de 10 échantillons cliniques et de 10 échantillons environnementaux.

* 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 EWGLI (www.ewgli.org). Au total, les données de plus de 3500 souches françaises ont été renseignées sur le site sur un total de plus de 13 000 souches disponibles.

* **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.

- **Collaborations**

* **Collaboration sur le thème de l'antibiorésistance** avec notamment l'Angleterre, de nombreux partenaires européens (Belgique, Suisse, Allemagne, Italie, Danemark), et internationaux (Israël, USA et Canada).

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques et le suivi de l'émergence de la résistance ont été entravés par l'absence de méthodologie et de lignes directrices normalisées et approuvées au niveau international. Une lettre soumise en 2020 dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* a pour objectif d'émettre plusieurs recommandations sur la standardisation de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour *Legionella*, approuvées par la communauté internationale sur *Legionella*, dont les co-auteurs sont issus de divers laboratoires de référence : « *Legionella* antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardization and evidence-based guidance? » Portal, Edward* ; Descours, Ghislaine*; Ginevra, Christophe; Mentasti, Massimo; Afshar, Babarak; Chand, Meera; Day, Jessica; Echahdi, Fedoua; Franzin, Laura; Gaia, Valeria; Lück, Christian; Meghraoui, Alaeddine; Moran-Gilad, Jacob; Ricci, Maria; Lina, Gerard; Uldum, Søren; Winchell, Jonas; Howe, Robin; Bernard, Kathryn; Spiller, Owen; Chalker, Victoria; Jarraud, Sophie (* co 1^{er} auteur).

* **Développement d'une PCR spécifique des *L. pneumophila* séro groupe 1 ST1** applicable directement sur prélèvements. Collaboration avec Israël et l'Angleterre et le study Group ESGLI de l'ECCMID. Publication acceptée en 2020 : Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L,

Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. Clin Microbiol Infect. 2020 Apr. Travaux présentés dans le bilan d'activité de 2018, poursuivis en 2019 pour une publication en 2020.

*** Coordination d'une étude multicentrique européenne du groupe ESGLI sur l'évaluation de 17 kits de détection des antigènes urinaires de *Legionella*** par 9 centres de référence européens, soutenue par l'ESCMID.

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

Afin de formuler des recommandations européennes pratiques sur l'utilisation des tests disponibles sur le marché, le groupe d'étude ESCMID pour les infections à *Legionella* (ESGLI) a proposé aux fabricants commercialisant des tests urinaires *Legionella* de participer à une large étude européenne et multicentrique. Cette étude intitulée « Évaluation de 16 tests de détection qualitative de l'antigène de *Legionella pneumophila* dans des échantillons d'urine de patients atteints de pneumonie » est l'une des 3 études de « Study Group Research Grant » soutenue par l'ESCMID en 2018. Le CNR est l'investigateur principal. L'étude impliquera 9 centres nationaux de référence (France, Pr Sophie Jarraud ; Danemark, Dr Soren Uldum ; Allemagne, Dr Christian Luck ; Suisse, Dr Valeria Gaia ; Royaume-Uni, Dr Vicki Chalker ; Pays-Bas, Dr Sjoerd Euser ; Italie, Dr Maria Luisa Ricci ; Belgique, Dr Fedora Echahidi ; Slovénie, Dr Darja Kese), permettant une bonne représentativité de la diversité des souches de *Legionella* européennes. Cette étude a été initiée en 2018 par l'écriture du projet et envoi à l'appel à projet pour un soutien par l'ESCMID et démarrera en septembre 2020.

***Collaboration avec le CNR de Hollande** (Dr Sjoerd, M. Euser) pour l'investigation de l'épisode de fièvre de Pontiac lié au Spa d'un camping en France (voir § 4.2) : analyse en Hollande d'échantillon d'eau prélevé par les patients hollandais dans le Spa français et envoi pour comparaison et typage en France.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

Parmi les 1816 cas de légionellose diagnostiqués en 2019 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2019), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **56 cas de légionellose**, soit **3,1 %** de l'ensemble des cas et **13%** des cas avec souche disponible. Parmi les 56 cas investigués, les profils génomiques des souches clinique et environnementale(s) se sont révélés **identiques pour 43 cas (77%)** (Figure 14).

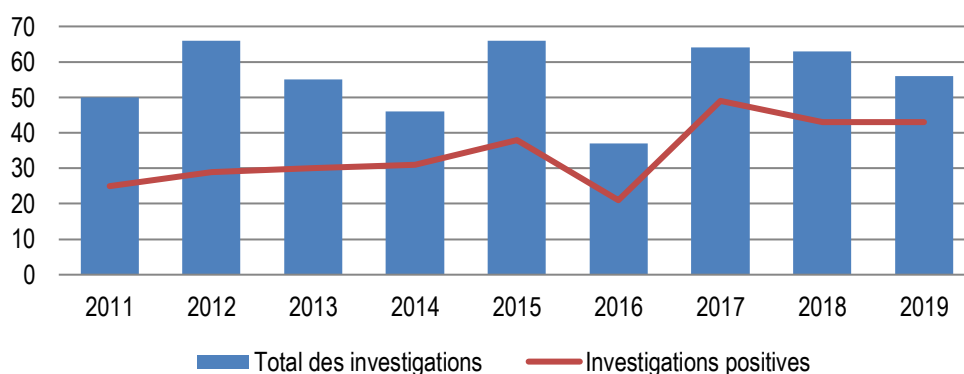


Figure 14. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.

Pour les 56 cas de 2019, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que **les réseaux d'eau sanitaire** étaient la source la plus probable de contamination dans 8 établissements de santé, 10 domiciles, 10 établissements de tourisme, 6 maisons de retraite et 9 autres établissements (Tableau 3).

Comme chaque année, les investigations menées dans les hôpitaux, EHPAD, maisons de retraite ou domiciles des patients montrent des forts taux de conclusion positive quant à la source de contamination (Figure 15). A noter cette année, une concordance dans 100% des cas (10 investigations) pour les établissements de tourisme.

Tableau 3. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2019.

	Investigations positives		Investigations négatives	Investigations totales	
	N	%	N	N	%
Hôpitaux	8	89%	1	9	16%
EHPAD/ MR	6	100%	0	6	11%
Domicile	10	77%	3	13	23%
Tourisme	10	100%	0	10	18%
Autres	9	56%	7	16	29%
TAR	0	0%	2	2	3%
TOTAL	43	77%	13	56	100%

MR : maison de retraite

Parmi les sources potentielles « autres » investiguées, il est à noter :

- un appareil d'apnée du sommeil pour lequel la souche environnementale était identique à la souche clinique ;
- un brumisateurs de terrasse pour lequel la souche environnementale présentait un ST différent de la souche clinique ;
- une fontaine à eau où la souche environnementale était identique à la souche clinique.

Pour l'une des enquêtes positives, il a été retrouvé dans l'environnement 2 souches de *Legionella pneumophila* sérotype 1 différentes : une souche ST664 identique à la souche du patient et une souche ST1. Ce cas illustre l'intérêt d'analyser si possible plusieurs souches environnementales au cours des enquêtes.

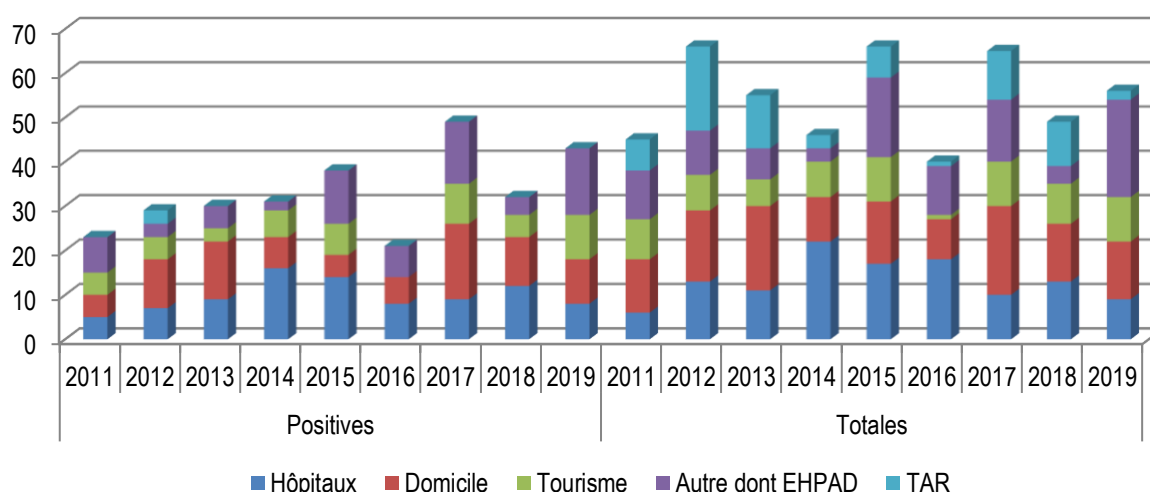


Figure 15. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2019 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête.

Positives = enquête ayant permis d'identifier la source de contamination du patient.

Alors que 77% (n=43) des investigations identifiaient des STs identiques entre isolats cliniques et environnementaux, il est à noter que 44% (19/43) de ces investigations positives impliquaient des ST23 (12 cas) et ST1 (7 cas). Ces ST

étant endémiques en France, il était auparavant difficile de conclure quant à la source de contamination sur les seules données microbiologiques. La réalisation systématique du WGS sur ces souches lors de comparaison permet de renforcer les données microbiologiques. En effet pour l'ensemble des cas décrits ci-dessus, le WGS a permis de conclure que la/les souche(s) environnementale(s) et la souche clinique présentaient le même ancêtre commun le plus proche.

