

Rapport annuel d'activité

2021

**Centre National de
Référence des Légionelles**

**Année d'exercice
2020**

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 1328 cas notifiés, l'année 2020 a été marquée par un **nombre de cas de légionellose nettement inférieur à celui de 2019 (-27% de cas)**, baisse rapportée dans la majorité des pays européens. Une investigation menée par le CNR auprès des six principaux fournisseurs de tests d'antigénurie suggère que dans le contexte de la **pandémie liée au SARS-CoV-2**, le recours au diagnostic pour légionellose n'a pas diminué en 2020 par rapport à 2019 car le nombre de tests diffusés a été plus important (+30%). Cette baisse pourrait être en lien avec les restrictions de déplacements et d'activités pendant la pandémie. La **part des voyages** comme exposition à risque documentée n'était que de 13%, nettement inférieure à celle des dernières années (19%). A la lumière des données observées lors de cette pandémie, l'investigation du rôle exact des **domiciles** comme source de contamination qui jusqu'alors ne font pas l'objet d'investigation systématique reste une priorité.

Des cas de **co-infections Legionella et SARS-CoV-2** ont été identifiés et investigués en début de pandémie : 7 cas détectés parmi les 65 cas de légionellose notifiés du 1er au 31 mars 2020. Les cas co-infectés étaient plus âgés, plus souvent des hommes, présentaient plus de co-morbidités et une létalité plus élevée. Le suivi de ces co-infections régulièrement rapportées reste d'actualité en 2021.

Le **séquençage systématique** des génomes de *Legionella* pour discriminer les souches afin de mieux identifier les sources de contamination est opérationnel. 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 2020.

Enfin, la légionellose reste une infection sévère malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée avec une létalité globale 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 2020

- Malgré la diminution du nombre de cas de légionellose notifié, la demande d'expertise sur le diagnostic des cas par les laboratoires partenaires a été importante ; plus de 232 partenaires sur tout le territoire Français
- L'incidence des co-infections *Legionella* – SARS-Cov-2 a été évalué entre 10% et 14% parmi les cas de légionellose notifiés avec date de début des signes en Mars 2020
- Une souche est disponible pour 23,9% des cas de légionellose, pourcentage similaire aux années antérieures ; le CNR a isolé 58,4% de ces souches ;
- 100 % des souches d'origine clinique ont été séquencées en 2020. Au total 555 souches (clinique et environnementale) ont été typées par WGS
- De façon constante, plus de 50% des isolats cliniques appartiennent à seulement 9 *Sequence Type* dont les ST23, ST1, ST62, ST259 et ST47 ; Seules les données de cgMLST et les analyses phylogénétiques permettent de discriminer ces souches ;
- 79% des investigations microbiologiques par WGS se sont révélées positives ; les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination
- Proposition à l'EUCAST des nouvelles recommandations pour la détermination de la sensibilité des souches de *Legionella* aux antibiotiques par microdilution ; recommandations parues en 2021
- Aucune résistance n'a été détectée en 2020
- Augmentation lente mais effective du diagnostic par PCR en France ;
- Evaluation européenne de 16 tests de détection des antigènes urinaires en cours ; intérêt des tests avec lecteurs optiques pour la première étude sur urines surchargées avec des LPS extraits de souches bien caractérisées

Abstract

Public Health Issues

2020 was marked by a significantly lower number of legionellosis than in 2019 (1328 notified cases, -27% of cases), a decrease reported in most European countries. In the pandemic context, data obtained from 6 major UAT suppliers indicated an increase in tests sold to French laboratories (+30%) suggesting that the decrease of notified LD cases is not due to an under-diagnosis of LD in France. This decrease may be related to travel and activity restrictions during the pandemic, only 13% of cases reported a travel in 2020, lower than in recent years (19%). The systematic investigation of the role of home water as a source of contamination, which until now have not been systematically investigated, remains a priority.

Legionella and SARS-CoV-2 co-infections were identified and investigated at the beginning of the pandemic: 7 cases detected among the 65 notified LD cases from 1 to 31 March 2020. Co-infected cases were older, more often male, had more co-morbidities and a higher case fatality. Follow-up of these regularly reported co-infections remains relevant in 2021.

Systematic Whole genome sequencing of *Legionella* isolates is now performed to discriminate strains in order to better identify sources of contamination. Epidemiological data associated to microbiological analyses remain essential to answer the question of unidentified sources of contamination. This question implies an increase in the clinical strains available and to improve the diagnosis of LD, in particular by the use of PCR on pulmonary samples, which seems to continue to increase in 2020.

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

Highlights in 2020

- Despite the decrease in the number of notified LD cases, requests for expertise on the diagnosis of cases by partner laboratories have been significant; more than 232 partners throughout France;
- The incidence of *Legionella* - SARS-Cov-2 co-infections has been evaluated between 10% and 14% among LD notified cases with onset of signs in March 2020;
- A strain is available for 23.9% of LD, a percentage similar to previous years; the CNR isolated 58.4% of these strains;
- 100% of the clinical strains were sequenced in 2020. A total of 555 strains (clinical and environmental) were typed by WGS
- More than 50% of clinical isolates belong to only 9 sequence types including ST23, ST1, ST62, ST259 and ST47; only cgMLST data and phylogenetic analysis can discriminate these strains;
- 79% of the microbiological investigations by WGS were positive; sanitary water systems were the most likely source of contamination;
- CNR of *Legionella* proposed new recommendations to EUCAST for the antibiotic susceptibility test by microdilution; recommendations are published in 2021;
- No resistance detected in 2020;
- Increase of use of PCR for LD diagnosis in France;
- European evaluation of 16 urinary antigen detection tests in progress; better performance for tests using optical readers for the first study on urine overloaded with LPS extracted from well-characterised strains.

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, Catherine Maine, Yann Savitch 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, Marine Ibranosyan et Sophie Jarraud.

Table des matières

1. Missions et organisation du CNR	9
2. Activité d'expertise	10
2.1. Évolutions des techniques	10
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires	14
2.4. Collections de matériel biologique distribuées	14
2.5. Activités d'expertise	14
2.5.1. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses	15
2.5.2. Transmission des résultats expertisés	17
2.6. Activités de séquençage	18
3. Activités de surveillance	20
3.1. Description du réseau de partenaires	20
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	23
3.2.1. Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF)	23
3.2.2. Formes cliniques atypiques	24
3.2.3. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR	24
3.2.4. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR	29
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	30
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	31
3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	31
3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC)	33
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	34
4. Alerte	36
4.1. Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal	36
4.2. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	36
5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil	37
5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé	37
5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	38
5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	38
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	38
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2020, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	38
6.1.1. Caractériser les co-infections (bactérienne, virale ou fongique) au cours des légionelloses	39
6.1.2. Analyse comparative de génomes de <i>Legionella pneumophila</i> pour l'identification de déterminants associés aux signes neurologiques et digestifs au cours de la légionellose	40

6.2.	Liste des publications et communications de l'année 2020, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	41
6.2.1.	Publications nationales	41
6.2.2.	Publications internationales	41
6.2.3.	Communications nationales	42
6.2.4.	Communications internationales	42
6.2.5.	Conférences sur invitation	42
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	42
8.	Programme d'activité pour les années suivantes.....	43
	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	45
	Missions du CNR des Légionelles	45
	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	46
	Collections de matériel biologique	48
	Démarche qualité du laboratoire	51
	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	54
	Liste des techniques de référence pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux.....	54
	Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique.....	56
	Liste des techniques recommandées par le CNR.....	56

Liste des figures

Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2020	14
Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2014-2020.	16
Figure 3. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des souches cliniques (A) ou des prélèvements respiratoires pour mise en culture, le diagnostic de légionellose étant retenu par antigénurie et/ou PCR (B) ou par PCR uniquement (C).	21
Figure 4. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.	22
Figure 5. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des urines (A) ou des sérums pour expertise (B).	22
Figure 6. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des souches environnementales pour identification (A) ou comparaison (B).	23
Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2020 (Santé publique France).	23
Figure 8. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2020 (Santé publique France).	24
Figure 9. Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2019 (Santé publique France).	24
Figure 10. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2014 – 2020.	25
Figure 11. Evolution de la distribution des 9 principaux STs associés à l'infection en France de 2015 à 2020 et représentation de ces STs (en pourcentage) en 2020.	27
Figure 12. Génotypage des souches cliniques de Lp par SBT (A) et cgMLST 50 (B).	27
Figure 13. Arbre phylogénétique de l'ensemble des souches de <i>Legionella pneumophila</i> (Lp) isolées en 2020.	28
Figure 14. Evolution des sous espèces de Lp entre 2007 et 2020.	28
Figure 15. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.	29
Figure 16. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2020, (A) en termes de séro groupe des souches de <i>L. pneumophila</i> ; (B) en termes d'espèce des souches de <i>Legionella non pneumophila</i>	30
Figure 17. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.	34
Figure 18. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2020 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête.	35
Figure 19. Espaces du R+1 de l'IAI (en jaune) affectés au CNR des Staphylocoques et des Légionelles.	48
Figure 20. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).	51
Figure 21. Extrait de Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.	52
Figure 22. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.	56

Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2016-2020.	15
Tableau 2. Numéros d'accession des différentes études déposées à l'ENA.	19
Tableau 3. Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de <i>Legionella</i> et de sérogroupes de <i>L. pneumophila</i> , 2013 – 2020.	26
Tableau 4. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2020.	35
Tableau 5. Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles.	46
Tableau 6. Modalités de stockage de la collection du CNR.	49
Tableau 7. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.	50

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 2020.

Néanmoins, le contexte de la pandémie COVID-19 en 2020 a nécessité de renforcer les effectifs pour le diagnostic d'infection à SARS-CoV-2 à l'Institut des Agents Infectieux, d'une part au sein du secteur de Réception Tri et Enregistrement (TRI) mais aussi dans le secteur de virologie. Les techniciens du CNR ont participé à la prise en charge des prélèvements COVID sur la période de mars à juin 2020, du lundi au dimanche jusqu'à 20% de participation par mois. Ils ont occupé les postes d'enregistrement au sein du RTE et les postes de prétraitement des prélèvements COVID et de dépistage analytique rapide avec les équipes de virologie. A noter aussi leur implication dans la réalisation des tests naso-pharyngés auprès de la population dans les centres de prélèvements des HCL.

Nom et 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 Hanene Haddour (en remplacement de Karine Droitcourt) Corinne Fauchon Isabelle Royet Marielle Siffert	Techniciennes (Hospices Civils de Lyon)
Noémie Fessy	Technicienne (financement étude PROGLEGIO)
Manon Robert, Blandine Bavitot, Toky Andriamaro, Imane Mohamadi	Secrétaire (Hospices Civils de Lyon)

L'engagement dans la démarche d'accréditation est effectif depuis 2012 selon la norme 17025 et depuis 2016 selon la norme 15189. Ainsi, le CNR est accrédité pour la recherche de *Legionella* par culture et PCR dans les eaux propres

; la recherche et l'identification de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires par PCR et culture ; l'antigénurie *Legionella* par immuno-chromatographie et ELISA ; et la sérologie *Legionella* par ELISA.

2. Activité d'expertise

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

Éléments clés de l'année 2020 en termes de production d'expertise

- Malgré la diminution du nombre de cas de légionellose notifié (-27% par rapport à 2019), la demande d'expertise sur le diagnostic des cas par les laboratoires partenaires a été importante ;
- Une souche est disponible pour 23,9% des cas de légionellose (317 isolats), pourcentage similaire aux années antérieures ; point important, le CNR a isolé 58,4% de ces souches ;
- 100 % des souches d'origine clinique ont été séquencées en 2020. Au total 555 souches (clinique et environnementale) ont été typées par WGS
- La décroissance de l'activité de sérologie au CNR se poursuit : -41,8% entre 2019 et 2020, et -78,5% en 5 ans suite à la sensibilisation des laboratoires sur les sérums devant nous être envoyés (confirmation de titre) ;
- Augmentation lente mais effective du diagnostic par PCR en France ; promotion de la PCR auprès des laboratoires et cliniciens par le CNR qui réalise des diagnostics de première intention ou d'expertise.
- Veille sur l'antibiorésistance (175 déterminations de CMI ; recherche systématique de mutations cibles pour toutes les souches séquencées, n=555) ; aucune identification de résistance.
- Proposition à l'EUCAST des nouvelles recommandations pour la détermination de la sensibilité des souches de *Legionella* aux antibiotiques par microdilution ; recommandations parues en 2021
- Coordination par le CNR d'une étude européenne sur l'évaluation de 16 tests de détection des antigènes urinaires ; la première phase utilisant des urines surchargées avec des LPS extraits de souches bien caractérisées montrent de meilleures performances des tests utilisant des lecteurs optiques

2.1. Évolutions des techniques

Le séquençage génome entier (NGS). Cette activité en plein développement est détaillée Chap. 2.6. En 2020, l'ensemble des souches d'origine clinique et toutes les souches dans le cadre des investigations ont été séquencées grâce au développement d'une plateforme NGS au sein de l'Institut des Agents Infectieux et la mise à disposition d'un séquenceur. L'objectif de 100% des souches séquencées était un objectif pour 2021, nous avons anticipé cette évolution.

Détermination de la résistance aux antibiotiques. Développement avec la société Biocentric de plaque standardisée lyophilisée 96 puits pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide associée à un lecteur optique. Ces plaques présentent de bonne performance mais quelques ajustements sont à prévoir (cf chapitre 2.2). Une surveillance est prévue par la réalisation des CMI de toutes les souches d'origine clinique de 2021.

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

* **Coordination d'une étude multicentrique européenne du groupe ESGI sur l'évaluation de 16 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.

En complément de l'évaluation des tests sur des urines de patients, cette étude a pour but d'évaluer les performances de détection du LPS extrait de différentes souches de *L. pneumophila* dans des urines surchargées. Ce dernier point a été réalisé au CNR Français. Un poster sera présenté au congrès ECCMID 2021

Evaluation of 16 urinary antigens tests for the detection of Legionella pneumophila serogroup 1 Lipopolysaccharide subgroups.

Camille Allam¹, Thomas Jugla¹, Clémence Pinatel¹, Laurie Del-Valle¹, Laetitia Beraud¹, Ghislaine Descours¹, Christophe Ginevra¹, Charlotte Sværke Jørgensen², Maria Luisa Ricci³, Maria Scaturro³, Christian Lück⁴, Sjoerd Euser⁵, Charlotte Michel⁶, Fedoua Echahidi⁷, Darja Kese⁸, Vicki Chalker⁹, Valeria Gaia¹⁰, Søren Anker Uldum² and Sophie Jarraud¹. ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)

Background. Urinary antigen tests (UAT) detecting *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Lp1) lipopolysaccharide (LPS) are a major tool for legionellosis diagnosis. Lp1 can be divided into Pontiac (considered as the most virulent) and non-Pontiac subgroups. We aimed to compare 16 UATs for the detection of 9 LPS in urine samples (US) surcharged by fixed amount of LPS extracted from Pontiac and non-Pontiac strains.

Materials/Method. LPS were chemically extracted from reference strains (Pontiac: Philadelphia, Benidorm, Knoxville and France/Allentown, and non-Pontiac: OLDA, Oxford, Heysham, Bellingham and Camperdown) based on a published protocol. LPS amount was defined by 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) determination. Fixed amounts of LPS (between 30 and 0.03 ng/mL of KDO depending on strains), were added to a pool of sterile urine that tested negative with the 16 UATs.

The US overloaded were tested by 3 Immunochromatographic tests (ICT) with reader (BinaxNOW® *Legionella* Urinary Antigen Card, ImmuView S. pneumoniae and L. pneumophila Urinary Antigen Test, Operon Simple/Stick Legio pneumo), 2 fluorescent immunoassay (FIA) with reader (Sofia *Legionella* FIA, Standard F *Legionella* Ag FIA), 2 Enzyme Immunosorbent Assay (EIA) (Binax™ *Legionella* Urinary Antigen EIA, RIDASCREEN *Legionella* ELISA, and 9 ICT without reader (*Legionella* K-SeT, TRU *Legionella*, CerTest Biotec, Urisign *legionella* color, Immunocatch™ *Legionella*, Nadal® *Legionella* test, *Legionella* Monlab Test, *Legionella* vitassay with pneumococcus, Biosynex L. pneumophila). They were assessed in one run or triplicates depending concentrations of KDO.