- **Participation à la description des cas de légionellose chez les transplantés d'organes solides**

Le CNR a été sollicité pour participer à la description des cas de légionellose chez les transplantés d'organes solides (étude LEGIOTOS). Une première étude rétrospective observationnelle monocentrique a été réalisée pour les cas de l'Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP, Paris) entre 2000 et 2018. Une étude nationale s'est poursuivie en 2020 par G. Thizy, E. Lafont et D. Lebeaux de l'HEGP en collaboration avec le Pr F. Lanternier et le CNR. Cette première étude monocentrique a fait l'objet d'une présentation à la RICAI en 2019 :

Légionellose chez les patients avec transplantation d'organe solide : étude rétrospective monocentrique de l'HEGP, 2000 à 2018.

G. Thizy, A. Scemla, Sophie Jarraud, David Lebeaux, Jacques Pouchot, Florence Ader, Jean Benoit Arlet, Fanny Lanternier, Emmanuel Lafont.

Objectif – Introduction : La légionellose est une infection grave à laquelle les transplantés d'organes solides (TOS) sont particulièrement exposés. Il existe peu de données concernant la légionellose des TOS (46 cas décrits, série la plus importante 12 patients, aucune donnée française).

Patients et méthodes : Cette étude rétrospective monocentrique rassemble tous les cas d'infections à *Legionella* diagnostiqués à l'Hôpital Européen George Pompidou de 1999 à 2018 chez des TOS, recueillis grâce au codage PMSI. Il s'agit d'un hôpital universitaire de 1160 lits où sont suivis des patients transplantés de rein et de cœur. La légionellose était prouvée en cas de culture de prélèvement respiratoire positive à *Legionella*, d'antigénurie positive ou de sérologie *Legionella* positive.

Résultats : Parmi 11 patients avec légionelloses prouvées, 63% étaient transplantés rénaux (7/11), 18% transplantés cardiaques (2/11) et 18% transplantés rein-pancréas (2/11). L'infection survenait en médiane 12 ans après la greffe [extrêmes 14 jours à 42 ans] et était associée aux soins dans 36% des cas (4/11). Une infection opportuniste dans les 6 derniers mois était retrouvée chez 27% (3/11) des patients. Au diagnostic, l'âge médian était de 59 ans [extrêmes 34-76] ; tous les patients (11/11) étaient sous corticothérapie, 36% (4/11) sous ciclosporine, 36% (4/11) sous Tacrolimus, 63% (7/10) sous mycophénolate-mofétil, et 9% (1/11) sous triméthoprime-sulfaméthoxazole. Au diagnostic, 63% des patients étaient fébriles (7/11), 91% présentaient des symptômes pulmonaires (10/11), 36% des symptômes neurologiques (4/11). L'imagerie thoracique montrait 91% de syndrome alvéolaire (10/11), 73% de syndrome interstitiel (8/11), 36% de pleurésie (4/11), 18% de nodules (2/11). La durée médiane entre le début des symptômes et le diagnostic était de 7 jours [extrêmes 1-13]. L'antigénurie initiale était négative chez 4/11 patients. Parmi eux, un contrôle ultérieur (H48) était positif pour 2 cas. Pour les 2 cas dont l'antigénurie est restée négative, le diagnostic a été posé sur une culture du LBA. Soixante-sept pour cent des LBA étaient positifs en culture (4/6). Au diagnostic, 27% (3/11) des patients recevaient déjà une antibiothérapie anti-*Legionella*. Trente-six pour cent étaient traités par macrolides (majorité de spiramycine) en monothérapie (4/11), 27% par quinolone en monothérapie (3/11), et 36% par bithérapie quinolone/macrolide (4/11) avec une durée médiane d'antibiothérapie de 21 jours [extrêmes 2-114 jours]. Le taux de mortalité à J30 du diagnostic était de 27% (3/11); 73% (8/11) des patients étaient hospitalisés en soins intensifs (SI).

Conclusion : La légionellose en TOS est rare (11 cas en 19 ans dans un centre de transplantation), atypique (18% de forme nodulaire, 18% d'antigénurie négative), et sévère (73% hospitalisés en SI, 27% de mortalité).

4. Alerte

4.1. Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal

La détection de tout phénomène anormal que ce soit dans le domaine clinique (forme atypique, forme persistante, cas chez les nouveaux-nés...), diagnostique (problème de kits), épidémiologique (cas groupés) ou microbiologique (apparition de clones émergents) a conduit à une information de nos correspondants de SpF.

L'alerte de Santé publique France est réalisée par téléphone et associée à un courrier électronique adressé à Christine Campese. Si besoin, la DGS peut être alertée par courrier électronique à DGS-alerte (alerte@sante.gouv.fr).

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

Ne sont exposés ici que quelques investigations les plus « atypiques » de 2019.

Epidémie à Strasbourg (novembre – décembre 2019) liée à un chauffage collectif à biomasse. Cet épisode de 28 cas groupés de légionellose survenus dans la région de Strasbourg a identifié pour la première fois le risque d'une centrale de chauffage à biomasse d'un éco-quartier. Le CNR a réceptionné des échantillons pour 18 patients (prélèvements respiratoires ou ADN) dont les premiers symptômes sont apparus entre le 31 octobre et le 20 décembre 2019. Au total, nous avons pu conclure que 12 patients ont été infectés par une souche de profil ST 62, et pour 2 patients les résultats incomplets étaient compatibles avec un ST 62. Les génomes complets des 9 souches cliniques disponibles pour 9 patients partageaient le même ancêtre commun le plus récent, suggérant source de contamination commune. Après l'expertise de plusieurs sites suspectés (TARs d'Illkirch, Kirm et Cristal Union (souches de profils non ST62) ou de la blanchisserie du CHU de Strasbourg (prélèvements négatifs)), des prélèvements environnementaux ont été réalisés au niveau des **eaux de la chaufferie à biomasse** du quartier des Tanneries où une forte concentration de Lp1 (10^5 - 10^6 UFC/L) a été identifiée. Les 8 souches Lp1 ST62 isolées de l'eau de condensat du bac de relevage partageaient avec les 9 souches d'origine clinique le même ancêtre commun le plus récent (0 à 2 SNPs de différence), confirmant cette source de contamination.

Au cours de cet épisode, des cas inclus avec ST62 ont été enregistrés jusqu'à 5,8 km de la source. Cette chaufferie à biomasse étant en fonctionnement depuis 2016, nous avons répertorié en collaboration avec l'ARS les cas avec souches ST62 disponibles envoyées au CNR par le département 67 entre 2016 et l'épisode de cas groupés de 2019 et nous les avons analysées par WGS. Parmi les 4 cas avec souches ST62 identifiés, les résultats de WGS montrent que 2 ne sont pas liés à la souche environnementale de décembre 2019 (> 6000 SNPs). Les 2 autres appartiennent au même cluster et partagent le même ancêtre commun le plus récent que les souches d'origine clinique et environnementale de l'épisode de cas groupés de 2019 (1 SNP de différence). Ces 2 cas appartenaient à un cluster de 4 cas en janvier 2019 habitant ou séjournant dans la partie Ouest de Strasbourg, pour lesquels les investigations n'avaient pas permis d'identifier la source de contamination (Figure 16).

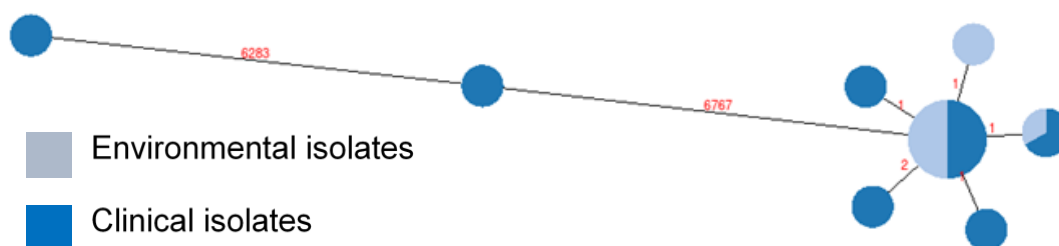


Figure 16. Minimum spanning tree of 21 *L. pneumophila* serogroup 1 ST62. Light blue charts represent environmental isolates from the collective biomass heating plant, dark blue charts represent the isolates from the patients, red numbers represent SNPs.

Cas groupés de fièvre de Pontiac et légionellose - Camping à Béziers. Au mois d'août 2019, le CNR a enquêté sur des cas groupés de fièvre de Pontiac et de légionellose dans le département de l'Hérault. Le 22/08, le CH de Béziers a signalé à l'ARS Occitanie 3 cas de légionellose confirmés par antigène urinaire pour 3 enfants d'une même famille hollandaise (famille A), séjournant en vacances dans un mobile home d'un camping de l'Hérault depuis le 17 août. Le père étant également symptomatique, des prélèvements respiratoires ont alors été envoyés au CNR pour les 5 membres de la famille. La mise en culture des prélèvements respiratoires était négative. Les PCR *Legionella pneumophila* sérogruppe 1 réalisées sur ces prélèvements ont été positives pour les 4 patients symptomatiques et négative pour la mère. Un typage moléculaire réalisé directement sur les prélèvements par Nested-Sequence-Based

Typing (N-SBT) a permis d'obtenir une amplification pour 5 gènes sur 7, uniquement pour l'un des 4 patients, montrant un profil compatible avec un ST 96. En parallèle, a été notifié à l'ARS un cas de légionellose chez un sujet ayant fréquenté le même camping entre le 4 et le 18 août. Le CNR a reçu un prélèvement de crachats qui s'est avéré négatif en culture et PCR. Aucun typage complémentaire et donc aucune comparaison n'a pu être réalisée.