Results. Results showed a great heterogeneity of performance for LPS detection. Four out of 5 UATs with reader detected all 9 LPS at a lower concentration than 8 out of 9 UAT without reader. EIA kits didn't display better sensitivity than ICT with a reader. There was no difference of performances between ICT with reader and one FIA kit. The second FIA kit showed poorer ability to detect 8/9 LPS at the low KDO dose. Regardless of UATs, LPS from non-Pontiac strains are detected at lower concentrations than Pontiac strains. LPS from France/Allentown and Knoxville strains are the least detected by all UATs.

Conclusion. This study describes an easy method based on extracted LPS to compare UATs. However, results do not necessarily reflect the sensitivity on real clinical US that need to be assessed with the 16 UATs.

Tests de détection des antigènes de *Legionella* dans les urines évalués dans cette étude

A	BinaxNOW® <i>Legionella</i> Urinary Antigen Card	I	CerTest Biotec
B	ImmuView S. pneumoniae and L. pneumophila Urinary Antigen Test	J	<i>Legionella</i> Monlab Test
C	Operon Simple/Stick Legio pneumo)	K	<i>Legionella</i> vitassay with pneumococcus
D	Standard F <i>Legionella</i> Ag FIA	L	Urisign <i>legionella</i> color
E	Sofia <i>Legionella</i> FIA	M	I Immunocatch™ <i>Legionella</i>
F	RIDASCREEN <i>Legionella</i> ELISA	N	Nadal® <i>Legionella</i> test
G	Binax™ <i>Legionella</i> Urinary Antigen EIA	O	<i>Legionella</i> K-SeT
H	BIOSYNEX	P	TRU <i>Legionella</i>

Urinary antigen tests (UAT) evaluation for detection of 9 LPS extracted from Lp1 strains

General informations:

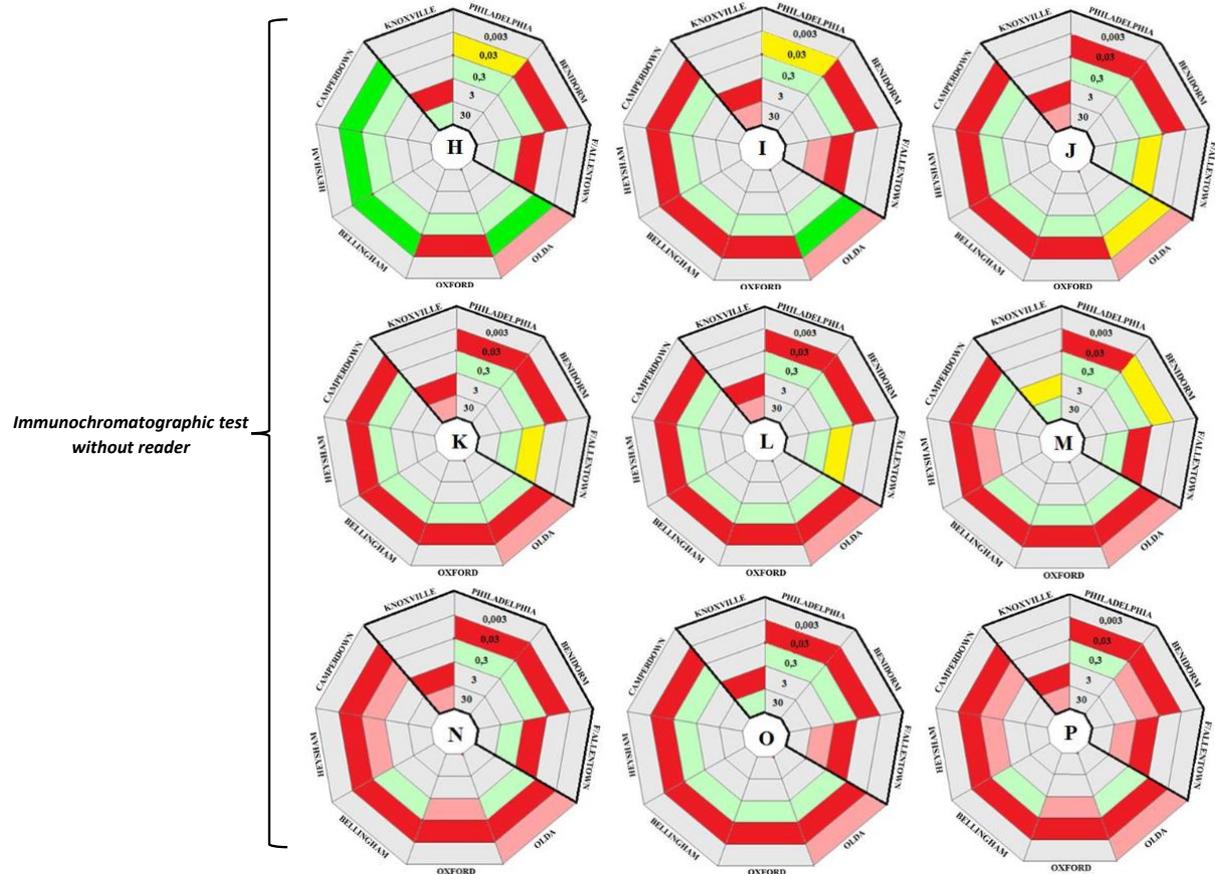
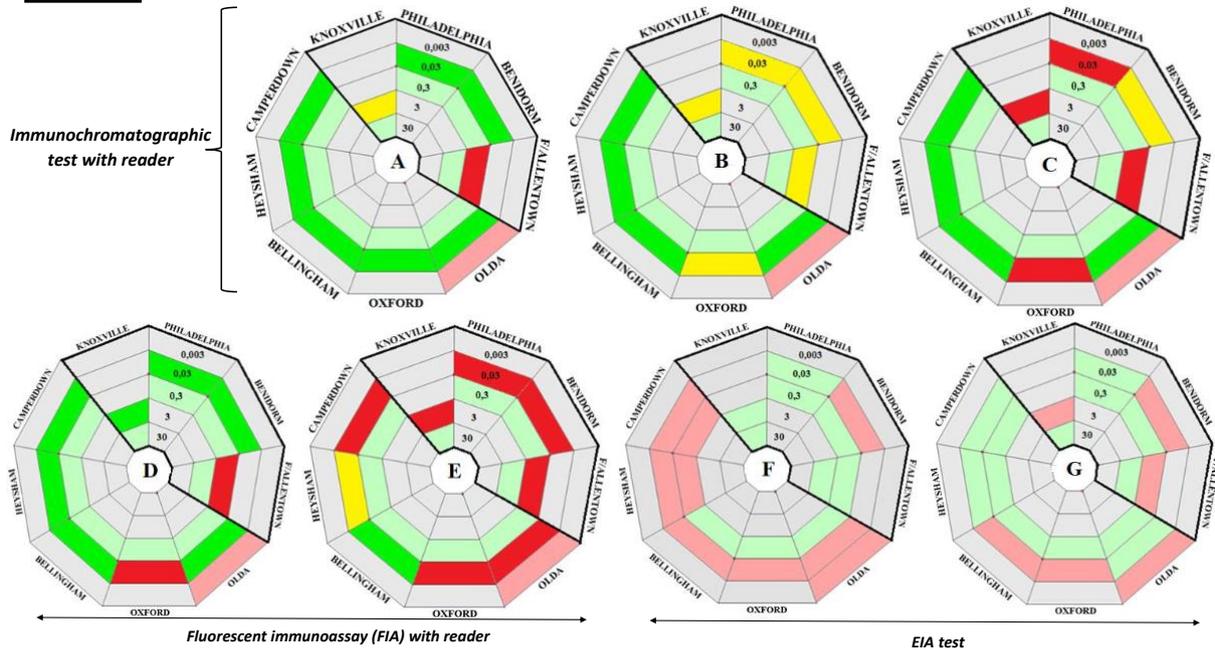
- : LPS concentration not tested
- 3 ; 0,3 ; 0,03 ...** : LPS concentration tested in ng/mL of KDO
- : Pontiac strains (mAb3/1-positive)

LPS concentrations tested on triplicates:

- : 2 out of 3 positive results
- : 1 out of 3 positive result
- : 0 out of 3 positive result

LPS concentrations tested on simplicates (or single run):

- : Positive result
- : Negative result



*** Evaluation de plaques 96 puits MICRONAUT-S (Biocentric) fabriquées à façon pour la réalisation d'antibiogrammes de *L. pneumophila***

Il n'existe pas de kit commercialisé permettant la détermination des CMI des antibiotiques pour *Legionella*. La technique de microdilution utilisée au CNR étant très chronophage, nous avons sollicité Biocentric pour la réalisation de plaques 96 puits permettant de répondre à notre demande au CNR (plaque réalisée en collaboration avec le CNR des IST bactériennes, Bordeaux, présentant des gammes d'antibiotiques adaptées aux *Mycoplasma* et *Legionella*). Un e-poster a été présenté à la RICAI (décembre 2020) et sera présenté au congrès ECCMID 2021.

Evaluation de la technique MICRONAUT-S pour l'antibiogramme de *Legionella pneumophila*

Lise URSAT, Amélie PACCAUD, Anaëlle BOLON, Joséphine CHARAVIT, Laetitia BERAUD, Camille ALLAM, Christophe GINEVRA, Sophie JARRAUD, Ghislaine DESCOURS.

Introduction. L'absence de technique standardisée robuste et/ou commerciale est un frein à la réalisation systématique d'antibiogramme chez *L. pneumophila* et à l'identification de résistances éventuelles. Notre objectif était de comparer les performances d'une technique MICRONAUT-S (biocentric) à celles de la technique de microdilution « maison » utilisée au CNR pour la détermination des CMI et la détection de mutants résistants aux antibiotiques.

Matériels & Méthodes. Les CMI de l'azithromycine (AZI), l'érythromycine (ERY), la lévofloxacine (LVX), la doxycycline (DOX) et la rifampicine (RIF) obtenues par microdilution en plaque 96 puits par les techniques « maison » versus « MICRONAUT-S » ont été comparées pour 171 souches cliniques de *L. pneumophila* séro-groupe 1 (Lp1) et 23 mutants Lp1 sélectionnés in vitro et résistants aux macrolides (n=7), aux fluoroquinolones (n=9) ou à la rifampicine (n=7), selon les protocoles décrits dans le Tableau 1. Les CMI étaient considérées concordantes entre les 2 techniques si le ratio CMI « maison » / CMI « MICRONAUT-S » était égal à 0,5, 1 ou 2.

Résultats. La distribution des CMI obtenues par chaque technique sur les 171 souches de Lp1 est présentée dans le Tableau 2. Par technique MICRONAUT-S, les CMI étaient distribuées sur des gammes allant de 2 (LVX) à 5 (AZI, DOX) concentrations successives, avec une tendance à des CMI plus élevées que celles obtenues avec la technique « maison », en lien avec une meilleure fertilité du milieu industriel (données non présentées). La concordance de CMI entre les 2 techniques était de 76,0% pour AZI, 83,6% pour ERY, 96,5% pour LVX, 77,8% pour DOX et 98,8% pour RIF.

Comme pour la technique « maison », la technique MICRONAUT-S permettait de détecter les souches RIF-R (CMI (RIF) ≥ 4 mg/L), macrolide-R (CMI (ERY) ≥ 1 mg/L) et fluoroquinolone-R (CMI (LVX) $\geq 0,125$ mg/L).

Conclusion. Bien que présentant une concordance limitée avec la technique « maison », la solution MICRONAUT-S (biocentric) combinée à un lecteur automatisé est un outil standardisé permettant la réalisation et la lecture d'antibiogrammes de *L. pneumophila* en un temps réduit. Elle permet également la détection de mutants résistants aux antibiotiques.

La distribution des CMI d'une population plus large de Lp1 est souhaitable au niveau européen afin de déterminer les ECOFF des antibiotiques d'intérêt et de disposer d'une technique robuste s'affranchissant des variabilités inter-techniques.

Tableau 1. Protocoles des techniques « maison » versus « MICRONAUT-S ».

	Maison	MICRONAUT-S
Suspension bactérienne	Inoculum à 0,5 McF (NaCl 0,45%) dilué au 1/100 dans du LGM	Inoculum à 0,5 McF (NaCl 0,45%) dilué au 1/100 dans du LGM
Milieu liquide LGM	Fabrication « maison »	Industriel (tubes 11,5 mL)
Antibiotiques	Dilutions de solutions parentérales	Déshydratés dans la plaque
Temps technique moyen / souche	1h30	10 min
Durée d'incubation	48 heures	48 heures
Lecture	Manuelle (miroir inversé) selon les recommandations EUCAST	Automatisée (TECAN) (cut-off des DO défini par l'industriel)

Tableau 2. Distribution des CMI des 5 antibiotiques testés par microdilution avec les techniques « maison » et MICRONAUT-S, représentée en nombre de souches présentant une CMI donnée.

		CMI (mg/L)												
		≤0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
AZI	Maison				19	43	64	21	8	9	6	1		
	MICRONAUT-S					4	85	55	2	25				
ERY	Maison				1	19	41	61	33	11	5			
	MICRONAUT-S						15	113	37	6				
LVX	Maison		1	17	125	28								
	MICRONAUT-S				44	127								
DOX	Maison							1	1	8	66	84	9	2
	MICRONAUT-S								1		7	90	73	
RIF	Maison	171												
	MICRONAUT-S	169	2*											

AZI, azithromycine ; ERY, érythromycine ; LVX, lévofloxacine ; DOX, doxycycline ; RIF, rifampicine.

* CMI ≤ 0,002 mg/L après vérification.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune en 2020

2.4. Collections de matériel biologique distribuées

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

En 2020, 14 ADN étalon et 12 contrôles quantitatifs (raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement par le CNR à 12 laboratoires environnementaux dont 3 laboratoires à l'étranger (Suisse, Italie et Allemagne) (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.

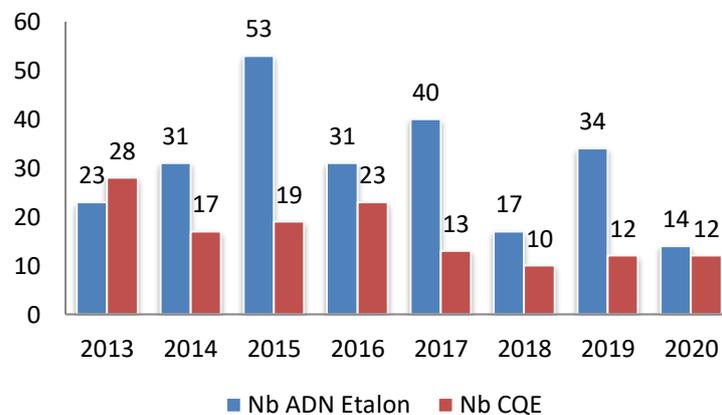


Figure 1. Distribution de l'ADN étalon et du contrôle quantitatif de 2013 à 2020

Distribution de souches de *Legionella* et échantillons biologiques

Aucune distribution de souches ou d'échantillons n'a été réalisée en 2020.

Partage de séquence avec le Public Health England (Vicki Chalker) du génome de souches ST616. Ces souches isolées de patient de différents pays en Europe sont associées à des voyages à Dubaï.

2.5. Activités d'expertise

La synthèse quantitative de l'activité du CNR pour l'année 2020 et son évolution depuis 2016 est présentée en tableau 1.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2016-2020.

Nombre de prélèvements ou souches	2016	2017	2018	2019	2020
EXPERTISE					
Expertise microbiologique (hors protocole de recherche clinique et évaluation de kits)					
Sérologie	944	842	495	349	203 ¹
Culture de prélèvements cliniques	362	451	689	648	523 ²
PCR sur prélèvements cliniques	284	254	226	213	199 ³
Co-culture de prélèvements pulmonaires	177	253	434	150	90 ⁴
Expertise antigènes urinaires	55	110	131	61	68
Identification de souches cliniques ⁵	300	377	489	441	317 ⁶
Expertise souches environnementales	445	462	472	485	320
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	4	2	5	6 ⁶	8 ⁷
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	3	6	3	4	6 ⁸
Détermination de la sensibilité aux antibiotiques (CMI)	7	8	5	103	175
SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE					
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	74	65	62	58	50
Isolats <i>Legionella</i> analysés en PFGE ⁹	510	607	349	11	0
Isolats <i>Legionella</i> analysés en AP-PCR	-	-	-	282	195 ¹⁰
PCR Lp1		358	459	348	210
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	166	115	91	46	27
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou WGS)	352	440	650	596	428 ¹¹
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS	228	366	434	517	555

¹ parmi lesquelles 124 réalisées par technique ELISA et 67 par immunofluorescence ; correspondant à 105 patients.

² 76 cultures additionnelles en 2020 pour un protocole de recherche clinique.

³ PCR réalisées : 173 PCR *L. pneumophila* - *L. non pneumophila* (Diagénode) et 26 PCR *L. pneumophila* - *L. pneumophila* séro groupe 1 (PCR européenne ESGLI), auxquelles s'ajoutent respectivement 78 et 73 PCR pour un protocole de recherche clinique.

⁴ 6 cocultures additionnelles pour un protocole de recherche clinique ; Depuis 2019, analyse réalisée uniquement sur les prélèvements présentant une contamination importante.

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 dans l'année analysée et non les souches reçues et analysées au CNR.

⁶ correspondant à 131 souches reçues et 186 souches isolées au CNR. En 2020, le CNR a également analysé 1 souche en provenance de la Nouvelle Calédonie et une souche isolée en France d'un patient Irlandais (souches non comptabilisées ici).

⁷ 5 terreaux et 1 eau d'appareil d'oxygénothérapie

⁸ 3 terreaux et 1 eau d'appareil d'oxygénothérapie

⁹ abandon de la technique en 2019 au profit du NGS et/ou de l'AP-PCR

¹⁰ parmi lesquelles 31 souches cliniques et 164 souches environnementales

¹¹ toutes les analyses réalisées par SBT ont été confirmées rétrospectivement par WGS

2.5.1. Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses

Le CNR des Légionelles expertise tout type de 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 en diminution de 17% par rapport à 2019, en lien avec une baisse globale de l'incidence de la maladie (2,0/100.000 habitants) (Figure 2). Le nombre de PCR réalisé est stable.

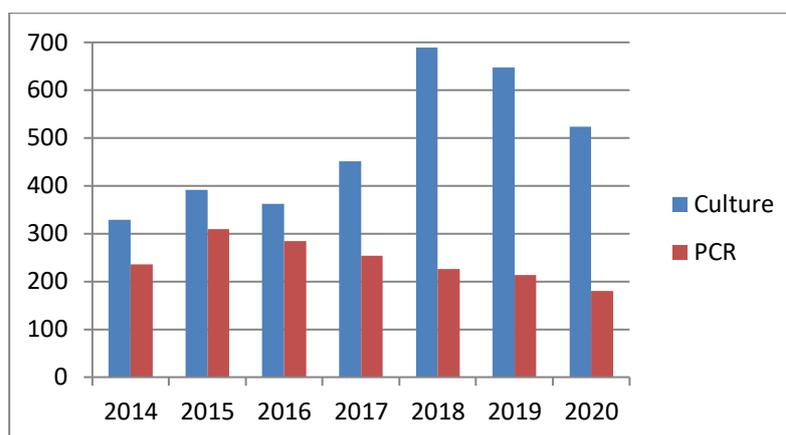


Figure 2. Evolution du nombre de mises en culture et de PCR réalisées sur prélèvements pulmonaires au CNR, 2014-2020.

• Culture

En 2020, parmi les 523 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 192 prélèvements, **soit 36,7 %** des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*, APT) mise en œuvre sur les prélèvements présentant une culture négative a permis d'isoler 1 souche additionnelle. Au total, des légionelles ont été isolées pour 193 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, **soit 36,9% des prélèvements de patients pour lesquels le diagnostic de légionellose avait été posé.**

Enfin, ces données montrent que sur les souches de *Legionella* isolées en France en 2020, le **CNR a isolé plus de la moitié (186/317, soit 58,7%) 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 2020, le CNR a réalisé différents types de PCR à visée diagnostique sur 173 échantillons de patients pour des établissements extérieurs. Parmi celles-ci,

- **27 étaient positives pour *L. pneumophila* dont 15 pour *Lp* séro groupe 1**
- **21 étaient positives pour *Legionella non pneumophila*** ; la PCR 23S-5S réalisée dans un second temps a permis d'identifier 5 cas à *L. longbeachae*, 1 cas à *L. micdadei* et 1 cas à *L. maceachernii*.

Le nombre de prélèvements qui nous ont été adressés pour PCR diagnostique en 2020 (n=173) est en légère augmentation par rapport à 2019 (n=162). La très grande majorité de ces PCR a été réalisée suite à un résultat d'antigénurie négative. Ainsi, en 2020, **40 cas de légionellose** ont été diagnostiqués et déclarés aux ARS suite à une PCR positive au CNR des Légionelles.

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 2020, 68 urines correspondant à 65 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=17
- résultats discordants avant et après chauffage ou impossibilité de chauffage : n=5
- résultat douteux (faible positivité par exemple) : n=4
- résultats discordants entre deux antigénuries successives : n=3
- résultats discordants entre le tableau clinique et le résultat de l'antigénurie : n=1
- résultats discordants entre une lecture à l'œil nu et avec lecteur automatisé (test Abbott) : n=2
- Indisponibilité de la technique (automate en panne) : n=1

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.

Nous avons eu 2 cas de patients avec une antigénurie positive et dont la culture s'est avérée positive à *Legionella pneumophila* d'un autre sérogroupe (Lp3 et Lp 4 ou 10)

Le nombre d'urines expertisées est relativement stable par rapport à l'année 2019.

- **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 : **-41,8% entre 2019 et 2020, et -78,5% 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 2020, 43 partenaires nous ont fait parvenir des sérums pour diagnostic ou confirmation sérologique, contre 30 en 2019.

Le CNR a réalisé 203 sérologies pour ces laboratoires extérieurs, correspondant à 105 patients : 143 sérologies par technique ELISA comme méthode de screening et 66 sérologies par technique d'immunofluorescence.

Parmi les 143 sérums testés par technique ELISA, 17 étaient douteux ou positifs et ont été expertisés par technique d'immunofluorescence ; 7 étaient positifs (4 en Lp1 et 3 en Lp non 1)

Au final, parmi les 203 sérums analysés, 11 étaient positifs pour Lp1, et 14 pour les autres sérogroupe (Lp2-4, Lp5-6 et Lp7-10). A noter qu'il existe de nombreuses réactions croisées entre les sérogroupe de *L. 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 :

Jusqu'en 2020, le CNR utilisait sur un autre site que l'IAI la plateforme des Hospices Civils de Lyon (HCL) dédiée au diagnostic par les techniques de séquençage haut débit nouvelle génération. Cette plateforme dédiée plus spécifiquement aux maladies génétiques constitutionnelles et somatiques, 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 a encore accès à cette plateforme et poursuit de nombreuses interactions avec les utilisateurs.

En 2020, un automate de pipetage nanovolumes (Mosquito HV, SPTLabtech) a été installé sur notre site (Institut des agents infectieux (IAI)) dans le but d'une part de pouvoir réaliser les librairies sur place et d'autre part de réduire les coûts de séquençage par réduction des volumes réactionnels. Suite à la crise sanitaire, un séquenceur Nextseq site 550 a également été installé sur le site de l'IAI. L'acquisition de ces 2 automates nous permet de réaliser l'ensemble du process sur le site de l'IAI. La réduction des coûts permet désormais de séquencer l'ensemble des isolats. 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, RNAseq...)

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, Fastree, 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.

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

Dans le cadre de la surveillance, l'ensemble des isolats cliniques et environnementaux isolés en 2020 ont été séquencés en NGS. Ceci a été rendu possible grâce à :

- Une augmentation de l'accessibilité aux automates et aux séquenceurs liés à l'achat du Mosquito HV et du Nextseq 550 et à leur installation sur notre site.
- Une diminution des coûts de séquençage qui permettent de séquencer le génome complet d'un isolat pour un coût inférieur à un séquençage Sanger des 7 cibles standard de la technique de typage de référence.

Ces acquisitions d'automates ont eu lieu en milieu d'année 2020, une partie des souches ont été séquencées en rétrospectif.

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, 109 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, 253 souches ont été séquencées de façon prospective et 140 de façon rétrospective.

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.

Tableau 2. Numéros d'accèsion des différentes études déposées à l'ENA.

Primary Accession	Secondary Accession	Title
PRJEB40106	ERP123705	Case report of a human pneumonia due to <i>Legionella saintelensis</i>
PRJEB33700	ERP116513	Regulation of Dot-Icm effectors translocation by T4SS GGDEF-EAL proteins in <i>Legionella pneumophila</i>
PRJEB32615	ERP115316	Transmission of Legionnaires' disease through toilets flushing
PRJEB31835	ERP114442	Diverse conjugative elements silence natural transformation in <i>Legionella</i> species
PRJEB15241	ERP016951	MIC distribution among wild-type strains of <i>Legionella pneumophila</i> identify a subpopulation with red [...]
PRJEB14949	ERP016630	<i>Legionella pneumophila</i> Macrolides resistance

3. Activités de surveillance

Eléments clés en termes de surveillance en 2020

- Plus de 232 partenaires sur tout le territoire Français ; forte interaction avec les Agences Régionales de Santé
- La diminution du nombre de cas notifiés en 2020 dans le contexte de pandémie (-27% par rapport à 2019 en France) est rapportée dans la majorité des pays européens ;
- Une investigation menée par le CNR auprès des six principaux fournisseurs de tests d'antigénurie suggère que le recours au diagnostic pour la légionellose n'a pas diminué en 2020 par rapport à 2019 car le nombre de tests diffusés a été plus important (+30%) ;
- Nous avons décrit 7 cas de co-infections Legionella – SARS-Cov-2 en Mars 2020 : une incidence de co-infections a été évalué entre 10% et 14% parmi les cas de légionellose notifiés avec date de début des signes en Mars 2020 ; Le suivi de ces co-infections régulièrement rapportées s'est poursuivi en 2021
- Près de 7% des souches des patients sont des *L. pneumophila* séro groupe non 1 ; cas diagnostiqués en première intention par PCR dont l'utilisation augmente ;
- 555 souches ont été typées par WGS, dont 109 souches dans un contexte d'investigation de la source de contamination et 361 dans un contexte de surveillance ;
- 79% des investigations microbiologiques par WGS se sont révélées positives ; les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination
- De façon constante, plus de 50% des isolats cliniques appartiennent à seulement 9 *Sequence Type* dont les ST23, ST1, ST62, ST259 et ST47 ; Seules les données de cgMLST et les analyses phylogénétiques permettent de discriminer ces souches ;
- Le WGS a permis d'identifier que 8% des isolats cliniques n'appartiennent pas à la sous espèce *Lp subspecies pneumophila* ; il s'agit des sous espèces *Lp subspecies raphaeli*, *Lp subspecies fraseri* et à une potentielle nouvelle sous espèce

3.1. Description du réseau de partenaires

Nos partenaires sont répartis sur l'ensemble du territoire français. En 2020, **68 partenaires** nous ont envoyé **154 souches cliniques** (Figure 3A). Ce chiffre est inférieur aux années précédentes (86 partenaires en 2019 pour 259 souches cliniques envoyées) mais reste concordant avec la baisse d'activité globale liée à la pandémie de Covid-19. 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 2020 (13 souches). Les laboratoires situés dans l'Ouest de la France nous ont également envoyées un nombre important de souches à relier à une forte incidence constante sur cette région (7 souches reçues de Colmar, 6 de Nancy et 5 de Strasbourg). Enfin le laboratoire du centre hospitalier d'Annecy nous a adressé 6 souches.

En parallèle, **153 partenaires** nous ont envoyé **523 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. Nous notons cette année l'utilisation plus fréquente de PCR diagnostic par nos partenaires avec **27 prélèvements** reçus de **23 partenaires** pour lequel le diagnostic de légionellose a été posé par PCR dans le laboratoire expéditeur (Figure 3C).

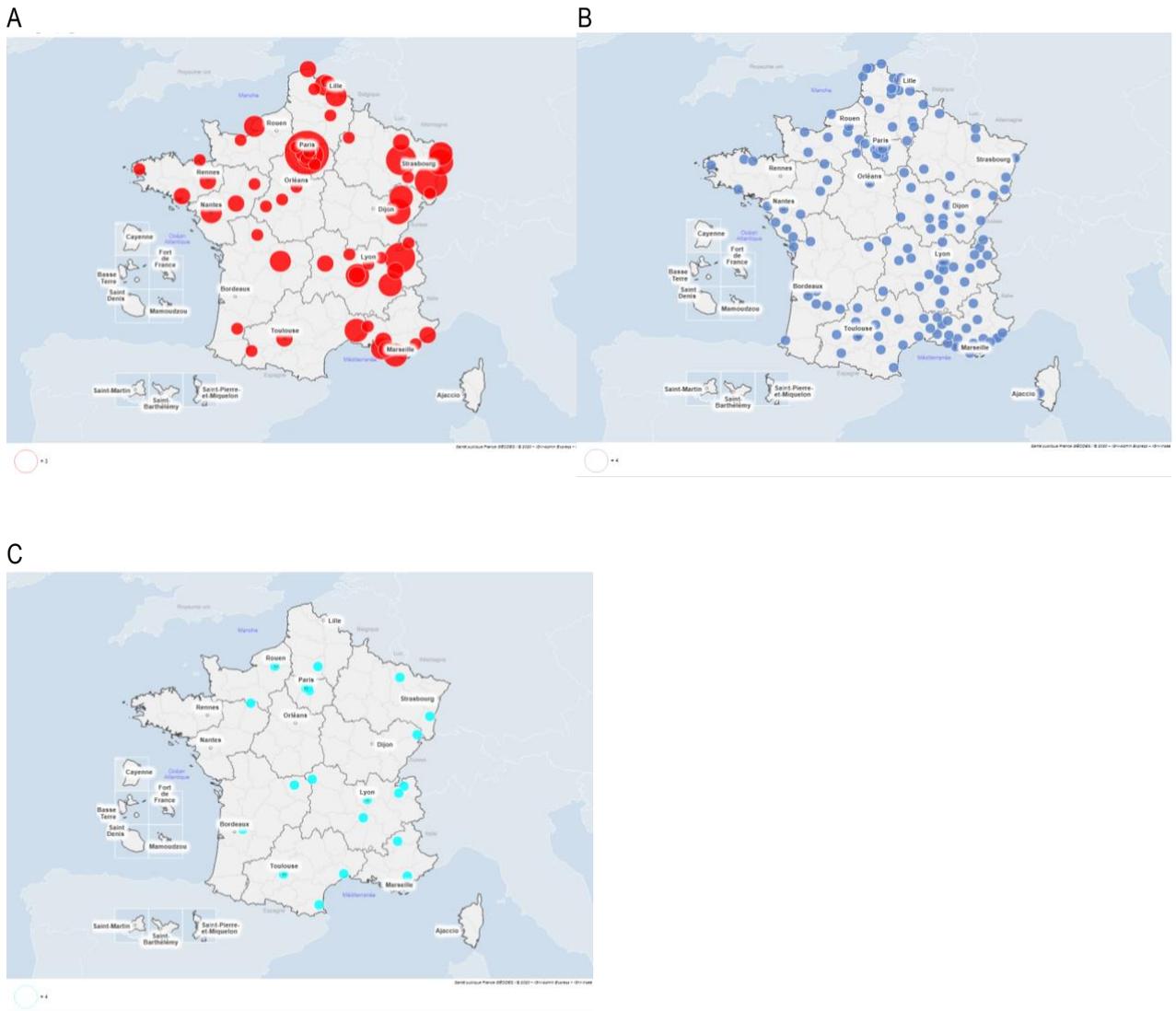


Figure 3. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des souches cliniques (A) ou des prélèvements respiratoires pour mise en culture, le diagnostic de légionellose étant retenu par antigénurie et/ou PCR (B) ou par PCR uniquement (C).

Le CNR est également sollicité pour l'aide au diagnostic de légionellose. En 2020, **38 partenaires** nous ont envoyé **154 prélèvements respiratoires pour diagnostic** (antigénurie négative ou non réalisée) (Figure 4). Le nombre de partenaires est nettement inférieur aux années précédentes (79 en 2019) signe probablement du développement des PCR *Legionella* dans d'autres laboratoires. Le nombre de PCR demandées est stable malgré la forte diminution du nombre de partenaire ce qui est probablement lié à des protocoles incluant cette analyse dans les bilans diagnostics ou de suivi des infections à covid-19.

De plus, **41 partenaires** nous ont envoyé des **prélèvements d'urines** (Figure 5A) pour expertise et **38 partenaires** nous ont fait parvenir des sérums pour **diagnostic ou confirmation sérologique** (Figure 5B).