Par ailleurs, les autorités sanitaires des Pays-Bas ont signalé à Santé publique France 4 cas de fièvre de Pontiac parmi les membres d'une autre famille hollandaise (famille B) (antigènes solubles urinaires positifs, sans notion de pneumopathie associée), de retour d'un séjour au camping dans un mobile home avec jacuzzi privatif entre le 3 et le 21 août. Ils connaissaient la première famille hollandaise (famille A) et les deux familles se sont baignées dans le même jacuzzi.

Dans le cadre de la surveillance des cas liés aux voyages, des notifications au réseau ELDSNet ont été réalisées le 22 et le 23 août par Santé publique France pour les 5 cas diagnostiqués en France correspondant ainsi à une situation de « rapid evolving cluster » tel que défini par le réseau ELDSNet. Les médecins de secteur ont été sensibilisés par l'ARS Occitanie à la présence d'une suspicion de cas groupés de légionellose et à l'éventualité de l'apparition de cas, notamment pédiatriques, ce qui est assez rare.

Dans le cadre de l'enquête environnementale, 3 souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 provenant de différents jacuzzis rattachés à des mobile homes individuels ont été analysés par le CNR. Elles présentaient un *Sequence Type* (ST) : 96. Ce profil comporte 5 gènes identiques à celui de la souche responsable de l'infection chez un des cas cliniques, ce qui nous a amené à conclure que cette source de contamination était vraisemblable. Le CNR a également reçu et analysé une souche de *L. pneumophila* séro groupe 1 du CNR des *Legionella* de Hollande provenant d'un jacuzzi dont un échantillon d'eau avait été conservé par la famille A. Le typage épidémiologique de cette souche a été réalisé par *Sequence-Based Typing* (SBT). Elle présentait aussi un *Sequence Type* (ST) : 96.

Suspicion de cas groupé de légionelloses sur la commune de Rochefort ; juin 2019. Plusieurs cas de légionelloses ont été signalés ayant un lien avec la ville de Rochefort (passage aux thermes ou domicile) en juin 2019. En tout, 4 cas, dont 3 ayant fréquenté les thermes et le 4^{ème} domicilié à Rochefort ont été notifiés. Un seul prélèvement pulmonaire a été reçu au CNR, et a permis d'isoler des Lp1 ST47. Concernant l'enquête environnementale, les autocontrôles de l'établissement thermal ont été étudiés et tous étaient conformes. Plusieurs autres sites ont été ciblés notamment la lagune du conservatoire littoral et du bassin pluvial (négatifs en PCR), l'eau du brumisateur sortie aspergeur, le centre horticole municipal (PCR Lp1 positive, mais aucun Nested-Sequence-Type n'a pu être obtenu). Au total, ni le caractère groupé sur le plan microbiologique, ni la source de contamination n'ont pu être confirmés pour cet épisode.

Légionellose à *Legionella longbeachae* en 2019. Nous avons identifié par culture à partir de prélèvements cliniques 5 souches de *L. longbeachae* et identifié 1 autre cas à *L. longbeachae* par séquençage du gène ciblant l'espace intergénique 23S-5S directement sur prélèvement.

Les cas provenaient des régions Ile-de-France (2 patients en provenance de Créteil) Auvergne Rhône Alpes (Lyon), la Réunion (Saint-Denis de la Réunion), Occitanie (Sète) et pays de la Loire (Le Mans). Pour 2 de ces patients, nous avons eu notion d'une activité de jardinage et nous avons reçu et analysé des prélèvements de compost et de terre prélevés dans le jardin de leur domicile. Nos techniques actuelles de culture ne nous ont pas permis d'isoler de *L. longbeachae*, malgré le recours à une décontamination des prélèvements par acidification et chauffage et à une co-culture amibienne. Sur un des prélèvements, une technique de PCR a été réalisée et a permis d'identifier la présence d'ADN de *Legionella* sans pouvoir conclure quelle(s) espèce(s) étaient incriminée(s). Les souches cliniques n'ont donc pas pu être comparées à une éventuelle souche environnementale ce qui **n'infirme pas une éventuelle contamination par cette source**, *L. longbeachae* étant connue pour être associée à la manipulation de composts de plantes ou de terreux. De plus les données de la littérature rapportent que la diversité des souches *L. longbeachae* dans un même environnement rend souvent compliquée l'interprétation des données génomiques.

Nous avons été en contact étroit avec les différentes ARS sur les questions de prévention du risque de contamination pour des patients pour lesquels le jardinage était une activité importante. Nous avons contacté le CNR d'Irlande (Diane Lindsay), expert sur cette thématique en Europe diagnostiquant de nombreux cas à *L. longbeachae* pour connaître leurs recommandations sur ce point. Elles reposent principalement sur quelques conseils d'hygiène simples concernant le stockage et la manipulation du compost, et le mélange de rempotage pour les patients à risque : il est recommandé le port de masque anti-poussière, de gants, le lavage des mains à la fin des travaux, et l'ouverture des sacs de compost dans des endroits bien ventilés.

Cas relié à un diffuseur d'arôme. Suite à un cas de légionellose, le CNR a reçu et analysé une souche de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 isolée d'un réservoir d'eau dans un **diffuseur d'arôme** probablement rempli

par la patiente à son domicile. Les souches cliniques et environnementales présentaient un « ST1 » dont l'analyse phylogénétique par WGS a permis d'identifier un ancêtre commun le plus récent. Un résumé à propos de ce cas a été accepté pour ECCMID 2020.

A home humidifier responsible for Legionnaires' disease: input of WGS for genomic investigation in a ST1 case. Jeanne Couturier, Christophe Ginevra, Gil Dhenin, Sarah Jolivet, Didier Nesa, Latifatou Boukari, Murielle Maison, Sandra Lapoussin, Béatrice Salauze, Sophie Jarraud, Frédéric Barbut, Ghislaine Descours.

Background: The *L. pneumophila* ST1 clone has been shown to colonize hospital water networks worldwide and to be often implicated in nosocomial Legionnaires' disease (LD) cases. Here, we describe the contribution of Whole Genome Sequencing (WGS) for resolving investigation of a 60-year-old woman ST1 LD case after a 14-day hospitalization for a pulmonary pre-transplant evaluation.

Materials/Methods: To investigate this case, sputum was cultured and the potential sources of exposure, i.e. hot water from shower and washbasin of the 2 rooms attended by the patient, were cultured according to NF T90-431 standard. The history revealed the use of a home humidifier filled with tap water from her home, which she kept during her hospitalization period; the patient claimed that she had not used hospital tap water on this humidifier while hospitalized. The water tank that had not been thrown at the time of LD diagnosis was cultured.

Results: The sputum grew *L. pneumophila* serogroup 1 (Lp1). The 4 hospital water samples tested negative for *L. pneumophila* (< 10 CFU/L), as all samples that had been tested coincidentally at the onset of symptoms and for 2 years on the building water network (hot water outlet and return, and points of use). The water of the humidifier tank grew Lp1 (300 CFU/L). The clinical and environmental strains were analysed by Sequence-Based Typing; both were ST1 strains. We could not formally conclude on the source of infection as ST1 strains are widespread and account for 10% of LD cases. The strains analysis was complemented by Whole Genome Sequencing, the mapping of sequence reads and phylogenetic analyses being performed as described by David *et al.* (CID, 2017). They showed a same common ancestor, with no SNP.

Conclusions: We report a health-care associated ST1 LD case related to use of a domestic humidifier filled with patient's home water before hospitalization. Such sources have been rarely described (n=4), and the increasing use of aerosolizing devices would require special attention when investigating LD cases. Combined with medical history and epidemiological data, WGS was determinant to resolve the investigation.

Cas de Légionellose chez un membre du personnel soignant d'un EHPAD. Nous rapportons la contribution conjointe de l'investigation clinique et des données microbiologiques de Whole Genome Sequencing (WGS) pour l'investigation d'un cas de légionellose chez un membre du personnel soignant d'un EHPAD réalisant les toilettes et l'entretien des locaux. Un résumé a été soumis au congrès SF2H 2020.

Cette investigation faisait suite à la situation environnementale dans l'EHPAD. Le réseau d'eau chaude sanitaire (ECS) et d'eau froide (EF) était contaminé par *Legionella pneumophila* séro groupe 1 depuis plusieurs années avec des taux atteignant 250 000 UFC/L dans l'eau froide au niveau des points d'usage dans les chambres des patients. Des travaux de rénovation du réseau avaient été réalisés et terminés un an avant le cas de légionellose avec persistance d'une contamination faible dans l'eau froide dont la température pouvait atteindre 25°C en dehors de l'hiver.

Matériel et Méthodes : Suite à ce cas, les mesures de prévention de la légionellose mises en place au sein de l'EHPAD ont été évaluées. Afin d'investiguer ce cas diagnostiqué par une antigénurie *Legionella* positive, la culture d'expectorations a été réalisée et deux potentielles sources de contamination, l'ECS prélevée au niveau des douches de 2 chambres distinctes de l'EHPAD a été mise en culture selon la norme NF T90-431. Les souches isolées ont été typées par Sequence-Based Typing (SBT) et Whole Genome Sequencing (WGS).

Résultats : Les mesures de prévention en place au moment de la contamination du cas consistaient en la sécurisation des douches par filtration terminale, des directives de réalisation de la toilette dans la chambre avec obligation de remplir une bassine d'eau mitigée avec le point d'eau de la salle de bain et de ne pas laisser couler l'eau pendant la toilette. L'interrogatoire du patient hospitalisé pour analyse de la situation d'exposition professionnelle a montré une très mauvaise application des mesures de prévention recommandée : réalisation des toilettes de patients en laissant couler l'eau en permanence dans la salle de bain avec la porte fermée en moyenne pendant 20 minutes. Les données microbiologiques ont montré que la souche Lp1 clinique ainsi que les 2 souches Lp1 environnementales isolées de l'ECS au niveau des 2 douches appartenaient au ST23. Ce ST étant endémique en France et responsable de plus de 10% des cas de légionellose, ces résultats ne permettaient pas de conclure quant à la source de contamination. Le séquençage du génome complet (WGS) des souches a permis de montrer que ces 3 souches étaient reliées phylogénétiquement et possédaient le même ancêtre commun ce qui était en faveur de cette source de contamination.