Figure 4. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.

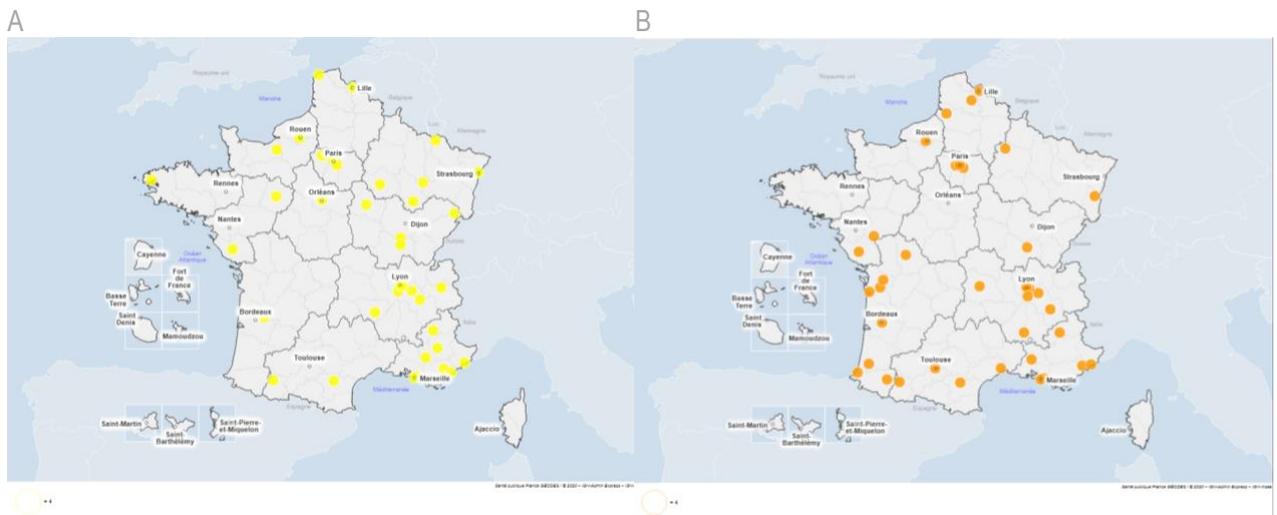


Figure 5. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des urines (A) ou des sérums pour expertise (B).

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

En 2020, 18 partenaires nous ont envoyé des souches environnementales pour identification (Figure 6A) et 40 partenaires nous ont envoyé des souches environnementales pour comparaison avec une souche clinique (Figure 6B). Le nombre de partenaires nous ayant envoyé des souches pour comparaison reste stable par rapport aux années précédentes, signant le maintien de l'activité d'enquête des Agence Régionales de Santé malgré le contexte épidémique. A l'inverse, le nombre de partenaire nous ayant adressé des souches environnementales pour identification a été divisé par deux.

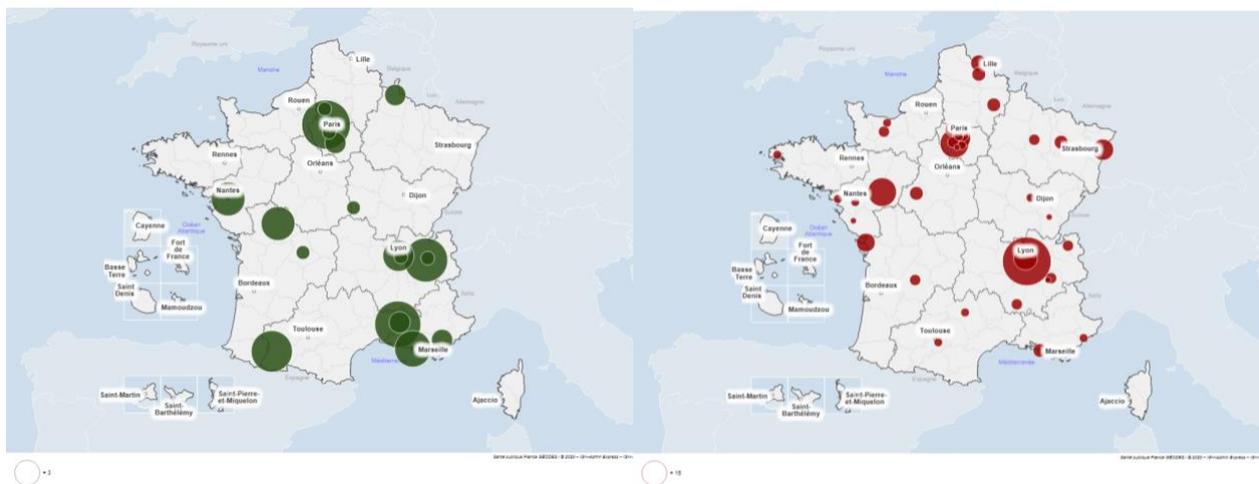


Figure 6. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des souches environnementales pour identification (A) ou comparaison (B).

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 2020, **1 328 cas** de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire. Parmi eux, 12 cas étaient des résidents des DROM (10 cas à la Réunion, 1 en Guadeloupe et 1 en Martinique) et 13 cas étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux de notification des cas de légionellose en France était de **2,0/100 000 habitants** (France métropolitaine 2,0/100 000 habitants).

Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2020 était nettement inférieur à celui de 2019 (1 816 cas soit **-27%** correspondant à un taux de notification de 2,7/100 000 habitants). Ces indicateurs étaient légèrement supérieurs à ceux de 2016 (1 218 cas, 1,8/100 000 habitants) (Figure 7).

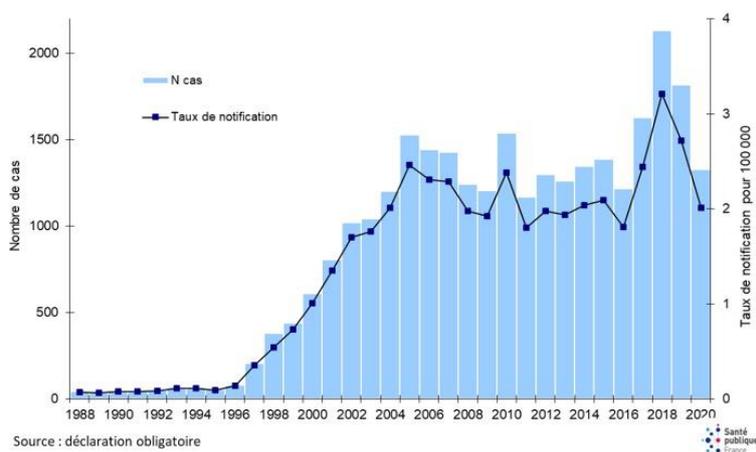


Figure 7. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2020 (Santé publique France).

Parmi les 1328 cas, 1 268 (95%) étaient des cas confirmés : la détection des antigènes solubles urinaires était la principale méthode diagnostique utilisée (1 231 cas, 93%). Une PCR sur prélèvement respiratoire était positive pour 206 cas (16%), proportion comparable à celle de 2019 (14%). Pour 58 (4,7%) cas, la PCR était la méthode de diagnostic biologique, proportion en augmentation en comparaison de 2019 (46 cas : 2,5%, $p=0.004$). Quelques cas avaient été uniquement diagnostiqués par culture (4 cas) ou par sérologie (4 cas) (Figure 8).

La grande majorité des cas de légionellose était due à l'espèce *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 (Lp1) (1248/1328, 94%).

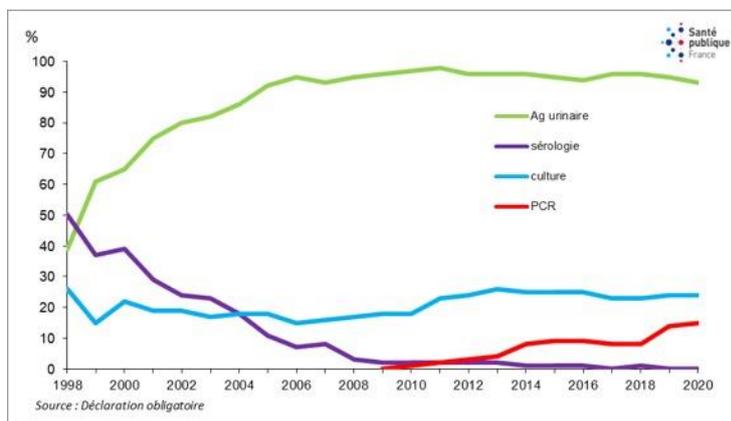


Figure 8. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2020 (Santé publique France).

Le gradient géographique Ouest-Est du taux de notification des cas de légionellose était toujours marqué, variant de 0,7 /100 000 habitants en Bretagne à 3,7/100 000 habitants en Provence-Alpes-Côte d’Azur (Figure 9).

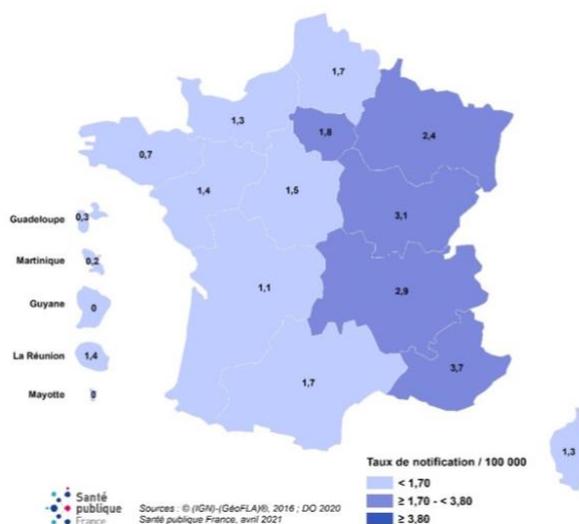


Figure 9. Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2019 (Santé publique France).

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 au congrès SFM en 2019 et poster à ESGLI 2019 à Athènes). En 2020, un autre cas a été rapporté par le CHRU de Nancy pour lequel il a été isolé une souche de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 ST6 d'un prélèvement de tissu mou dans un tableau clinique de fasciite nécrosante.

3.2.3. Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR

Parmi les 1328 cas de légionellose notifiés en 2020, une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 317 cas soit **23,9% des cas**. Ce pourcentage est stable par rapport aux années précédentes (Figure 10).

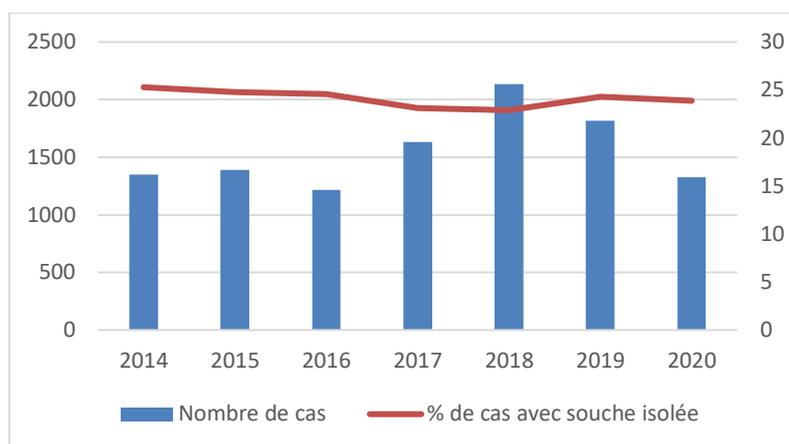


Figure 10. Evolution du pourcentage des cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2014 – 2020.

* **Espèces et sérogroupes des souches cliniques.** Le sérotype des souches *L. pneumophila* est identifié par agglutination de latex (réactif Oxoid 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 317 souches isolées, la majorité (313/317, 99%) étaient des *L. pneumophila* dont 293 Lp1 et 20 (6,8%) appartenant à d'autres sérogroupes (Tableau 3).

En 2020, les 5 souches de ***Legionella non pneumophila*** répertoriées ont été isolées par le CNR à partir de prélèvements respiratoires reçus pour PCR diagnostic. Contrairement aux années précédentes, aucune souche de *Legionella non pneumophila* n'a été isolée par un autre laboratoire.

Les 4 prélèvements respiratoires positifs à *L. longbeachae* provenaient de 4 laboratoires situés dans la Sud-Ouest de la France (Agen, Libourne, La Roche Sur Yon et Bayonne). Cette répartition géographique particulière de *L. longbeachae* n'avait pas été observée les années précédentes. En 2020, le CNR a également isolé une souche de *Legionella maceachernii* à partir d'un prélèvement de LBA provenant du laboratoire de Nouméa en Nouvelle Calédonie. Les 5 patients présentant ces infections à *Legionella non pneumophila* présentaient des tableaux cliniques sévères (hospitalisation en réanimation) de légionellose. Un était immunodéprimé (leucémie lymphoïde chronique).

Parmi les **20 cas d'infections à *L. pneumophila* sérotype non 1** avec souche disponible, la souche à sérotyper nous a été adressée directement pour 9 cas. Pour les 11 autres cas, le prélèvement nous a été adressé pour mise en culture suite à une PCR positive (n=10) ou pour réalisation de la PCR (n=1). Il est à noter que pour 2 de ces cas, l'antigénurie était également positive (1 cas à *Legionella pneumophila* sérotype 4/10 et un cas à *Legionella pneumophila* sérotype 3/6).

La proportion d'infection à *Legionella non pneumophila* ou *L. pneumophila* sérotype non 1 reste constante cette année.

Par ailleurs, nous avons reçu en 2020 une souche de *L. pneumophila* sérotype 1 isolée d'un prélèvement d'hémoculture. Nous avons également reçu la souche isolée d'un prélèvement respiratoire pour cette même patiente.

* **Souches atypiques.** Nous avons noté en 2020, 2 souches présentant des caractéristiques culturelles atypiques :
 - une souche *L. pneumophila* sérotype 1 qui présentait une croissance sur gélose au sang ;
 - une souche *L. pneumophila* sérotype 1 qui présentait une sensibilité accrue au béta-lactamines et notamment au céfamandole, ce qui entraînait une pousse lente sur gélose BMPA (comparativement au milieu MWY et BCYE).

Tableau 3. Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupe de *L. pneumophila*, 2013 – 2020.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements							
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<i>Legionella pneumophila</i>	321	333	342	296	373	478	433	313
sérogroupe 1	305	313	328	281	361	456	398	293
sérogroupe non 1	16	20	14	15	12	22	35	20
sérogroupe 2	2	3			1		6	4
sérogroupe 3	9	6	3	1	5	6	6	3
sérogroupe 4				1				
sérogroupe 5	2	1	1				2	
sérogroupe 6	2	2	4	6	2	5	4	2
sérogroupe 7	1	2	3	1	1		4	2
sérogroupe 8		2		1	1	2	5	5
sérogroupe 9								1
sérogroupe 10		3	1	3		2	2	
sérogroupe 12					1	1		
sérogroupe 13				1				1
sérogroupe 14						1	1	
sérogroupe indéterminé*		1	2	1	1	5	5	2
<i>Legionella non pneumophila</i>	2	7	4	4	5	11	8	5
<i>Legionella dumoffii</i>	1				1	1		
<i>Legionella micdadei</i>		1		2		1		
<i>Legionella longbeachae</i>	1	5	2			8	5	4
<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 ciniciensis</i>								
<i>Legionella wadsworthii</i>								
<i>Legionella sainthelensis</i>						1		
<i>Legionella maceachernii</i>				1				1***
<i>Legionella jordani</i>							1	
Total	323	340	346	300	378	489	441	318

* réaction croisée en immunofluorescence directe

** fièvre de Pontiac

*** souche isolée d'un prélèvement envoyé par le laboratoire de Nouméa donc non comptabilisé dans le bilan de Santé publique France

* 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 2020, 428 isolats cliniques et environnementaux de Lp ont été analysés. L'ensemble des Lp analysées appartenait à 90 *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 6 dernières années est représentée en Figure 11.

- Analyses phylogénétiques.** L'analyse phylogénétique des isolats permet une meilleure discrimination des souches très proches, non distinguable par le cgMLST. Elle permet aussi une analyse des populations de façon globale. Cette analyse nous permet de mettre en évidence les différentes sous espèce de Lp (figure 13). En 2020, parmi ces isolats de *L. pneumophila* (Lp), environ 92% appartiennent à la sous espèce *Lp* subspecies *pneumophila*, 6.9% à la sous espèce *Lp* subspecies *raphaeli*, 0.2% à la sous espèce *Lp* subspecies *fraseri* et 0.7% à une potentielle nouvelle sous espèce (sur la base de l'analyse phylogénétique et du pourcentage d'identité du génome (figure 14).

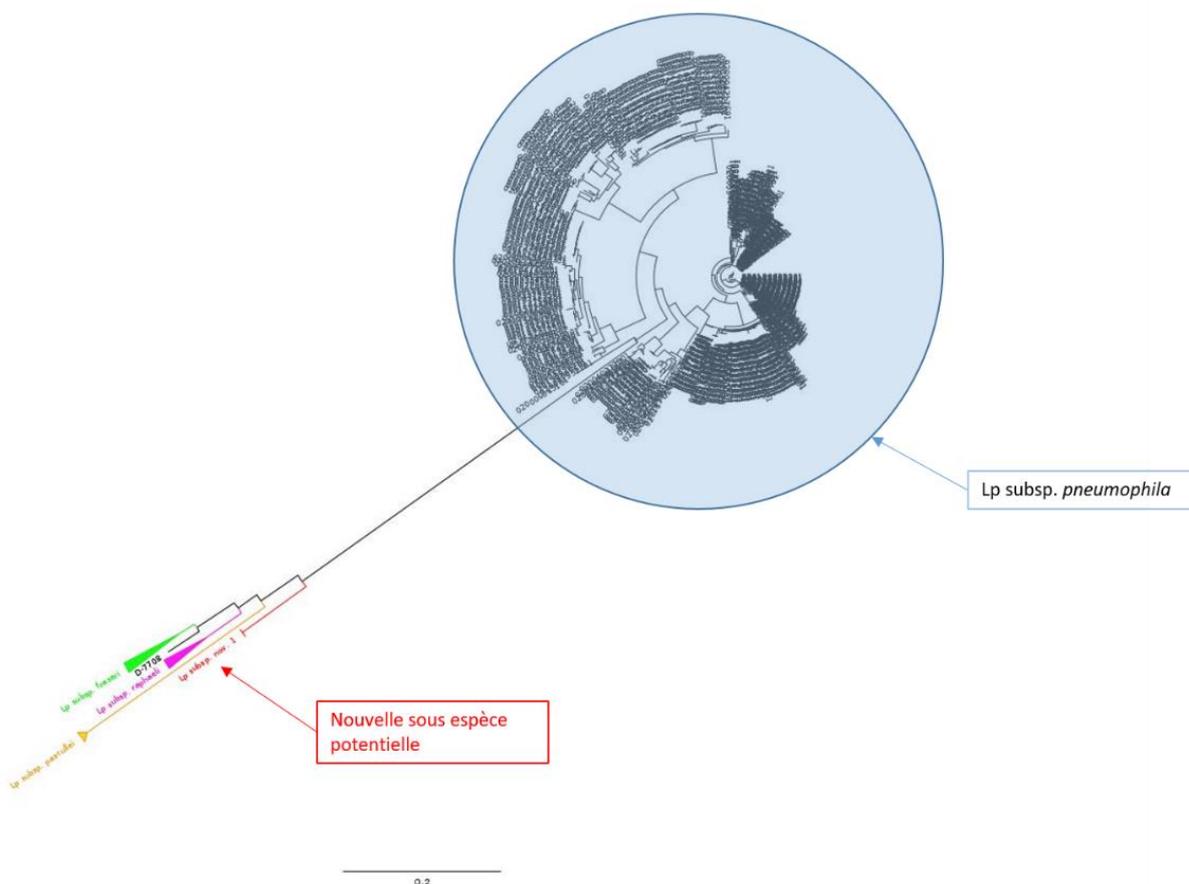


Figure 13. Arbre phylogénétique de l'ensemble des souches de *Legionella pneumophila* (Lp) isolées en 2020.

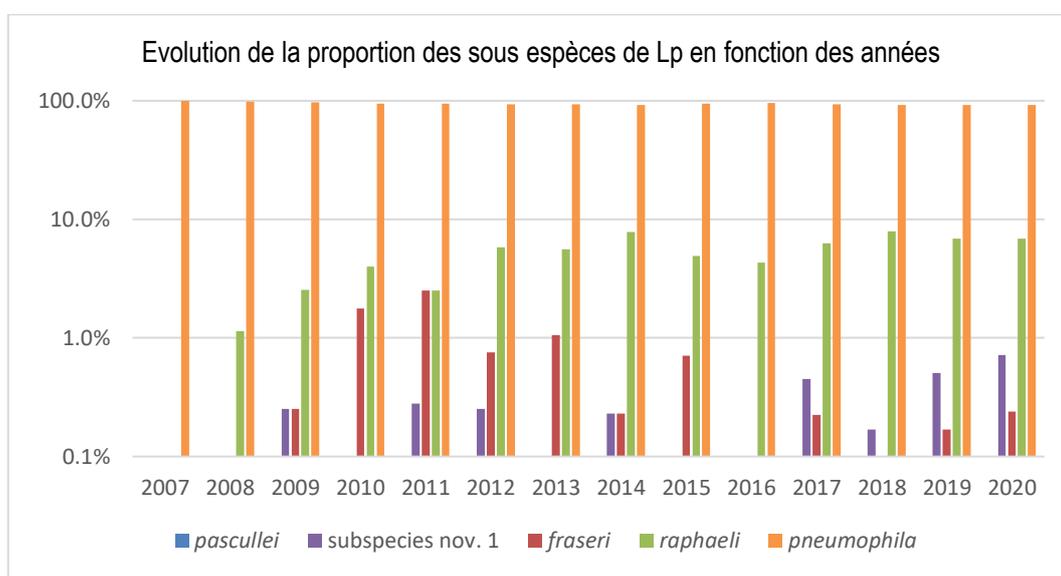


Figure 14. Evolution des sous espèces de Lp entre 2007 et 2020.

- **AP-PCR.** Avant de basculer complètement vers une base de données de souches génotypées exclusivement par WGS 195 isolats ont été typés par AP-PCR.
- **NGS.** Un total de 555 souches a été analysé par WGS, 109 souches dans un contexte d'investigation de la source de contamination et 253 dans le contexte de surveillance prospectivement, 109 rétrospectivement, 65 dans le cadre d'études et 19 CQE (Contrôle de Qualité Externe) (Figure 15) (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, 40 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.

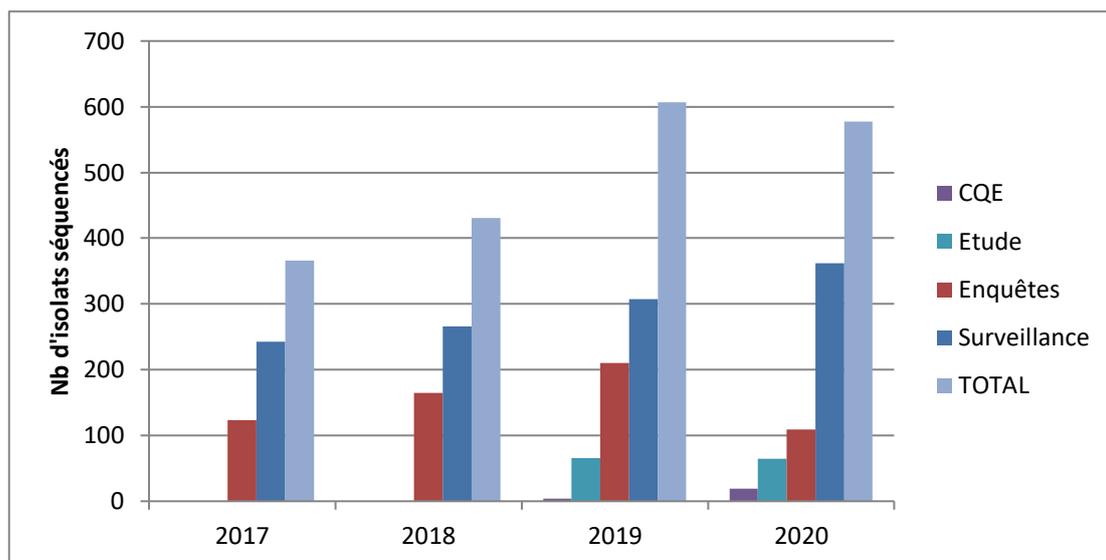


Figure 15. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.

- **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 2020, 18 prélèvements ont été analysés par cette technique. Un ST complet a été obtenu directement sur prélèvement respiratoire pour 1 seul cas (7 cas en 2019) ; pour 11 prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié.

3.2.4. Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR

En 2020, 320 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 320 souches, 296 (92,5 %) étaient des *Legionella pneumophila* ; la répartition des sérogroupes est présentée en Figure 16A. 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 et 32 en 2020). L'identification des 24 souches d'origine environnementale (7,5%) de *Legionella non pneumophila* a été réalisée soit par séquençage du gène *mip* (technique de référence), soit par technique de MALDI-TOF. La répartition des espèces identifiées est présentée en Figure 16B.

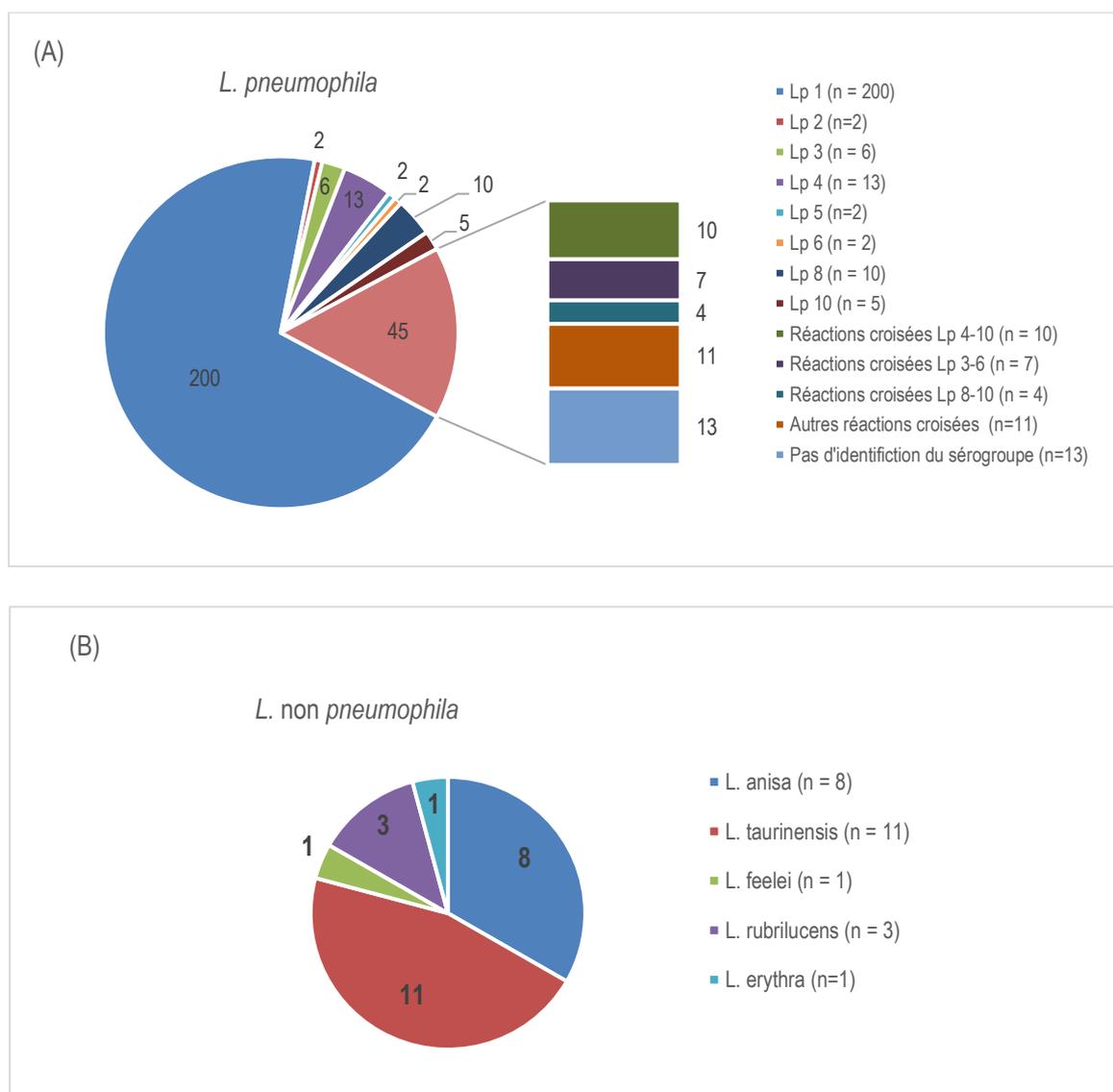


Figure 16. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2020, (A) en termes de sérotype des souches de *L. pneumophila* ; (B) en termes d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila*.

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

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

- **Techniques phénotypiques**

Il n'existe actuellement 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. En 2020, en association avec les autres laboratoires de référence européens, le CNR a participé à l'élaboration de recommandations pour la réalisation des antibiogrammes de *Legionella* (Portal E., *et al. Legionella antibiotic susceptibility testing: is it time for international standardisation and evidence-based guidance?* J Antimicrob Chemother, 2021;76(5):1113-6).

Le CNR a parallèlement sollicité l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) afin de proposer une alternative à la technique de *screening* de la résistance proposée jusqu'à présent (technique par diffusion sur milieu BCYE utilisant des bandelettes Etest et induisant une augmentation des CMI en raison de l'utilisation d'un milieu contenant du charbon). Les nouvelles recommandations de l'EUCAST positionnant la technique de microdilution utilisée au CNR comme une alternative évitant ce biais viennent de paraître :

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Legionella_guidance_note_-_20210528.pdf

- **Techniques moléculaires**

Les mutations associées à une résistance aux antibiotiques indiqués dans la légionellose sont bien caractérisées :

- 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 dans le gène codant 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).

Ces mutations sur les gènes impliqués (respectivement *rplD*, *rplV*, *rrl*, *gyrA* et *rpoB*) sont systématiquement recherchées sur toutes les souches pour lesquelles un WGS est réalisé, n=555 en 2020.

Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche, le CNR dispose également de PCR ciblées pour détecter ces mutations. 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, 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

Le CNR est relativement peu sollicité pour la réalisation d'antibiogrammes, du fait principalement du message énoncé depuis de nombreuses années concernant l'absence de résistance pour *Legionella*. En 2020, le CNR a réalisé 4 antibiogrammes par microdilution pour des souches cliniques isolées de 3 patients d'évolution péjorative, à la demande de cliniciens. Pour un patient, nous disposons d'une première souche isolée au moment du diagnostic et d'une seconde souche isolée après 5 semaines d'antibiothérapie, dans un contexte d'abcédation pulmonaire. Pour les deux autres patients, nous disposons de la souche initiale.

Pour faciliter la veille du CNR sur cette antibiorésistance, dans l'objectif d'une transposition de la technique « maison » vers une technique automatisée, nous avons évalué la technique de microdilution MICRONAUT-S combinée à un lecteur TECAN. Un total de 171 souches cliniques isolées (cohorte de patients inclus dans les protocoles de recherche FRM et PROGLEGIO avant 2020) a été testé. L'étude se poursuit de façon prospective en 2021.

Aucune résistance (phénotypique ou moléculaire) n'a été identifiée parmi les souches testées en 2021.

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, interface de partage sécurisé) 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 2020, des **courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF pour **571 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.

- **Analyses communes**

- *** Description de co-infection *Legionella* – SARS-Cov-2.**

En Mars- Avril 2020 le CNR et Santé publique France ont eu connaissance de plusieurs cas de co-infections de *Legionella* et SARS-Cov-2. Dans l'objectif de caractériser l'incidence de ces co-infections nous avons réalisé une étude rétrospective sur les cas de légionellose notifiés avec une date de début des signes en Mars 2020 et leur statut sur une infection à SARS-Cov-2. Cette étude intéressante qui montre une incidence entre 10 et 14% de co-infections parmi les cas de légionellose notifiés en Mars 2020 a été soumise à *Emerging Infectious Disease*.