Conclusion : Ce cas de légionellose associé aux soins montre la réalité de la contamination à partir de l'eau froide et l'importance de la vérification de l'application des mesures de prévention opérationnelles par le personnel soignant.

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**

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

- Edward Portal (Cardiff University, Royaume-Uni) : transfert de la technique d'antibiogramme par microdilution développé au CNR aboutissant à une publication commune associant l'ensemble des partenaires européens soumise dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (en 2020)
Legionella antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardization and evidence-based guidance?
Portal, Edward ; Descours, Ghislaine; Ginevra, Christophe; Mentasti, Massimo; Afshar, Babarak; Chand, Meera; Day, Jessica; Echahdi, Fedoua; Franzin, Laura; Gaia, Valeria; Lück, Christian; Meghraoui, Alaeddine; Moran-Gilad, Jacob; Ricci, Maria; Lina, Gerard; Uldum, Søren; Winchell, Jonas; Howe, Robin; Bernard, Kathryn; Spiller, Owen; Chalker, Victoria; Jarraud, Sophie.
- Abdelwahid Assaidi (Institut Pasteur de Casablanca, Maroc) : transfert des techniques de typage des *Legionella* (PFGE, Mab subtyping, SBT et WGS).
 - o Abstract pour ECCMID 2020 en collaboration avec l'université Sultan Moulay Slimane, Faculty des Sciences et des Techniques, Beni Mellal, Maroc, et l'Institut Pasteur du Maroc:
Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Legionella pneumophila* in hot water systems in Morocco. Abdelwahid Assaidi, Mostafa Ellouali, Hassan Latrache, Hafida Zahir, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Mostafa Mliji

- **Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**

En 2019, le CNR n'a pas élaboré de guide ou de recommandations spécifiques.

- **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 (743 courriers en 2019).

*Site internet : 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 et internationale de cet étalon. Les bilans d'activité annuels et quadriennaux ainsi que les informations concernant les congrès organisés par le du CNR sont disponibles.

*Publications didactiques en Français (voir chap. 6.2.1) et présentations des données dans des congrès Français (RICAI, SFM, SF2H, JNI ...)

* Publication commune avec SpF des données de surveillance dans BEH : La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018. Christine Campèse (christine.CAMPESE@santepubliquefrance.fr), Ghislaine Descours, Sibylle Bernard-Stoecklin, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaelle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. 11 Fev 2020, BEH 4.

*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**

JPIAS 2019 – Journée de Prévention des Infections Associées aux Soins – Présentation orale intitulée « prévention du risque lié aux légionelles, point sur la légionellose nosocomiale et cas pratiques » (16 mai 2019, C. Allam)

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

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

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

Courrier de réponse individuel et spécifique pour chaque souche d'origine clinique et chaque investigation (743 courriers en 2019).

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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

EUCAST - Membre du Steering committee de l'EUCAST (Gérard Lina)

ESCMID – ESGI - forte implication au groupe d'étude ESGI (ESCMID Study group for *Legionella* Infections). Membre du comité exécutif (trésorière, S. Jarraud). Participation au comité scientifique du congrès ESGI organisé à Athènes en septembre 2019.

OMS-Europe, CEE-NU. Participation en tant qu'expert à la 5^{ème} réunion des Parties du Protocole sur l'eau et la santé où sont invités les ministres de la santé et de l'environnement des 53 pays de la région Europe le 19-21 Nov 2019, Belgrade, Serbie. Au regard des données épidémiologiques les membres du bureau du Protocole ont mis en avant lors d'un *side-event* le sujet *Legionella* et légionellose. Le CNR a participé au *side-event* en tant qu'expert et représentant l'Europe avec une courte intervention: *Legionella* bacteria surveillance in France and Europe.

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

Conférence master Class Pall, 24 Sept 2019 « conception, réalisation, surveillance et sécurisation des réseaux d'eau des établissements de santé », Hotel Golden Tulip Lyon Eurexpo – La légionellose en chiffre, 2018 (S. Jarraud).

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 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les activités de recherche du CNR sont en lien avec l'équipe Pathogénèse des légionelles (Resp. Patricia Doublet, Co-resp. Sophie Jarraud) du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI, <http://ciri.inserm.fr>), dont 5 membres du CNR sont affiliés. Les projets de l'équipe sont centrés sur deux axes principaux, l'axe 1 sur des aspects de physiopathologie et génétique des populations et l'axe 2 sur l'étude des mécanismes moléculaires régulant le cycle infectieux de *Legionella pneumophila*.

Ne sont présentés ici que quelques travaux ayant un lien direct avec les missions du CNR avec pour origine des travaux les observations du CNR tant sur le plan clinique, diagnostique que caractéristique des souches.

6.1.1. **Etudes démarrées ou en cours en 2019**

6.1.1.1. **Légionelloses persistantes ou récidives**

Depuis quelques années, plusieurs cas de récurrence ou persistance de légionellose (sur plus de 2 mois avec des *Legionella* encore isolées de prélèvements pulmonaires) ont été signalés au CNR. Nous avons réalisé une description précise des caractéristiques cliniques et des facteurs associés aux patients en récurrences ou en échecs thérapeutiques de légionellose. Ce travail avait été présenté dans le bilan 2018. La description a été soumise en 2019 dans la revue Clin. Infect. Dis. et acceptée en 2020 : **Slowly resolving or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review**. Cécile Pouderoux, Christophe Ginevra, Ghislaine Descours, Anne-Gaëlle Ranc, Laetitia Beraud, Sandrine Boisset, Anne Conrad, Anne Bergeron-Lafaurie, Nicolas Magand, Sophie Jarraud, Florence Ader.

Impact : Douze cas de légionellose communautaire d'évolution lente ou non résolue sur 1686 cas avec culture positive (2013-2017) ont été décrits, définis comme ayant des symptômes cliniques persistants, des anomalies au CT-Scan et une détection de *Legionella* dans des échantillons respiratoires par culture et/ou par PCR >30 jours après l'apparition des symptômes. Sur le plan clinique, 9 patients se sont rétablis temporairement avant une nouvelle détérioration (intervalle médian [IQR] sans symptômes, 30 [18-55] jours), 3 patients ont eu des symptômes uniformément persistants (temps médian [IQR], 48 [41,5-54] jours). Deux patients ont eu plus de deux récurrences. Ces persistance ou récurrences apparaissent chez des patients immunodéprimés, pouvant être associé à un abcès pulmonaire et un empyème. Cette description est cohérente avec les recommandations de traitement par bi-thérapie des patients immunodéprimés pendant 21 jours. L'incidence est probablement sous-estimée car elle ne prend en compte que les légionelloses pour lesquelles la (les) culture(s) étai(en)t positive(s).

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

Il s'agit d'une grande étude nationale interventionnelle prospective coordonnée par le CNR dans le cadre du Programme de Recherche Translationnelle en Santé co-financé par l'ANR et la DGOS. L'objectif est d'identifier des marqueurs bactériens et d'hôte associés à l'évolution péjorative de la légionellose. Ce projet associe une recherche clinique et une recherche plus fondamentale. L'étude distingue deux groupes de patients, les patients hospitalisés en Unités de Soins Intensifs (USI) et ceux en hospitalisation simple. Une comparaison des paramètres est mesurée à J0 entre les patients dont la légionellose est classée sévère et non sévère. Un suivi longitudinal (clinique et biologique) est réalisé pour les patients hospitalisés en USI. Un total de 15 centres investigateurs participe au niveau national.

Parmi les marqueurs de sévérité, nous étudions :

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

En mars 2020, 100 patients ont été inclus dans l'étude et un total de 1279 échantillons dont 696 échantillons respiratoires ont été analysés et stockés au CNR.

Sont présentés ici quelques résultats issus du CNR pouvant avoir un impact direct sur la compréhension de la physiopathologie de l'infection et sur les préconisations du CNR.

1. L'évolution péjorative de la légionellose n'a pas été associée à une résistance de *Legionella* aux antibiotiques ou à l'émergence pendant le traitement d'une population de *Legionella* résistante. La résistance a été évaluée pour 98 souches (58 patients) par méthode phénotypique (macrolides, fluoroquinolones, doxycycline et rifampicine) et par recherche de mutations sur la cible de l'antibiotique d'intérêt (gènes *gyrA*, *rrl*, *rplD* et *rpN*, *rpoB*) sur les génomes complets (souche initiale et terminale) et par PCR directement sur prélèvements cliniques. Aucune résistance phénotypique ni mutation des différentes cibles testées n'a été mise en évidence. Plus globalement nous n'avons pas identifié d'évolution des génomes de *Legionella* au cours de l'infection : ni SNPs, ni réarrangements chromosomiques ou d'événements de recombinaison entre les souches initiales et terminales (Illumina Nextseq500 ou technologie Nanopore) (données inclus dans § 3.3).