Title: Co-infection of *Legionella* and SARS-CoV-2 in France, March 2020

Authors: Camille Allam, Alexandre Gaymard, Ghislaine Descours, Christophe Ginevra, Laurence Josset, Maud Bouscambert, Laetitia Beraud, Marine Ibranosyan, Camille Golfier, Arnaud Friggeri, COVID-19 diag HCL consortium, Bruno Lina, Christine Campese, Florence Ader, Sophie Jarraud

We describe the co-occurrence of Legionnaires' disease (LD) and COVID-19 in France in March 2020. SARS-CoV-2 co-infections were identified in 7 (14%) of 49 notified LD cases. Most co-infected patients were elderly men with comorbidities. They presented extremely severe pneumonia and 2 of them died, illustrating the relevance of co-infection screening.

To evaluate LD and COVID-19 co-occurrence, we retrospectively included all notified LD cases with onset symptoms from March 1 to 31, 2020. Cases were patients with clinical and/or radiological signs of pneumonia combined with *Legionella* isolation and/or positive *Legionella* PCR from broncho-pulmonary secretions, and/or positive *Legionella pneumophila* serogroup 1 urinary antigen test (Lp1 UAT). During the study period, 65 LD cases were notified (from 59 hospital laboratories in 47 cities), compared to 79 notifications in March 2019. Among the 65 patients, 49 were tested for LD and COVID-19 (7 were positive for both), 12 did not have a SARS-CoV-2 test, and no information was available for 4 patients. The frequency of proven co-infection was 14% (14/49) of LD cases. This frequency may be overestimated because COVID-19 incidence was low (<5 cases/100 000 persons) in the region of residence of the 16 non-tested patients at the time of symptom onset; thus the co-infection frequency can be estimated to range from 10.8% (7/65) and 14% (7/49).

The present study found a high proportion of COVID-19 among cases of notified LD during March 2020. Patients with *Legionella* and SARS-CoV-2 co-infection were mostly elderly men with underlying co-morbidities. They required ICU admission more frequently and had a higher case-fatality rate than patients without SARS-CoV-2 co-infection, but had a similar case-fatality rate to that reported for LD patients overall who are admitted to an ICU (7,10).

Longitudinal monitoring of a single co-infected patient found a first phase of viral replication predominance followed by *Legionella* resurgence and worsening respiratory condition. Initial viral infection could establish pulmonary damage suitable for the bacteria development, as observed for bacterial super-infections in influenza-infected patients (15). Such co-infections may lead to poor prognosis as demonstrated herein and shown by others (3), which underlines the importance of extended respiratory pathogens screening in patients with suspected or confirmed COVID-19.

- *** La baisse de 27% du nombre de cas de légionellose notifiés en 2020 comparé à 2019 n'est pas due à une baisse du diagnostic de légionellose durant la pandémie**

Durant la période d'étude sur les co-infections *Legionella* SARS-Cov-2 (Mars 2020), nous avons identifié une diminution de 18% du nombre de cas notifiés par rapports à 2019 (65 cas notifiés vs 79 en 2019). Afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une diminution des demandes de diagnostic de légionellose nous avons contacté les 59 laboratoires hospitaliers (47 villes) ayant réalisé le diagnostic des 65 cas pour connaître le nombre d'antigénurie réalisé (test le plus fréquemment utilisé pour le diagnostic en France (96%) en 2019 et 2020. Une augmentation du nombre de tests réalisés a été observée, passant de 3 203 en mars 2019 à 8 004 en mars 2020 (multiplication par 2,5, IQR : [1,6-2,8]). En parallèle, les données obtenues auprès de 6 grands fournisseurs de tests urinaires ont confirmé une augmentation des tests vendus aux laboratoires français (multiplication par 2,1, IQR : [1,52 - 14,8]) sur ces deux périodes. L'augmentation de tests vendus sur l'ensemble de la France s'est confirmée sur la totalité de l'année 2020 (multiplication par 1.3).

Ainsi, la baisse de l'incidence des cas de légionellose observée en 2020 ne semble pas due à un sous-prescription des tests de diagnostic de la légionellose.

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. Dans ce cadre, S. Jarraud est nommé comme « contact point – laboratory expert » pour la maladie des légionnaires au niveau européen.

* Le CNR a participé à la campagne d'évaluation externe de la qualité proposé par l'ECDC. Cet EEQ auquel 26 laboratoires cliniques et 19 laboratoires environnementaux (un laboratoire de chaque type par pays participants) ont participé permettait l'analyse de 10 échantillons cliniques (5 prélèvements respiratoires et 5 prélèvements d'urines) et de 10 échantillons environnementaux. Cet EEQ de fréquence biannuelle n'a été programmé qu'une fois en 2020 en raison de la crise sanitaire.

* 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. Le site du PHE abritant les données de SBT a été sur de longue période indisponible durant 2020 ce qui peut entraîner des difficultés d'attribution des ST des souches analysées.

* **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 avec le département de microbiologie de Belgrade (Serbie).**

En 2020, nous avons apporté une aide diagnostic au Dr Milica Jovanovic du département de microbiologie de Belgrade, en réalisant 2 sérologies pour un patient ayant présenté des signes de légionellose et pour qui le diagnostic a été posé par PCR par son laboratoire. L'antigénurie du patient, ainsi que la culture des prélèvements respiratoires réalisés à Belgrade s'étaient avérées négatifs. Les sérologies réalisées au CNR ont permis d'affirmer une séroconversion à *Legionella pneumophila* séro groupe 2.

***Collaboration avec l'anses** (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). En 2020, nous avons participé à une étude coordonnée par l'anses dont l'objectif était d'évaluer la valeur prédictive d'une lecture précoce des milieux de culture permettant la recherche de *Legionella pneumophila* dans l'eau des réseaux. Cette étude s'inscrivait dans une démarche gouvernementale afin d'assurer la sécurité des ERP (Etablissement Recevant du Public) amenés à rouvrir après une période de confinement. Au total 52 laboratoires dont le CNR ont participé à cette étude, permettant l'exploitation de 3483 échantillons.

* **L'expertise du CNR sur l'étude de la résistance de *Legionella* aux antibiotiques a permis grâce à une collaboration initiée avec le Public Health England (Vicky Chalker) et Cardiff University (Brad Spiller) de proposer avec 10 partenaires internationaux (européens, USA, Israël, Canada) une publication commune sur la standardisation des méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour *Legionella* (Publication dans JAC en 2021).** Nous avons par ailleurs proposé à l'EUCAST un document pour ajouter comme méthode recommandée la méthode de microdilution en milieu liquide pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Legionella*, ce qui a été validé (https://www.eucast.org/eucast_news/news_singleview/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=436&cHash=8b0a5c767da917207a28f8f9c864d2f6).

* **Coordination d'une étude multicentrique européenne du groupe ESGLI sur l'évaluation de 16 kits de détection des antigènes urinaires de *Legionella*** par 9 centres de référence européens, soutenue par l'ESCMID (cf paragraphe 2.2).

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 implique 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 a démarré en septembre 2020. Elle est encore en cours en 2021.

* **Collaboration pour l'édition de guide de recommandation** sur le risque *Legionella* pour les établissements hospitaliers, les maisons de repos et de soins, et les grands bâtiments lors de leur ré-ouverture suite au confinement (Cf Chapitre 5.1)

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

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

Parmi les 1328 cas de légionellose diagnostiqués en 2020 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2020), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour **42 cas de légionellose**, soit **3,1 %** de l'ensemble des cas et **13%** des cas avec souche disponible. Parmi les 42 cas investigués, les profils génomiques des souches clinique et environnementale(s) se sont révélés **identiques pour 34** des 43 investigations (1 cas avec comparaison pour deux lieux distincts) (**79%**) (Figure 17).

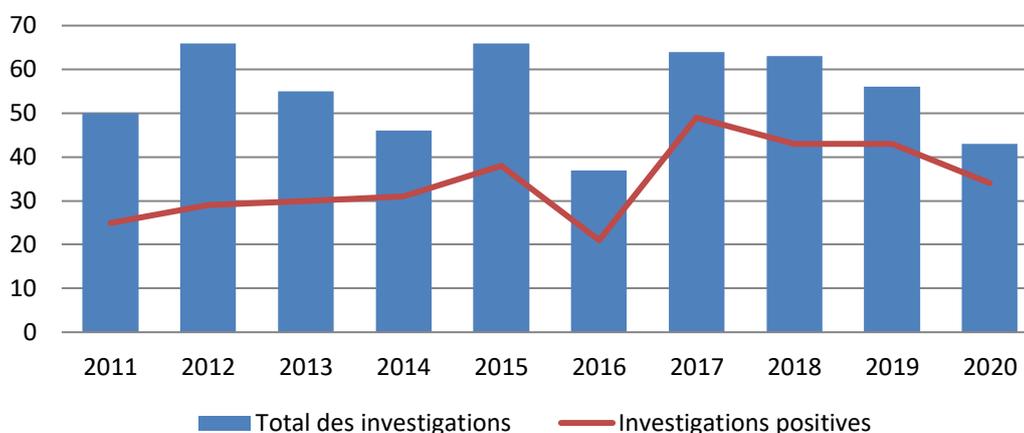


Figure 17. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.

Pour les 42 cas de 2020, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que **les réseaux d'eau sanitaire** étaient la source la plus probable de contamination dans 10/12 établissements de santé, 14/17 domiciles, 4 établissements de tourisme, 2/2 établissements de personnes âgées et 2 autres établissements (une caserne et une chambre crous) (Tableau 4). Enfin pour 2 cas, les investigations environnementales ont permis de préciser qu'un spa et un réseau de refroidissement d'une machine à presse était les sources de contamination les plus probables.

Dans le contexte des restrictions sanitaires de 2020, nous notons une baisse d'implication des établissements de tourisme dans les enquêtes (4 en 2020 contre 10 en 2019) et une hausse d'investigation des domiciles (17 en 2020 contre 13 en 2019).

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 18).

Tableau 4. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2020.

	Investigations positives		Investigations négatives N	Investigations totales	
	N	%		N	%
Hôpitaux	10	83%	2	12	28%
EHPAD/ MR	2	100%	0	2	5%
Domicile	14	82%	3	17	40%
Tourisme	4	80%	1	5	12%
Autres	4	67%	2	6	13%
TAR	0	0%	1	1	2%
TOTAL	34	79%	9	43	100%

MR : maison de retraite

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

- une eau de spa
- une eau de système de refroidissement de machine à presse ;
- un bassin d'immersion situé sur le lieu de travail du patient.

Pour chaque enquête, nous avons comparé la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire du patient à 1 à 10 souches environnementales issues de prélèvement d'eau auquel le patient avait potentiellement été exposé. Ces souches environnementales provenaient pour la majorité des cas (n= 36) d'un unique point d'eau. Pour 5 cas, nous avons reçu des souches de 2 points d'eau d'un même réseau et pour 2 cas, nous avons reçu des souches de plusieurs sources potentielles de contamination.

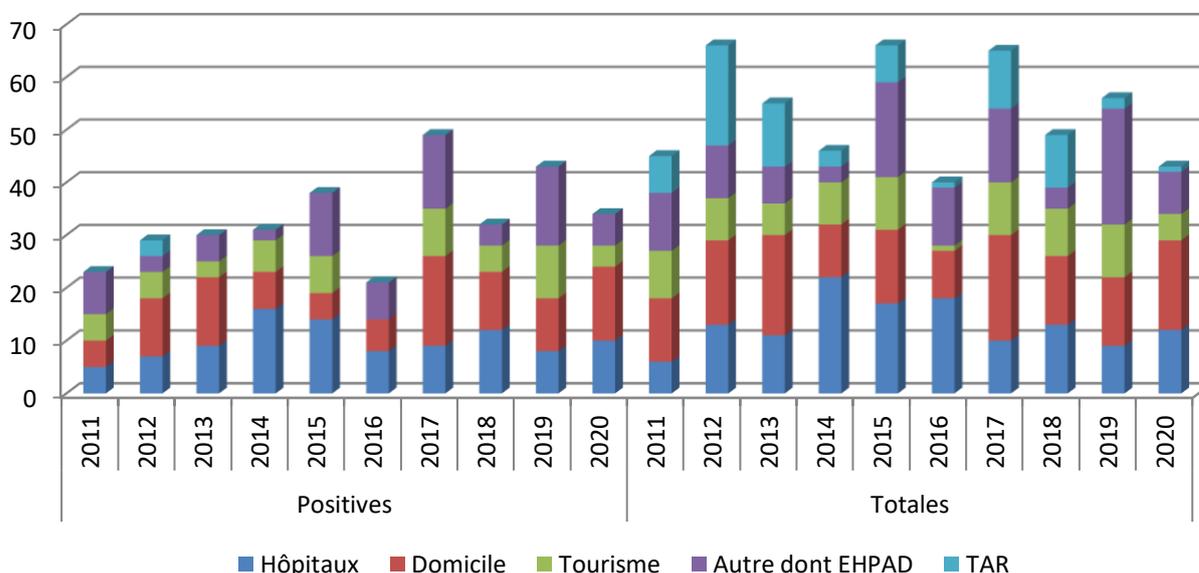


Figure 18. Investigations épidémiologiques réalisées entre 2011 et 2020 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête.

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

Alors que 79% (n=34) des investigations identifiaient des STs identiques entre isolats cliniques et environnementaux, il est à noter que 38% (13/34) de ces investigations positives impliquaient des ST1 (12 cas) et ST23 (1 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. Il est également intéressant de noter que pour une enquête où 2 sources environnementales avaient été investiguées (une eau chaude sanitaire d'un service hospitalier et une eau de TAR), les données de ST retrouvaient un ST1 pour toutes les souches mais les données de WGS ont permis d'incriminer préférentiellement l'eau de l'hôpital dans laquelle les souches retrouvées étaient phylogénétiquement plus proche de la souche clinique que les souches isolées de la TAR. Enfin, pour d'autres STs fréquents (ST40, ST62 et ST259), représentant 3 à 6% des STs isolées en clinique en France, les seules données du ST sont parfois insuffisantes pour conclure quant à la source de contamination. Les données de WGS restent actuellement peu contributives en raison d'un nombre insuffisant de souches déjà séquencées pour estimer le niveau de diversité génétique de ces espèces. Le séquençage systématique de toutes les souches d'origine clinique et de toutes les souches environnementales dans le cadre d'investigation permettra de résoudre ces difficultés.

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) 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 2020.

Episode de cas groupés de légionelloses liés à un séjour à Brides-les-Bains, Savoie, septembre-octobre 2020.

Entre le 1er septembre et le 2 novembre 2020, 8 cas de légionellose ayant fréquenté Brides-les-Bains (Savoie) pendant leur période d'exposition (10 jours précédant la date de début de leurs symptômes) ont été identifiés par l'ARS. Il s'agit de 5 hommes et 3 femmes, d'âge médian 70 ans (min : 66 ans, max : 77 ans). Les 8 cas ont été diagnostiqués par antigène urinaire positif. Tous ont été hospitalisés et tous ont eu une évolution favorable.

Les patients étaient domiciliés dans différentes régions, aucun n'était domicilié à Brides-les-Bains mais tous avaient fréquenté les thermes. Dès les premiers cas, des investigations ont été menées auprès des thermes. L'établissement thermal était fermé depuis le 30 octobre 2020 date du début du 2ème confinement.

Pour 4 cas, un prélèvement respiratoire bas a été réalisé mais l'ensemble des résultats étaient négatif en culture et PCR. Aucune souche clinique n'était donc disponible pour ce cas groupé.

Les analyses environnementales ont concerné de nombreuses sources potentielles : les lieux d'hébergement des patients, des points d'eau publique de Brides-les-Bains (fontaine, WC public, etc), les points d'eau de l'établissement thermal de Brides-les-Bains et de l'établissement thermal de Salins-les-thermes. La présence de *Legionella pneumophila* a été identifiée dans une résidence et dans les 2 établissements thermal.

L'absence de souche clinique exclue toute comparaison avec les souches environnementales disponibles. Cependant, compte-tenu de la récurrence des situations de cas de légionellose en lien avec la fréquentation de Brides-les-Bains, il a été décidé de transmettre les souches environnementales disponibles au CNR pour conservation et comparaison future si une nouvelle situation se présente.

Trois cas de légionellose à *L. longbeachae* en Vendée entre avril et août 2020.