2. Les patients sévères ont des taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons et le sérum en phase initiale significativement supérieurs aux autres patients. La PCR *L. pneumophila* était positive pour 85% (77/91) des échantillons pulmonaires à la phase initiale (J0 = 0 à 3 jours après le diagnostic) et une persistance de la culture et de la détection de l'ADN jusqu'à J14 ou plus pour les patients les plus sévères. Les patients les plus sévères (score SOFA ≥ 5) avaient des taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons supérieurs aux autres patients à J0 et les taux d'ADN sériques étaient corrélés à la quantité d'ADN au niveau du site de l'infection. De façon intéressante, les patients avec une PCR sérique positive (32%, 90/93) présentaient un score SOFA significativement supérieur (5 vs 2, sur $n=67$, $p = 0,001$) aux patients avec une PCR négative ; la positivité de la PCR sérique pourrait être un biomarqueur simple pour identifier les patients les plus sévères. Néanmoins, la charge bactérienne ne semble pas expliquer à elle seule la sévérité de l'infection (résultats en partie présentés au congrès RICAI 2019 et ESGI 2019).

3. Une « tempête cytokinique » initiale au niveau systémique est associée à la sévérité de la légionellose. Le dosage de 19 cytokines circulantes à J0 ($n=66$) et J5 ($n=19$) après le diagnostic montre une sécrétion significativement plus intense pour les patients sévères (score SOFA ≥ 5) des chimiokines (MCP1 et MIP1b) et des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8 et TNF α). L'immunité adaptative est également affectée avec un niveau significativement plus élevé de cytokines Th-1 (TNF α et IFN γ), et Th-17 (IL17). Au contraire, la sécrétion de cytokines Th-2 (IL4, IL5 et IL13) est identique ou plus faible chez les patients sévères. Les résultats préliminaires semblent indiquer une augmentation de certaines cytokines à J5 chez les patients les plus sévères, que nous investiguons (résultats en partie présentés au congrès ESGI en 2019 et SFM 2019).

4. Etude de l'évolution du microbiote lors des légionelloses. Suite à la description des légionelloses persistantes, une collaboration avec l'équipe Biologie des Bactéries Intracellulaires (C. Buchrieser, CNRS UMR 3525, Institut Pasteur, Paris) a permis de décrire la dynamique du microbiome pulmonaire (bactéries, archées, champignons et protozoaires) au cours de légionelloses persistantes sur plusieurs semaines ainsi que son évolution pendant le traitement antibiotique par l'analyse de 11 échantillons (9 BAL, 1 expectoration et 1 abcès pulmonaire) issus de 3 patients. Le microbiome était caractérisé aux premiers stades de l'infection par une forte prédominance de l'agent pathogène *Legionella* (~75% de la diversité totale), une faible diversité de la fraction bactérienne et une présence accrue de microorganismes opportunistes. Au cours de l'antibiothérapie, le microbiome ne se rétablit pas rapidement avec une prévalence de micro-organismes opportunistes et/ou résistants aux antibiotiques ainsi que de champignons souvent associés aux infections, qui pourraient tirer parti des réponses inflammatoires de l'hôte induites par l'infection. L'identification pour la 1^{ère} fois d'archées et de protozoaires (incluant *Acanthamoeba*, hôte environnemental naturel des *Legionella*) dans tous les échantillons suggère qu'ils pourraient également jouer un rôle dans le pronostic de l'infection. Cette étude a débuté en 2018, s'est poursuivie en 2019 pour une publication en 2020 dans *mBio* : Persistent Legionnaires' Disease and Associated Antibiotic Treatment Engender a Highly Disturbed Pulmonary Microbiome Enriched in Opportunistic Microorganisms. Ana Elena Pérez-Cobas, Christophe Ginevra, Christophe Rusniok, Sophie Jarraud, Carmen Buchrieser.

L'analyse de 183 échantillons (15 LBA, 42 expectorations et 125 aspirations trachéales) issus de 50 patients de l'étude ProgLegio est en cours dans l'objectif d'identifier un potentiel microbiote associé à la sévérité des légionelloses.

Enfin, l'étude du virome au cours des légionelloses, totalement inconnu à ce jour, et de sa dynamique a été initiée par l'étude de 64 échantillons respiratoires (à J0 et en suivi longitudinal) selon un protocole adapté du protocole NetoVIR (Novel enrichment technique of VIRome). Des données préliminaires obtenues lors des étapes d'optimisation indiquent de façon intéressante la présence de virus opportunistes comme des *Circovirus*,

Papillomavirus ou des *Anellovirus*, ces derniers pourraient constituer de potentiels biomarqueurs du statut d'immunodépression des patients.

6.2. Liste des publications et communications de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Publications nationales

1. Cattan S, Thizy G, Michon A, Arlet JB, Lanternier F, Lebeaux D, Jarraud S, Pouchot J, Lafont E. *Legionella* spp: An update. Rev Med Interne. 2019 Dec;40(12):791-798.
2. Hugo Testaert, Florence Ader, Sophie Jarraud. Legionelloses EMC Maladie Infectieuse, Juillet 2019, Ed Elsevier Masson SAS 2019 ; [8-021-A-10] - Doi : 10.1016/ S1166-8598(19)86672-3
3. La légionellose en France: importante augmentation du nombre de cas en 2018. Christine Campèse (christine.CAMPESE@santepubliquefrance.fr), Ghislaine Descours, Sibylle Bernard-Stoecklin, Laetitia Beraud, Catherine Maine, Anne-Gaelle Ranc, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. 11 Fev 2020, BEH 4.

6.2.2. Publications internationales

4. Ibranosyan M, Beraud L, Lemaire H, Ranc AG, Ginevra C, Jarraud S, Descours G. The clinical presentation of *Legionella* arthritis reveals the mode of infection and the bacterial species: case report and literature review. BMC Infect Dis. 2019 Oct 21;19(1):864.
5. Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. Clin Microbiol Infect. 2020 Apr.
6. Poudroux C, Ginevra C, Descours G, Ranc AG, Beraud L, Boisset S, Magand N, Conrad A, Bergeron-Lafaurie A, Jarraud S, Ader E. Slowly or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review. Clin Infect Dis. 2019 Jun 26.
7. Baume M, Cariou A, Leveau A, Fessy N, Pastori F, Jarraud S, Pierre S. Quantification of *Legionella* DNA certified reference material by digital droplet PCR. J Microbiol Methods. 2019 Feb;157:50-53.
8. Durieux I, Ginevra C, Attaiech L, Picq K, Juan PA, Jarraud S, Charpentier X. Diverse conjugative elements silence natural transformation in *Legionella* species. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Sep 10;116(37):18613-18618.
9. Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D, Mondino S, Pérez-Cobas AE, Rolando M, Pasricha S, Reuter S, Demirtas J, Crumbach J, Descorps-Declere S, Hartland EL, Jarraud S, Dougan G, Schroeder GN, Frankel G, Buchrieser C. More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Feb 5;116(6):2265-2273.

6.2.3. Communications nationales

Communications orales

1. Allam C, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Conrad A, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

Communications affichées

1. Beraud L, Ltifi F, Allam C, Descours G, Gaia V, Jarraud S. Evaluation du test Standard F *Legionella* Ag FIA® SD Biosensor. 39^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI), 16-17 Décembre 2019, Paris.
2. Allam C, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Conrad A, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte inflammatory response in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. Microbes, 15^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie, 30 Septembre – 2 Octobre 2019, Paris.
3. Ibranosyan M, Ginevra C, Allam C, Darien M, Harou O, Beraud L, Ader F, Descours G, Bonnot PE, Jarraud S. Confirmation du rôle de *Legionella pneumophila* séro groupe 8 dans une fasciite nécrosante fatale par la

technologie de séquençage MinION. Microbes, 15^{ème} congrès national de la Société Française de Microbiologie, 30 Septembre – 2 Octobre 2019, Paris.

4. Couturier J, Barbut F, Dhenin G, Jolivet S, Nesa D, Boukari L, Maison M, Lapoussin S, Descours G, Salauze B. Un humidificateur d'air probablement à l'origine d'un cas de légionellose nosocomiale. 30^{ème} congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H), 5-7 Juin 2019, Strasbourg.

6.2.4. Communications internationales

Communications orales

1. Allam C, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Conrad A, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' Disease: a preliminary study. 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece. Best presentation price.

Communications affichées

1. Ltifi F, Allam C, Descours G, Jarraud S, Beraud L. Evaluation of ImmuView® *L. pneumophila* and *L. longbeachae* antigen test. 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
2. Ltifi F, Allam C, Descours G, Jarraud S, Gaia V, Beraud L. Evaluation of Standard F *Legionella* Ag FIA® test (SD Biosensor) for the detection of urinary *Legionella* antigens. 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
3. Ibranosyan I, Allam C, Darien M, Harou O, Beraud L, Ginevra C, Ader F, Descours G, Bonnot PE, Jarraud S. Fatal necrotizing fasciitis due to *Legionella pneumophila* serogroup 8 around Sheldon hemodialysis catheter in an immunocompromised patient. 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
4. Ltifi F, Beraud L, Allam C, Descours G, Ginevra C, Jarraud S. Evaluation of the supplement Free DNA Removal Solution (FDRS) step in the Bio-Rad iQ-Check *Legionella* PCR method on sanitary hot water samples. 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
5. Allam C, Descours G, Chaverot L, Chastang J, Dumitrescu O, Laurent F, Rodriguez Nava V, Jarraud S. Amoebae Plate Test (APT) as a new effective tool for *Nocardia* isolation. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 13th-16th 2019, Amsterdam, The Netherlands.
6. Testaert H, Allam C, Ginevra C, Fessy N, Bernard C, Guillemot J, Chapalain A, Argaud L, Lina G, Ader F, Jarraud S. Leukocyte anergy in patients with severe Legionnaires' disease. ECCMID 2019, 13 – 16 April, Amsterdam 2019
7. Daniel Leenheer, Pelaz Pelaz, Matilda Morin, Daniela Klingenberg, Sophie Jarraud, Christophe Ginevra, Lionel Guy. Rapid adaptations to the human host in *Legionella pneumophila*. SBE 2019, 21-25 Juillet 2019 UK

6.2.5. Conférences sur invitations

- Nationale
- Internationale

1. Descours G. « Antimicrobial resistance in *Legionella* », 6th ESGI meeting, 10th-12th September 2019, Athens, Greece.
2. Jarraud S. *Legionella* bacteria surveillance in France and Europe. 5th session meeting of the parties to the protocol on water and health, UNECE meetings, 19-21 Nov 2019, Belgrade, Serbie. High-level intergovernmental meeting on advancing the water, sanitation and health agenda in the panEuropean region, in support of implementing the 2030 Agenda for Sustainable Development.