Trois cas de légionellose (*L. longbeachae*) ont été signalés en 4 mois en Vendée (2 cas domiciliés sur la côte littorale et 1 cas dans les terres à environ 80 km). Le diagnostic a été posé par PCR par le CNR-L. Pour 2 cas, nous avons isolé une souche *L. longbeachae* par culture. Il s'agissait de 3 hommes âgés de 54 à 74 ans. Un des 3 cas est décédé. La notion de jardinage a été retrouvée pour les 3 cas mais pas la manipulation de terreaux ou composts qui n'a été notifiée que pour 1 des 3 cas. Pour ce dernier cas, une analyse par PCR et culture de 2 terreaux utilisés a été réalisée au CNR-L. Celle-ci n'a pas permis de confirmer la présence de *Legionella longbeachae* dans le terreau suspecté mais

les analyses par biologie moléculaire montrent la présence de plusieurs espèces de *Legionella* au sein de ces échantillons.

Suspicion de séries de cas nosocomiaux à l'Hôpital d'Instruction des Armées de Toulon

Suite à la survenue de 2 cas de légionellose suspecté nosocomiale en 2019 et 2020 à l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) de Toulon, ce dernier a sollicité l'expertise du CNR pour comparer l'ensemble des souches cliniques et environnementales analysées et conservées au CNR afin de déterminer une éventuelle source de contamination commune.

Pour les 2 cas investigués en 2019 et 2020, les infections étaient dues à des *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 ST (Sequence Type) 1 mais la souche n'a pu être isolée que pour le cas de 2020 ; le typage épidémiologique du cas de 2019 ayant été réalisé par Nested-SBT. En parallèle, 8 souches environnementales isolées du service d'oncologie de l'HIA en 2019 et 10 souches environnementales isolées du service de chirurgie de l'HIA en 2020 ont été reçues au CNR et ce sont avérées êtres des *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 ST 1. Le ST1 étant endémique, ceci n'était pas suffisant pour conclure quant à la source de contamination.

Le CNR a donc repris les analyses de génomes complets de toutes les souches ST1 isolées en lien avec l'HIA et les a comparées entre elles ainsi qu'avec d'autres souches de ST1 non reliées à l'HIA. Toutes les souches environnementales de l'HIA qu'elles proviennent du service d'oncologie ou de chirurgie et la souche du cas de 2020 étaient identiques, présentant le même core genome MLST et le même ancêtre commun le plus récent, et étaient par ailleurs différentes d'autres ST1 isolées en France, ce qui conforte l'hypothèse d'une contamination nosocomiale pour ce patient et d'une colonisation du réseau de l'HIA avec la même souche depuis 2019.

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**

Les méthodes de détection des *Legionella*. Formation continue EHESP – module « prévention de la légionellose », 1h30, 10 Nov 2020 en distanciel.

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

Aucun accueil en 2020

Accueil d'étudiants qui ont eu des activités d'évaluation de kits ou de méthodologie développée au CNR : Thomas Jugla, Clémence Pinatel, Anaëlle Bolon, Lise Ursat, Amélie Paccaud, Justine Lannes.

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

European Guidelines *Legionella* dans le contexte COVID. Lors de la pandémie, nous avons souhaité au niveau européen alerté sur le risque de contamination en *Legionella* des réseaux d'eau lors des confinements successifs et en conséquence du risque de légionellose lors de la réouverture de ces établissements fermés.

En sept 2020, le groupe ESGLI (ESCMID Study Group for *Legionella* Infections) a édité sur le site de l'ESCMID différents guides européens pour la gestion des *Legionella* durant la pandémie ; le CNR a participé à la rédaction/relecture de 3 de ces guides de recommandation pour les établissements hospitaliers, les maisons de repos et de soins, et les grands bâtiments lors de la ré-ouverture ou de l'utilisation à minima des bâtiments (> 3500 téléchargements) : https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/legionella_infections/

- ESGLI Guidance for managing Legionella in nursing & care home water systems during the COVID-19 pandemic
- ESGLI Guidance for managing Legionella in hospital water systems during the COVID-19 pandemic
- ESGLI Guidance for managing Legionella in building water systems during the COVID-19 pandemic

- **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 (571 courriers en 2020).

*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.

*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**

8^{ème} journée du GREPI (Groupe pour la recherche et l'enseignement en Pneumo-infectiologie) en format digital– « Etat des lieux de la Légionellose, épidémiologie et prise en charge », 26-27 Novembre 2020 (30 min S Jarraud).

- **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 (571 courriers en 2020).

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 – **ESGLI** - forte implication au groupe d'étude ESGLI (ESCMID Study group for *Legionella* Infections). Membre du comité exécutif (trésorière, S. Jarraud). Participation aux réunions du comité exécutif (1 fois / mois) en distanciel. Du fait de l'organisation du congrès européen ESGLI annuel en 2020, mise en place de webinars de ESGLI qui ont démarré en 2021.

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

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 2020, 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. Caractériser les co-infections (bactérienne, virale ou fongique) au cours des légionelloses.

*Co-infection *Legionella* et SARS-Cov-2

Parmi les sept cas de co-infection *Legionella* – SARS-CoV-2 bien caractérisés de Mars 2020 (Cf Chapitre 3.4.1), il n'est pas clair s'il s'agit de co-occurrence ou de surinfection de *Legionella* sur une infection primitive virale. Pour 5 patients la détection de *Legionella* et de SARS-CoV-2 a été concomitante sur des prélèvements du même jour. Pour deux patients, le diagnostic de légionellose était pour l'un antérieur et pour l'autre postérieur (infection potentiellement nosocomiale) à la détection du SARS-Cov-2. Nous avons décrit pour un patient le suivi des charges en *Legionella* et en SARS-Cov-2.

Co-infection of *Legionella* and SARS-CoV-2 in France, March 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Conference on Coronavirus Disease (ECCVID) sept 2020, online congress et soumission à Emerging Infectious Disease.

The description of the longitudinal follow-up of patient 1, a 71-year-old male with multiple myeloma under chemotherapy, can help to decipher the kinetics of each pathogen load during the infection. He was hospitalized for hyperthermia (39°C) and productive cough. On day 9, he required ICU admission because of ARDS. Thoracic computed tomography scan found left lobar atelectasis, multiple ground-glass opacities compatible with COVID-19, and pleural effusion suggesting possible bacterial infection. Lp1 UAT and nasopharyngeal SARS-CoV-2 RT-PCR were both positive. On day 10, *Legionella* and SARS-CoV-2 PCR were both positive in serum (Figure B), which, individually, have been associated to COVID-19 (11) and LD (12) severity. From day 10, longitudinal samples of the lower respiratory tract collected every 3-to-6 days showed a high SARS-Cov-2 load (7.5 log/100 cells) followed by a decrease (1.3 log/100 cells) 21 days later (Figure 2A). In contrast, lung *Legionella* DNA load increased and remained high until day 31 (Ct 21.9). To identify hypothetical bacterial co-infections, a lung microbiota analysis was performed on a D19 bronchoalveolar lavage using 16S MinION long-read sequencing technology (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). A predominance of *Legionella* (61%) and presence of commensal lung bacteria (Figure C) was found, in accordance with other descriptive studies of LD microbiome (13), but found no bacterial co-infection. On day 26, while high lung *Legionella* DNA load (Ct 21.9) persisted, a third chest scan found pseudo-cavitation. Long persistence of PCR or culture has been described in patients with *Legionella* lung abscesses, especially if immunocompromised (14). This longitudinal monitoring of a single patient highlighted that *Legionella* became predominant during co-infection at the expense of SARS-CoV-2.

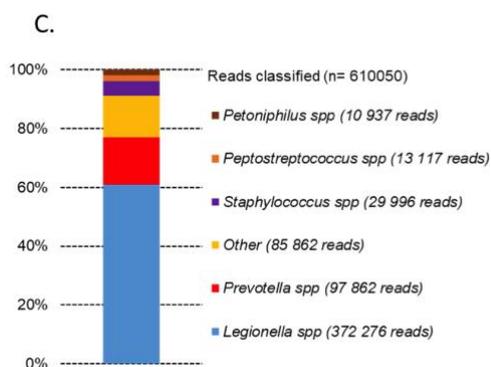
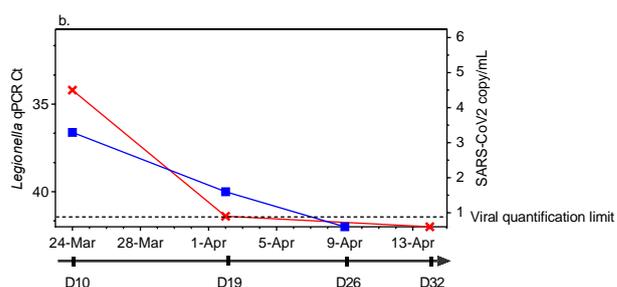
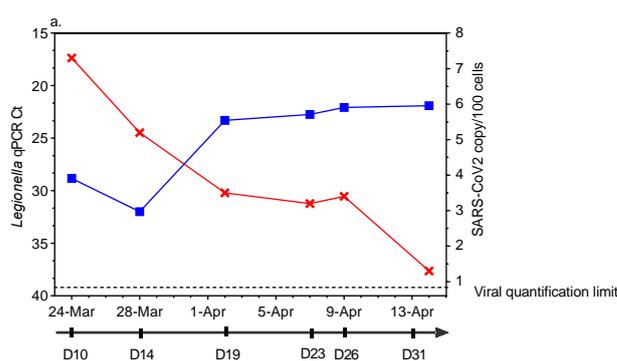


Figure. Detection of SARS-CoV-2 and *Legionella* over time. a. Pulmonary *Legionella* DNA load (estimated by quantitative PCR Ct targeting *16sRNA* gene (R-DiaLeg™, Diagenode, Liège, Belgium)) and SARS-CoV-2 RNA load (institute Pasteur protocol, normalised according to cellular quantification using the CELL Control r-gene® kit (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) (3) and expressed as the number of RNA copies/100 cells in pulmonary tracheal aspirations (TA) and broncho-alveolar lavage (BAL) ; b. Serum *Legionella* DNA load estimated by quantitative PCR Ct and SARS-CoV-2 RNA load expressed as the number of RNA copies/mL of serum ; c. Bacterial composition of the D19 BAL sample. Results expressed as the percentage of bacterial Genus among total classified reads. The taxonomy is based on the Epi2me workflow: taxonomic assignment for 16S amplicons (Nanoporetech).

*Characterisation of the lung virome in patients with Legionnaires' disease

Dans le cadre de l'étude ProgLegio (étude des biomarqueurs bactériens et humains d'intérêt pronostique pour les légionelloses sévères), nous avons étudié la composition et la diversité du virome de patients atteints de légionellose sévère et non sévère. Ce travail sera présenté en eposter à l'ECCMID 2021

Marine Ibranosyan, Christophe Ginevra, Grégory Destras, Hadrien Regue, Camille Allam, Laetitia Beraud, Antonin Bal, Ghislaine Descours, Laurence Josset, Sophie Jarraud

Background *Legionella* is a major cause of pneumonia, called Legionnaires' disease (LD), for which mortality remains high (up to 30%). Although the pathogenesis of severe LD remains poorly understood, the lung microbiome may play a role in the adverse clinical course of LD. Only few studies have explored the lung bacteriome in LD patients and data on the lung virome are still lacking. We aimed to characterize the diversity and composition of the lung virome at the initial time and over the course of LD.

Methods A shotgun viral metagenomic process was conducted on 63 *Legionella*-positive respiratory samples (sputum (n=23), tracheobronchial aspirates (TBA, n=38), and bronchoalveolar lavages (BAL, n=2)). Between January 2018 and January 2020, samples were collected from 33 LD patients included in a French multicentre prospective cohort study (ProgLegio) that allowed us to access to clinical and biological data. Among them, 16 patients (48%) were severe according to SOFA score ≥ 5 . Thirty-three samples were initial samples (day 0, D0) and 30 were follow-up ones (from D3 to D21). The metagenomic process included purification and viral enrichment, random amplification and Illumina sequencing on NextSeq 550.

Results A total of 27 viral families was found in LD respiratory samples, including 21 eukaryotic viral families and 6 bacteriophage families. The viral diversity was significantly higher in sputum than in TBA/BAL ($p=0.0001$). A higher prevalence of the 8 following families was also found in sputum: Herpesviridae ($p=0.001$), Papillomaviridae ($p=0.0002$), Circoviridae ($p=0.0233$), Polyomaviridae ($p=0.0434$), Picobirnaviridae ($p=0.0233$), Alphaflexiviridae ($p=0.0024$), Phycodnaviridae ($p=0.0373$) and Siphoviridae ($p=0.0032$). Herpesviridae were detected in 22 patients (67%); among them 8 became positive during the follow-up. Reactivations of Herpesviridae, confirmed by serological testing, could be related to immunosuppression and/or orotracheal intubation. A high prevalence of Anelloviridae was found in immunocompromised patients and patients with prolonged ICU stay.

Conclusions Lung virome data during the course of LD showed a large variety of viral families and were depending on sample type (sputum versus BAL or TBA), consistently with the results of LD bacteriome. Further studies are needed to investigate the role of the respiratory virome on LD severity.

*Co-infection *Legionella* - *Pneumocystis*

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. Une analyse rétrospective (2015-2020) à partir de données recueillies au CHU de Lyon a permis d'identifier 36 patients pour lesquels une PCR positive a été observée à la fois pour *Pneumocystis* et *Legionella*. L'analyse des données cliniques est en cours afin de mieux caractériser ces patients et l'implication de chacun de ces pathogènes dans la pathologie pulmonaire. Thèse pour l'obtention du DES de Biologie Médicale, Anne-Lise Maucotel.

6.1.2. Analyse comparative de génomes de *Legionella pneumophila* pour l'identification de déterminants associés aux signes neurologiques et digestifs au cours de la légionellose.

Des signes extra pulmonaires de type digestifs ou neurologiques sont souvent associés à la pneumonie au cours des légionelloses. Les mécanismes impliqués dans ces signes extra pulmonaires ne sont pas clairement établis.

L'objectif de notre travail a été l'identification de déterminants bactériens génétiques associés aux signes cliniques extra pulmonaires observés au cours de la légionellose. Les données des génomes complets de 416 souches cliniques isolées d'échantillons pulmonaire ont été analysés par l'outil dbGWAS (De Burjin Genome Wide Association Study) permettant de comparer les génomes des souches associées à un critère clinique à celui de souches non associées à ce même critère. Les phénotypes cliniques étudiés ont été la présence ou l'absence de signes digestifs, neurologiques, de confusion et de sévérité. Aucun variant associé à une significativité élevée n'a été identifié. Devant l'absence de candidats, nous avons sélectionné 13 variants génomiques correspondant à 5 gènes candidats codants les facteurs de virulence suivant : trois effecteurs du système de sécrétion Dot/Icm, la protéine RtxA et la protéine flagellaire FliK. Au niveau protéique, des mutations ont été observées seulement pour 2 candidats : l'effecteur Lpg1689 du système dot/Icm et la protéine RtxA. Ces mutations ne sont pas associées à la formation de codon stop et nous ne connaissons pas leur impact sur la fonction des protéines effectrices. De plus, le faible nombre de souches possédant ces variants rend peu significative leur association aux signes cliniques. Au final, cette analyse n'a pas permis l'identification de déterminants génomiques de virulence responsables des signes digestifs et neurologiques observés au cours de la légionellose. Cette étude préliminaire devra être complétée par une étude ultérieure sur un nombre plus conséquent de patients au CNR des légionelles.

Ce travail a fait l'objet d'une thèse pour l'obtention du DES de Biologie Médicale, Laura Ginesty.

6.2. Liste des publications et communications de l'année 2020, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Publications nationales

1. 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.