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 avec les laboratoires environnementaux sont réguliers sur ce point.

* 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 :

Le CNR est régulièrement impliqué dans des groupes de travail : ANSES – AFNOR...
Maude Baume est le correspondant à l'AFNOR pour le CNR.

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

8. Programme d'activité pour les années suivantes

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

* SUR LE PLAN DE L'EXPERTISE

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

Coordination par le CNR de l'évaluation de 17 kits commerciaux de tests urinaires par 9 centres européens de référence des *Legionella* afin d'établir des recommandations européennes par le groupe ESGLI. Ce projet a pris du retard pour des raisons organisationnelles et administratives. L'analyse des urines va démarrer en Septembre 2020 (Projet du groupe de travail ESGLI).

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

Nous souhaitons standardiser la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide par le développement de plaques de réactifs prêt à l'emploi industriels. Les premières évaluations ont eu lieu en 2019 et 2020 et se poursuivent. Par ailleurs, une étude européenne devrait être proposée par le CNR en collaboration avec l'Angleterre pour proposer une méthode standardisée. Cette proposition d'étude est soutenue par le groupe ESGLI. Elle se fera en coordination avec l'EUCAST. En parallèle, une surveillance proactive de la résistance est envisagée sur l'ensemble des isolats cliniques et non à la seule demande du clinicien.

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

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

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

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

* Participer à la discussion de la place de la PCR dans la définition des cas certains de légionellose au niveau national à l'instar des discussions qui ont eu lieu au niveau européen en 2019.

* Evaluer des kits de type *Point of Care* de diagnostic syndromique d'infections respiratoires basses. Ces dispositifs concernaient principalement jusqu'à récemment les infections respiratoires hautes. Des kits apparaissent pour le diagnostic d'infections respiratoires basses avec le paramètre *Legionella*. La spécificité sera facilement évaluée du

fait de la faible incidence de la légionellose. Une réflexion sur l'évaluation de la sensibilité de ces dispositifs qui peut être facilitée par le recrutement du CNR sera importante.

- **Bases de données du CNR**

Un de nos objectifs est l'amélioration de l'intégration des données clinico-biologiques ainsi que des données de NGS associés par l'utilisation de l'outil BioNumerics ce qui permettra une valorisation des biobanques et une utilisation optimale des résultats du CNR.

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

Concernant l'accréditation des analyses de biologie médicale, l'objectif est d'accréditer l'ensemble des activités du CNR (diagnostic, identification et typage). Une seconde technique de PCR *Legionella*, ainsi que la mise en culture et identification des *Legionella* sur prélèvements respiratoires seront déposées à l'accréditation en 2020. Les techniques de typage par NGS seront proposées en 2021.

*** SUR LE PLAN DE LA SURVEILLANCE**

- **Généralisation de l'approche NGS dans un objectif d'investigation des cas de légionellose et d'épidémiologie globale**

*L'utilisation du séquençage sera encore amplifiée (517 isolats ont été analysés en 2019) avec pour objectif de caractériser l'ensemble des isolats cliniques et des isolats environnementaux et ainsi abandonner les anciennes méthodes de typage.

*Le CNR travaille également à la caractérisation des populations de Légionelles présentes dans les échantillons complexes (cliniques et environnementaux) à culture négative, par des approches amplicons suivi de séquençage NGS. Ces approches permettent d'identifier la diversité des espèces et/ou des sous-types de Légionelles présentes dans un même échantillon. En pratique, des cibles spécifiques du genre *Legionella* (espace intergénique 23S-5S) ou de l'espèce *L. pneumophila* (gènes du SBT) sont amplifiées par PCR directement à partir de prélèvements puis les amplicons générés sont séquencés par séquençage Illumina.

- **Mieux identifier la part de l'exposition au domicile des cas de légionellose**

L'investigation du rôle exact des domiciles comme source de contamination qui jusqu'alors ne font pas l'objet d'investigation systématique devient une priorité et devrait constituer l'objectif d'une étude commune avec Santé publique France dans ces deux prochaines années.

En effet, le nombre de cas de légionellose ne diminue pas ces dernières années et la majorité des cas (60%) sont des cas communautaires sans exposition particulière rapportée. Les résultats de comparaison entre les souches cliniques et environnementales réalisées depuis 2008 par le CNR ont montré que les sources de contamination des cas investigués étaient majoritairement les réseaux d'eau d'établissements recevant du public et les réseaux d'eau de domicile. En effet, 69% des 132 comparaisons concernant le domicile ont révélé des profils de souches identiques. Cependant, ces comparaisons font suite à des investigations environnementales ciblées par une forte suspicion de la source de contamination et ne reflètent pas forcément la part potentielle des contaminations à domicile notamment pour les cas sporadiques qui représentent la majorité des cas. L'objectif de l'étude sera de déterminer la part potentielle des contaminations à domicile dans les sources de contamination des cas sporadiques. En fonction des résultats de l'étude, il serait envisageable de discuter avec les autorités sanitaires de l'opportunité de développer des actions pour mieux contrôler ce risque et diminuer à terme le nombre de cas de légionellose.

- **Mieux caractériser la dispersion de *Legionella* dans l'atmosphère en lien avec les conditions météorologiques**

* De nombreuses études montrent un lien entre l'augmentation de l'incidence de la légionellose et des **conditions météorologiques** particulières (humidité, pluie, chaleur). Une telle situation a été observée en juin 2018 en Europe. Nous souhaitons collaborer avec Santé publique France pour identifier des marqueurs météorologiques prédictifs de l'augmentation des cas qui pourraient être utilisés par certains spécialistes médicaux pour favoriser le diagnostic de légionellose.

* Nous souhaitons par ailleurs développer des travaux sur la compréhension de la dispersion de *Legionella* dans l'atmosphère. Un de nos projets est le développement d'un outil de génotypage de *Legionella* dans l'atmosphère et les aérosols basé sur la méthodologie de *core genome Multi Locus Sequence Typing* (cgMLST) applicable aux environnements faiblement contaminés grâce à la technologie de capture de gènes par hybridation. Ce projet en collaboration avec Pierre Peyret (Microbiologie, Environnement Digestif et Santé, UMR454 INRA-UCA, Clermont-Ferrand) et Pierre Amato (Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, UMR 6296 CNRS-UCA-SIGMA, Clermont-Ferrand) devrait permettre de détecter et de génotyper *Legionella* et d'étudier sa dispersion dans l'environnement atmosphérique, sur de longues distances en lien avec les facteurs environnementaux. Cette méthode pourra être transférée pour les échantillons cliniques. Ce projet a été déposé à l'ANSES.

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

* **Etude des facteurs pouvant être impliqués dans la sévérité des légionelloses (étude PROGLEGIO).**

Poursuite des inclusions pour ce projet majeur du CNR. Réalisation d'étude transcriptomique pour identifier des groupes de gènes ou patterns liés à la réponse immunitaire de l'hôte différenciellement exprimés chez les sujets ayant une maladie sévère par rapport aux non sévères. Si des variations sont observées au niveau transcriptionnel, celles-ci seront validées par des mesures protéiques (dosage de cytokines, chemokines ou de marqueurs de l'inflammation).

* **Caractériser les co-infections (bactérienne, virale ou fongique) au cours des légionelloses.** Des diagnostics de co-infection sont régulièrement observés (*Pneumocystis*, mycobactéries ...) sans que leur incidence et leur implication clinique réelle ne soient bien décrites. Nous envisageons de mieux décrire ces cas et d'associer les données d'analyse du microbiote respiratoire.

* **Etude observationnelle prospective sur les immunodepressions associées aux légionelloses.** Nous souhaitons mieux décrire l'impact des nouvelles biothérapies, des immunothérapies actives anticancéreuses (par ex CAR-T cells) et des transplantations de cellules souches hématopoïétiques sur la survenue de légionellose. Cette description sera accompagnée de la recommandation d'utiliser l'outil PCR pour le diagnostic de légionellose chez ces patients plus à risque d'infection par *Legionella* non *pneumophila* et *L. pneumophila* non sg1.

* **Compréhension des infections persistantes.** Les données récentes colligées par le CNR montrent que des récurrences d'infection, jusque-là peu décrites, existent et qu'elles ne sont pas liées à l'apparition de bactéries résistantes *in vivo* ni à une micro-évolution génomique de *Legionella* au cours de l'infection. Ces récurrences impliquant une souche bactérienne identique à l'infection initiale suggèrent donc la persistance de bactéries tolérantes au traitement antibiotique ou « *persisters* » (Pouderoux *et al.*, CID, en révision). Le rôle des *persisters* dans les infections chroniques ou les récurrences d'infection a été décrit pour plusieurs genres bactériens parmi lesquels *Salmonella* ou *Staphylococcus*. Une étude récente montre la capacité de *Legionella pneumophila* à générer des « *persisters* » (Personnic *et al.*, Nat Comm 2019). L'objectif du CNR en collaboration avec notre équipe « Pathogénèse des *Legionella* » est donc d'étudier l'impact de « *persisters* » pour les patients atteints de légionellose évoluant défavorablement sous antibiothérapie.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Missions du CNR des Légionelles

1. Apporter une expertise microbiologique

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

2. Conseil

- contribuer aux expertises nationales et européennes.

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

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

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

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

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). L'ensemble des personnels est présenté Tableau 4.

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 4. Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles.

Noms et qualifications	Coordonnées
Sophie Jarraud (directeur) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 38 sophie.jarraud@chu-lyon.fr
Gérard Lina (directeur adjoint) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 94 gerard.lina@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
Ghislaine Descours (résistance) PH - IAI MCU - Faculté de Pharmacie Lyon	Tél : 04 72 07 16 50 ghislaine.descours@chu-lyon.fr
Camille Allam AHU – IAI Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 71 camille.allam@chu-lyon.fr

Christophe Ginevra (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique) Ingénieur IAI	Tel : 04 72 07 16 27 christophe.ginevra@chu-lyon.fr
---	--

Techniciens (Hospices Civils de Lyon)
Isabelle Royet Karine Droitcourt* * remplacée par Hanène Doudou en 2019 Corinne Fauchon Joelle Chastang Marielle Siffert Lucie Chaverot

Cadre

Helena Rutschi

helenarutschi@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

blandise.bavitot@chu-lyon.fr

Toky Andriamaro

toky.andriamaro@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 est occupé par la Microbiologie :

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

Etage des CNR de Bactériologie

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (cf plan – Figure 18). 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 17. Espaces du R+1 de l'IAI (en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles.

Principaux équipements :

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

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

Les moyens informatiques :

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

Collections de matériel biologique

Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections ;

Mode de constitution

La collection est actuellement constituée par :

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

Concernant l'environnement, par :

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

Mode de stockage

Le mode de stockage des échantillons et souches est résumé dans le tableau 5.

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 5. Modalités de stockage de la collection du CNR.

TYPE D'ECHANTILLON	Conservation	T°	Durée
Tout prélèvement « important »	Tubes NUNC	-20°	Infinie
LBA, LCR, Hémoc, Biopsie,... si culture et/ou AgU +	200 µL pour PCR + tubes NUNC	-20°C	Infinie
si culture et/ou AgU -	200 µL pour PCR + tubes NUNC	-20°C	Infinie
Urines positives et importantes	Tube stérile à hémolyse	-20°C	Infinie
Sérums positifs et intéressants	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	Infinie
Autre sérums	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	1 an
Souches extérieures	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
Terre, Boue,...	Contenant d'origine	+5°	1 mois
SOUCHES			
CLINIQUES : - reçues d'un laboratoire extérieur	1 émulsion dans sang de mouton	-80°C	Infinie
- 1ère colonie isolée d'un prélèvement clinique	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
CLINIQUES : - colonie 2 à 5 si disponible	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
ENVIRONNEMENTALES	2 émulsions sur billes mises chacun dans un congélateur différent	-20°C -80°C	3 ans
REFERENCE	3x5 émulsions sur billes 1 émulsion dans sang de mouton	-80°C -20°C	Infinie
EAUX	1 émulsion sur billes	-20°C	3 ans
ADN			
ADN de souches	Microtubes	-20°C	Infinie
ADN de prélèvements	Microtubes	-20°C	Infinie
ADN des eaux	Microtubes	-20°C	1 an
Blocs PFGE	Tubes NUNC	+5°	3 ans

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'IAI, 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 est placé sous surveillance par sondes type SPY (logiciel SIRIUS). Concernant les congélateurs -20°C, ils sont placés sous surveillance SPY s'ils sont délocalisés ou critiques, alors que d'autres sont suivi par des relevés de température classique.

Mise à disposition des collections

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

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 (35 665)

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 4000.

Collection de sérums de patients : 8950

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose : plus de 5000

Collection d'urines de patients atteints de légionellose : plus de 1000

Tableau 6. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.

Collection échantillons	ou	stockage	Nombre approximatif d'échantillons	conditions de conservation	de température
Sérums			8950	-20°C	
Souches patients			6790	-20°C et -80°C	
Souches environnementales			28875	-20°C et -80°C	
Souches de référence			206	-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...)	5650	-20°C
Urines	1060	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	4210	-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 PCR *Legionella* dans les prélèvements respiratoires, la recherche d'antigénurie *Legionella* et la sérologie par technique ELISA ; la sérologie par IF fait l'objet d'une demande d'extension en cours. 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 19).

Cartographie des processus du LBMMS

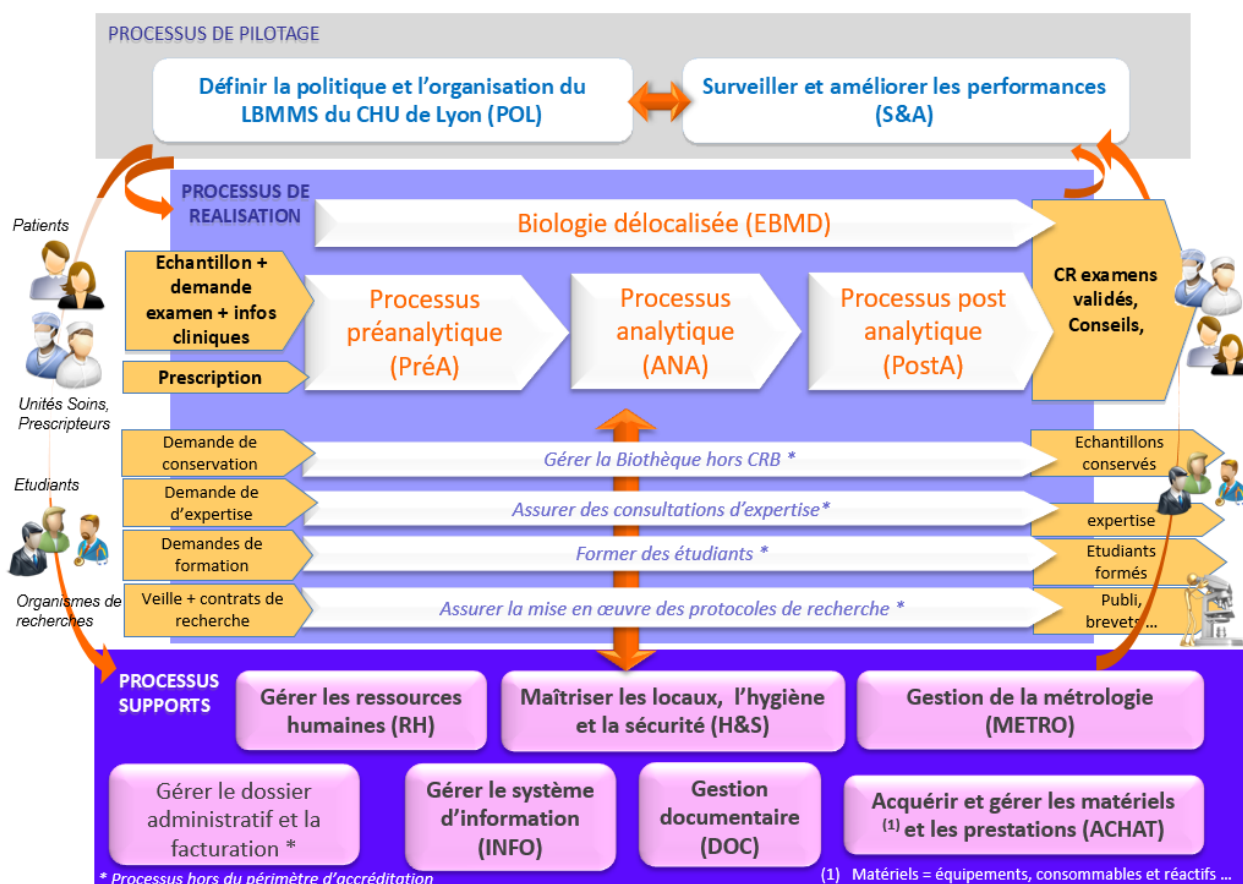


Figure 18. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).

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

La figure 20 représente l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valide en novembre 2019).

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.

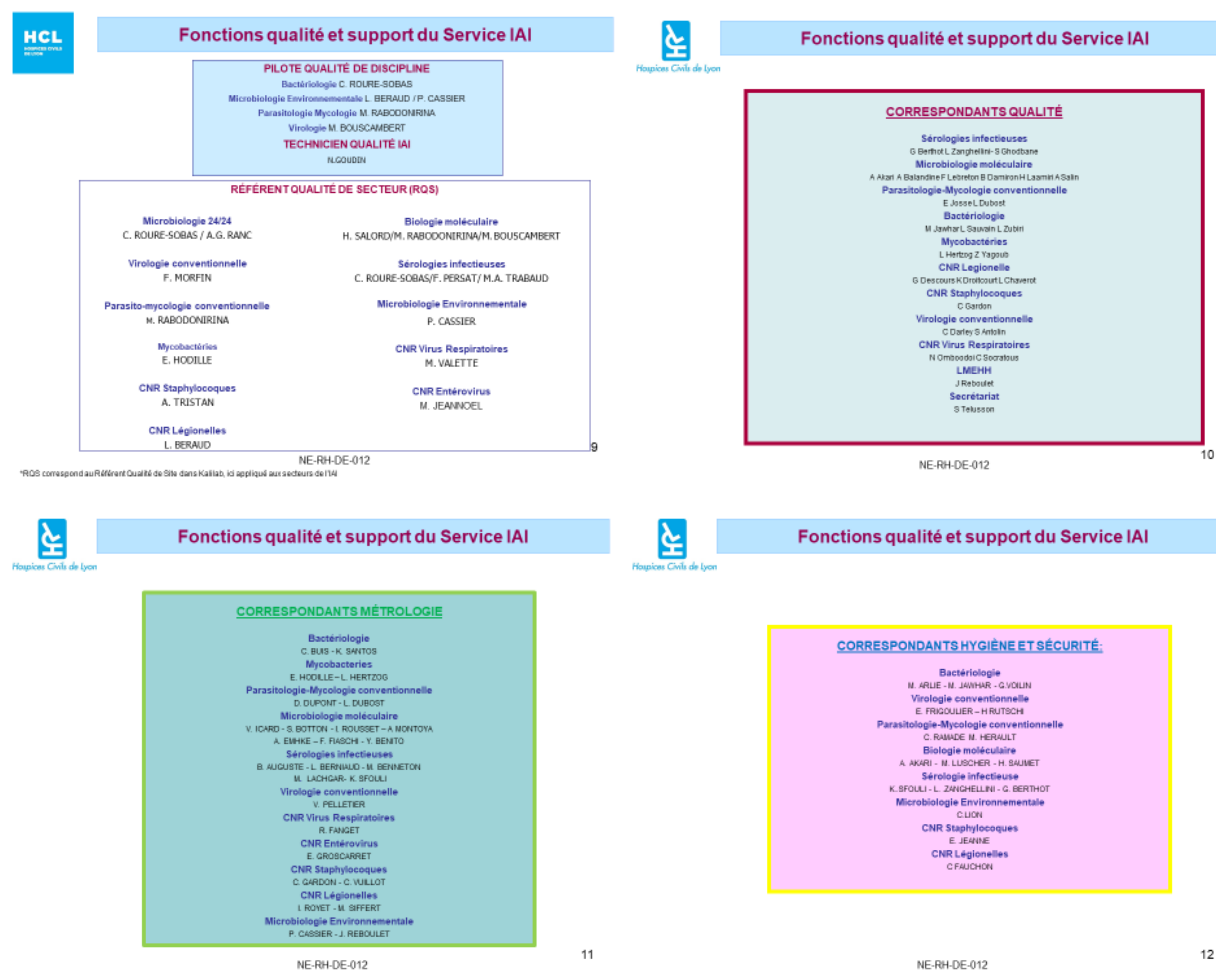


Figure 19. Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)

Le CNR a participé en 2019 à 7 programmes d'EEQ différents concernant :

- les analyses de PCR *Legionella* sur prélèvements (contrôle européen organisé par QCMD-ECDC, 10 échantillons par an) ;
- l'antigénurie *Legionella* (Aglae 3 échantillons 3 fois par an et LabQuality 3 échantillons 3 fois par an) ;
- la sérologie *Legionella* (RCPAQAP 2 échantillons 2 fois par an) ;
- la mise en culture et dénombrement des *Legionella* dans les eaux (contrôle européen organisé par PHE, 2 échantillons 4 fois par an) ;
- la PCR *Legionella* dans les eaux (contrôle national organisé par AGLAE, 2 échantillons 2 fois par an).

Le CNR a également participer à une campagne d'EEQ européenne organisée par l'ECDC qui permet de recomposer une enquête épidémiologique avec des analyses d'urines, des prélèvements respiratoires à analyser en

culture et/ou PCR, des prélèvements environnementaux et des techniques de typage à réaliser pour retrouver la source de contamination.

Tous ces résultats sont analysés et revus en réunion régulièrement.

Audits

Dans le cadre de l'accréditation selon la norme 17025 et 15489, le CNR des Légionelles est audité depuis 2012 par des évaluateurs COFRAC pour vérifier le respect des exigences et la démarche d'amélioration continue mise en place. Ces audits ont toujours mis en avant la compétence des personnels du CNR et leur participation active dans la démarche qualité. Les évaluateurs ont à chaque fois accordée leur confiance au CNR et leurs rapports ont permis le maintien de l'accréditation (dernier audit 17025 effectué en novembre 2018 et dernier audit 15189 effectué en novembre 2019).

De plus, des audits internes ont lieu régulièrement, pour vérifier la mise en place du système qualité, selon la norme 17025 et selon la norme 15189. Ils sont réalisés par du personnel du laboratoire ou de laboratoires extérieurs formé à l'audit et donnent lieu à des rapports qui nous permettent de mettre en place des actions d'amélioration. En 2019, un audit du système de management de la qualité, de la gestion documentaire, de la gestion des ressources humaines, de la gestion de la métrologie et un audit technique de la PCR *Legionella* dans les eaux, ainsi que des techniques d'antigénurie ont été réalisés.

Logiciel de gestion de la qualité

Le laboratoire dispose d'un logiciel de gestion de la qualité (Kalilab®, Netika) permettant (i) de gérer la documentation (230 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 événements 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). Une seconde technique de PCR *Legionella*, ainsi que la mise en culture et identification des *Legionella* sur prélèvements respiratoires sera déposée à l'accréditation en 2020. Les techniques de typage par NGS seront proposées en 2021.

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

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

Méthodes pour le diagnostic des légionelloses

- **Mise en culture** de prélèvements pulmonaires sur des milieux spécifiques (BCYE, BMPA, MWY)
Descours G, Cassier P, Forey F, Ginevra C, Etienne J, Lina G, Jarraud S. J Microbiol Methods. 2014, 98: 119-21.
- **Co-culture** des prélèvements pulmonaires sur **tapis ambien** réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline) ou par la technique *Amoebae Plate Test* (Test APT) nouvellement développée par le CNR et qui est la méthode utilisée depuis 2015.
Descours G, Suet A, Ginevra C, Campese C, Slimani S, Ader F, Che D, Lina G, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Feb 8.
H. Hannetel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, ESGI 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).
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 Diagénodé® (*Legionella* species and *Legionella pneumophila* Real-time PCR)

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

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

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

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

PCR-séquençage de la région intergénique 23S-5S pour identifier les espèces de *Legionella* non *pneumophila*
Grattard F, Ginevra C, Riffard S, Ros A, Jarraud S, Etienne J, Pozzetto B. Microbes Infect. 2006;8:73-83.

Méthodes d'identification des légionelles

- **Identification phénotypique** des sérogroupes des *L. pneumophila* par **immunofluorescence ou ELISA** à l'aide des Ac monoclonaux de Dresden (mise à disposition par Christian Lück, CNR des Légionelles, Dresden, Allemagne) ; agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, Prolab) ; immunofluorescence directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles
Lück C, Fry NK, Helbig JH, Jarraud S, Harrison TG. Typing methods for *Legionella*. Methods Mol. Biol. 2013; 954:119-48.

- Identification génotypique des *L. non pneumophila* par **séquençage du gène *mip*** et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI (www.ewgli.org) 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 MS base sous la version 3.2)

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} RICA 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, ESGI Meeting, London, UK, september 2015.

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

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

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

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

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

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

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

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

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

Méthode de recherche de légionelles dans l'environnement

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

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

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

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

Détection et quantification des bactéries viables

- 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 migration de l'ADN génomique (arbitrary-primed PCR, **AP-PCR** adaptée de F. Grattard *et al* ... JCM 1996)

- Méthode de **spoligotypage** développée par le CNR permettant de discriminer les souches du clone endémique *Legionella pneumophila* Paris, technique sur membrane ou sur Luminex

Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, Descours G, Vandenesch F, Etienne J, Lina G, Caro V, Jarraud S. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):696-701.

Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refregier G, Jacotin N, Sola C, Jarraud S. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2410-5.

- Identification des isolats porteurs du gène **lag-1** par PCR
- **Séquençage du génome entier** (Whole Genome Sequencing, **WGS**) applicable sur souche d'origine clinique et souche environnementale. Préparation des banques à l'aide du kit Nextera XT, séquençage paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) ou MiSeq de la plateforme des HCL.

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

Méthodes appliquées sur prélèvements cliniques ou sur échantillons environnementaux

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

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

Liste des techniques recommandées par le CNR

Diagnostic

Une proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose est présentée en Figure 21.

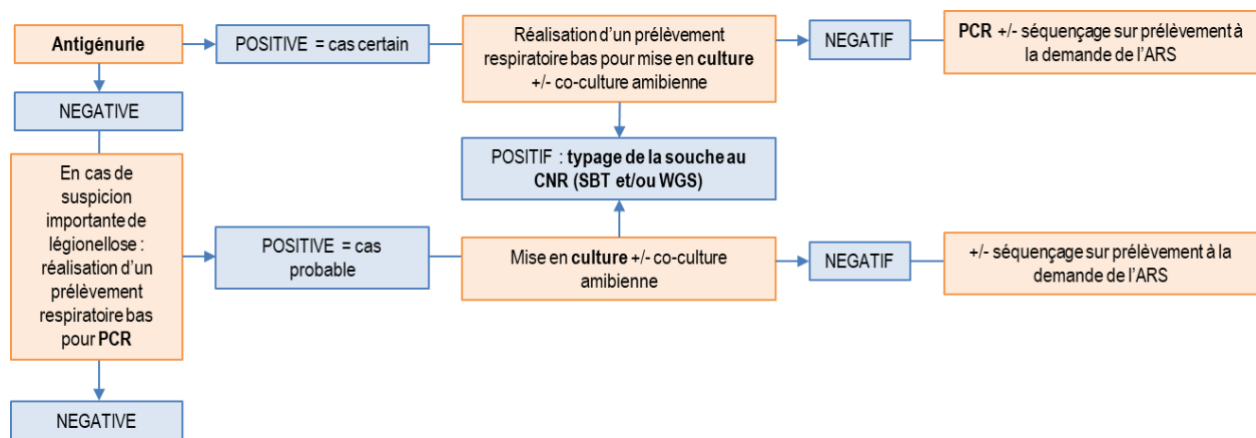


Figure 20. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.

- 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 dans un but épidémiologique ne seront pas facturées.

- 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
- PCR détectant les résistances aux macrolides, quinolones et rifampicine

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