Chapitre de livres

2. S. Jarraud et J. Etienne. Legionella, une bactérie naturelle de l'environnement hydrique, responsable de la légionellose, une maladie de la modernité in Le défi des maladies infectieuses Des pestes à la COVID-19, Sous la direction de P. Cramer et A. Meigien, Les Edition du Palais, Edition Docis, Nov 2020

6.2.2. Publications internationales

3. Pouderoux C, Ginevra C, Descours G, Ranc AG, Beraud L, Boisset S, Magand N, Conrad A, Bergeron-Lafaurie A, Jarraud S*, Ader F*. Slowly or non-resolving Legionnaires' disease: case series and literature review. Clin Infect Dis. 2020 Jun 26. PubMed PMID: 31242293.
4. 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 Sep 13. pii: S1198-743X(19)30487-2. PMID: 31525518.
5. Couturier J, Ginevra C, Nesa D, Adam M, Gouot C, Descours G, Campèse C, Battipaglia G, Brissot E, Beraud L, Ranc AG, Jarraud S, Barbut F. Transmission of Legionnaires' Disease through Toilet Flushing. Emerg Infect Dis. 2020 Jul;26(7):1526-1528. PMID: 32568063
6. Pérez-Cobas AE, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. Persistent Legionnaires' Disease and Associated Antibiotic Treatment Engender a Highly Disturbed Pulmonary Microbiome Enriched in Opportunistic Microorganisms. mBio. 2020 May 19;11(3). PMID: 32430469
7. Souche A, Descours G, Ranc AG, Lina G, Jarraud S, Beraud L. Comparison of Legionella K-set® and BinaxNOW® Legionella for diagnosing Legionnaires' disease on concentrated urine samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Sep;39(9):1641-1644. PMID: 32303927

Chapitre de livres

8. NK Fry, S Jarraud. Epidemiological genotyping of *Legionella pneumophila*: from plasmids to sequence-based typing. Editing in *Legionella* in the Genomic Era, Jacob Moran-Gilad and Caster Press Editors, 2020

6.2.3. Communications nationales

Communications orales

Communications affichées

9. Lise Ursat, Amélie Paccaud, Anaëlle Bolon, Joséphine Charavit, Laetitia Beraud, Camille Allam, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Ghislaine Descours. Evaluation de la technique UMIC pour l'antibiogramme de *Legionella pneumophila*, RICAI 2020, 14 et 15 Décembre distanciel
10. G. Thizy, E. Lafont, A. Scemla, O. Roux, S. Jarraud, D. Lebeaux, J. Pouchot, F. Ader, F. Lanternier. Légionellose en transplantation d'organe solide : étude rétrospective multicentrique sur 10 ans, JNI, 9 – 11 Septembre 2020, Poitiers

6.2.4. Communications internationales

Communications orales

11. Allam C., Gaymard A., Descours G., Ginevra C., Josset L., Bouscambert M., Beraud L, Ibranosyan M., Golfier C., Friggeri A., COVID-19 diag HCL consortium, Lina B., Campese C., Ader, F., Jarraud S. Co-infection of *Legionella* and SARS-CoV-2 in France, March 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Conference on Coronavirus Disease (ECCVID) sept 2020, online congress

Communications affichées

12. Allam C, Fessy N, Ginevra C, Beraud L, Chastaing J, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* qPCR in serum and respiratory samples as a marker of Legionnaires' disease severity. ESCMID congress, apr. 2020, Paris (Résumé accepté, congrès annulé)
13. Allam C, Ginevra C, Campese C, Beraud L, Prugne A, Morel D, Descours G, Jarraud S. *Legionella pneumophila* contamination from sleep apnea devices. A retrospective analysis of a 9 year incidence and the contribution of Whole Genome Sequencing. ESCMID congress, apr. 2020, Paris (Résumé accepté, congrès annulé)

6.2.5. Conférences sur invitation

- **Nationale**

1. Jarraud S. Etat des lieux sur la légionellose, épidémiologie et prise en charge. 8èmes journées du GREPI, 26-27 Novembre 2020
2. Congrès SF2H- La légionelle dans tous ses états - Epidémiologie et résistance - Sophie JARRAUD – Lyon, initialement prévu en Juin 2020 reporté à Nantes 4 – 6 Octobre 2021

- **Internationale**

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...

En 2020, une collaboration avec l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) d'échange de données et d'expertise avait pour but d'évaluer la fiabilité des résultats présomptifs pour les analyses de *L. pneumophila* obtenus selon la norme NF T 90-431 à J5 ou J7 post-ensemencement. Cette étude s'inscrivait dans une démarche gouvernementale afin d'assurer la sécurité des ERP (Etablissement Recevant du Public) amenés à rouvrir après une période de confinement, et cela le plus rapidement possible sans risque sanitaire (Chap. 3.4.2).

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**

Poursuite en 2021 de l'évaluation de 16 kits commerciaux et mise en place de recommandations européennes par le groupe ESGLI notamment concernant le traitement thermique des urines positives.

- **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. Un premier travail avec un industriel a montré la faisabilité de cette méthodologie. Nous allons poursuivre ce travail et investiguer d'autres pistes de développement.

Une première étape vis-à-vis de l'EUCAST a été de proposer d'ajouter la méthode de microdilution en milieu liquide comme méthode recommandée de détermination de la sensibilité des souches de *Legionella*, ce qui a été fait. La seconde étape sera de déconseiller et de supprimer des recommandations les méthodes Etest sur milieu BCYE. Une étude européenne coordonnée par Brad Spiller (Cardiff University) et Vicki Chalker (PHE, UK) et soutenue par le groupe ESGLI va être proposée dans laquelle le CNR Français aura un rôle important.

En parallèle, une surveillance proactive de la résistance est réalisée en 2021 sur l'ensemble des isolats cliniques et non à la seule demande du clinicien.

- **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**

Cette action se fera à différents niveaux :

* communication des données du CNR (notamment de l'étude ProgLegio) et information ;

* évaluation de réactifs ;

* 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.

- **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). 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**

* Dans le contexte du séquençage à très haut débit du SARS-Cov-2, le CNR des légionelles a participé activement à la mise en place d'une plateforme de séquençage à l'usage dans un premier temps des CNRs de l'IAI (CNR des virus respiratoires, des Enterovirus, des Staphylocoques, des Légionelles) et du centre régional des mycobactéries, ce qui permet de séquencer l'ensemble des souches de *Legionella* d'intérêt. L'objectif est d'incrémenter la base des données de séquençage des différents ST endémiques afin de pouvoir interpréter au mieux les analyses phylogénétiques.

*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. Des résultats seront disponibles en 2021

- **Caractérisation des sous-espèces de *L. pneumophila* en regard des données cliniques ou épidémiologiques**

Depuis le séquençage à large échelle des souches de *Legionella*, il est apparu qu'environ 8% des souches d'origine clinique n'appartiennent pas à la sous espèce *Lp* subspecies *pneumophila* et sont bien distinctes sur le plan phylogénétique (cf chapitre 3.2.3). Il n'est pas connu si ces souches ont des caractéristiques particulières en terme environnementale ou d'hôte. Une meilleure caractérisation de ces souches va être entreprise en 2021.

- **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.

- **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 est l'objectif d'une étude commune avec Santé publique France dans ces deux prochaines années. Cette étude a été reportée dans le contexte sanitaire actuel.

- **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.

* **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, 2020). 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/SBT),
- réaliser le typage moléculaire des souches environnementales, lors de l'investigation des cas groupés ou pour comparaison avec les profils génomiques des souches cliniques des cas isolés ayant des expositions spécifiques,
- contribuer à l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux et aux biocides,
- contribuer à des programmes de formation continue et d'évaluation externe de la qualité afin de renforcer la capacité des laboratoires de biologie médicale dans le domaine du diagnostic et de l'identification des légionelles,
- contribuer à des études de recherche appliquée, notamment sur l'écologie, les facteurs de développement et de virulence de la bactérie,
- collaborer avec les laboratoires experts dans la surveillance de la légionellose dans l'environnement,
- participer au conseil auprès des professionnels de santé et de l'environnement.

2. Conseil

- contribuer aux expertises nationales et européennes.

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

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

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

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

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 5. 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 jusqu'en mars 2020 Corinne Fauchon Joelle Chastang Marielle Siffert Lucie Chaverot Noémie Fessy est recrutée sur un poste spécifique pour l'étude PROGLEGIO financé par la DGOS

Cadre	
Helena Rutschi	helena.rutschi@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
Imane Mohamadi	imane.mohamadi@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+5 de l'IAI est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie ; la mise en place d'une plateforme de séquençage a démarré en 2020
- 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.

Étage 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 19. 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 séquenceurs (NextSeq et Novaseq) des automates pour préparation de banque (Mosquito, DragonFly Discovery), des appareils PCR temps réels (Light Cycler 1, 2 et 480, QuantStudio, 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 MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Axima Shimadzu couplé à la base de données Saramis), 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), nous avons mis en place conjointement avec les autres CNRs de l'IAI (CNR des virus respiratoires, des Enterovirus et des Staphylocoques) une plateforme NGS dédiée à la microbiologie (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 6.

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 6. 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 1 émulsion sur billes	-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 (35 665)
- souches d'origine clinique et environnementale séquençées (1982)

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

Collection	ou	stockage	Nombre <i>approximatif</i> d'échantillons	conditions de conservation	de température
Sérums			8976	-20°C	
Souches patients			7090	-20°C et -80°C	
Souches environnementales			29175	-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		pour le	200	4°C et -20°C	

Prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	6950	-20°C
Urines	1166	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	5310	-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 recherche de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires par PCR et par culture, 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

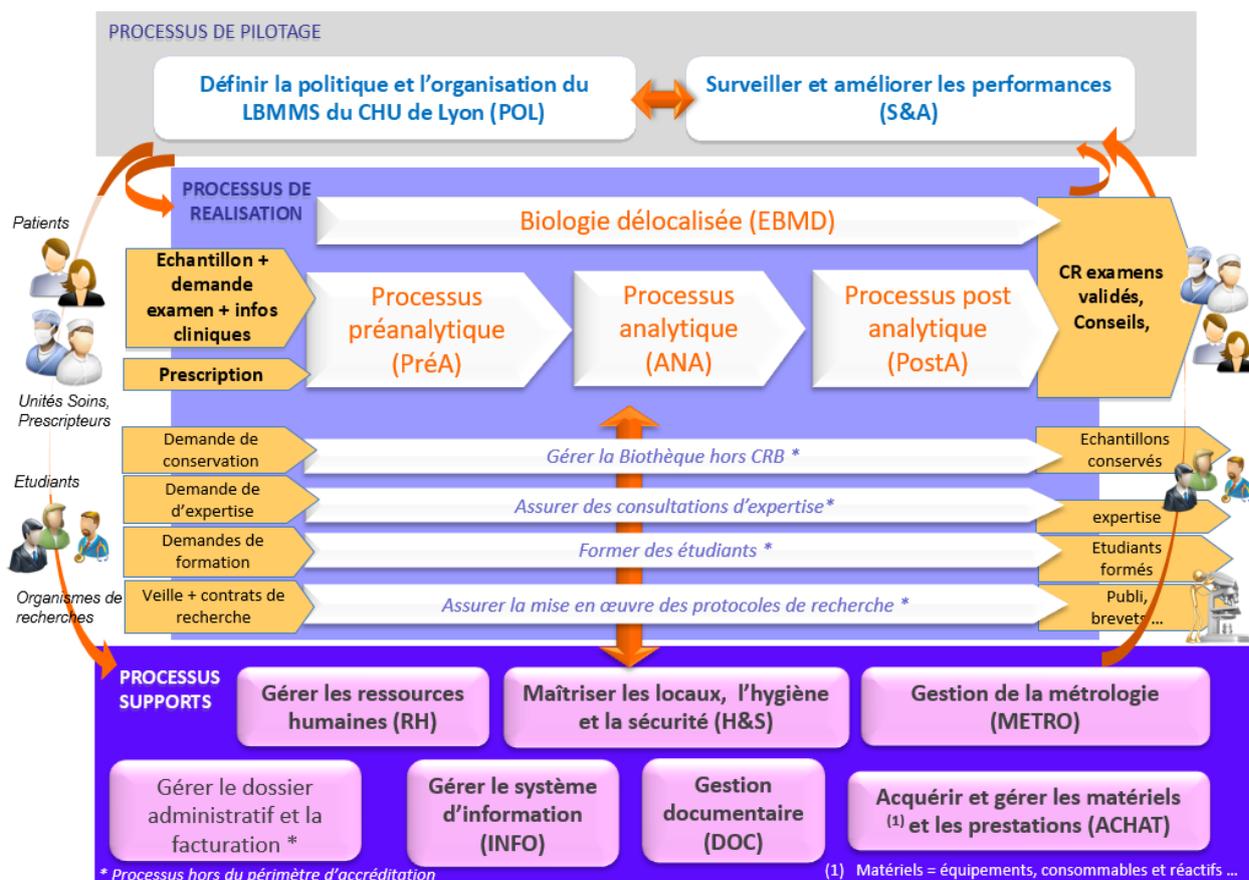


Figure 20. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).

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 un extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valide au 08 janvier 2021).

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.

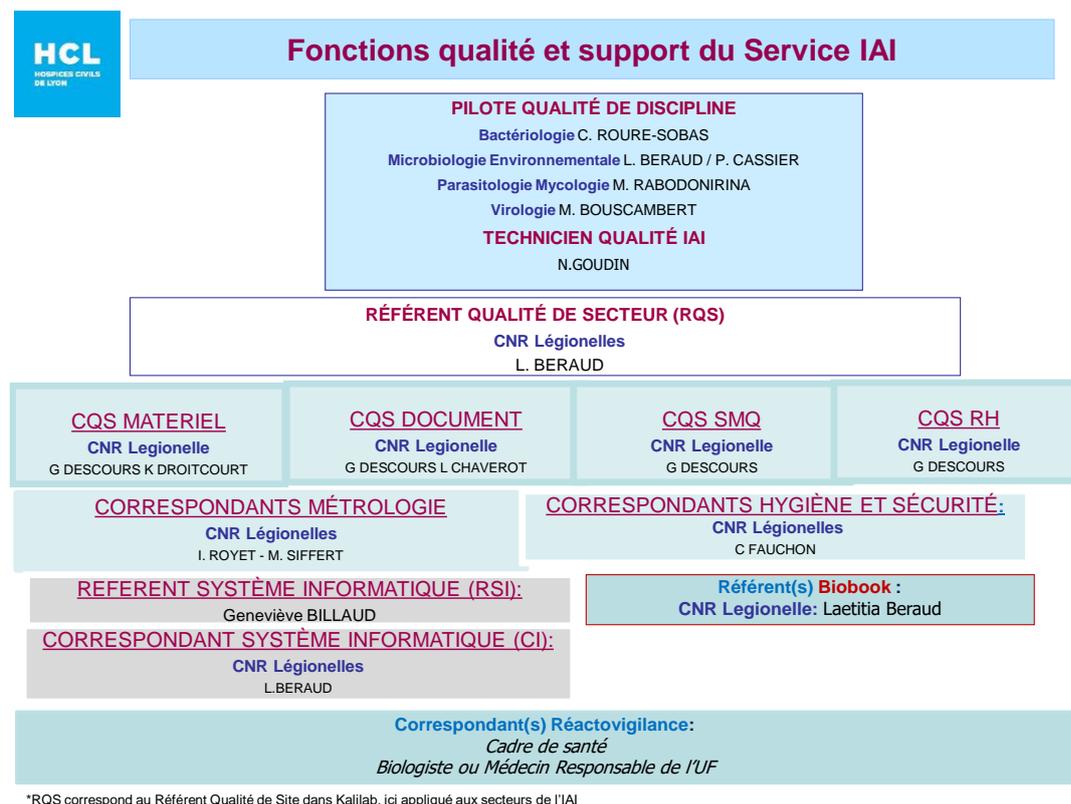


Figure 21. Extrait de Organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)

Le CNR a participé en 2020 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 2 fois par an et LabQuality 3 échantillons 4 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 participe également 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 janvier 2020 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 2020, un audit technique a été réalisé concernant la sérologie par IF, ainsi qu'un audit documentaire de la recherche de *Legionella* par culture, nouvelle analyse déposée à l'accréditation. Enfin, un audit de la gestion des ressources humaines et de la gestion de la métrologie 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 (205 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). Conformément à nos objectifs, une seconde technique de PCR *Legionella*, ainsi que la mise en culture et identification des *Legionella* sur prélèvements respiratoires a été 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. Hanneltel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, ESGLI 2016, Amsterdam, Pays-Bas.
- **Détection d'antigènes dans les urines** par immunochromatographie sur membrane (BinaxNOW *Legionella*®, ou autres), par immunofluorescence (Sofia®) et par ELISA (EIA Binax, ou autres).
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 Diagenode® (*Legionella species and Legionella pneumophila* Real-time PCR)

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

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

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

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

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

Méthodes d'identification des légionelles

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

- Identification génotypique des *L. non pneumophila* par **séquençage du gène mip** et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI (www.ewgli.org) 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} RICAI 2009, Paris.

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

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

- Détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) par microdilution en milieu liquide LGM Vandewalle M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C. Wild type MIC distribution of *Legionella pneumophila* isolates revealed a decreased susceptibility to macrolide correlated with the clonal distribution of efflux pump genes, IJAA, 2017

- 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.
- Détection des mutations sur les gènes ciblant la résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et à la rifampicine sur le génome de l'ensemble des souches d'origine clinique séquencées

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, Oida, 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.

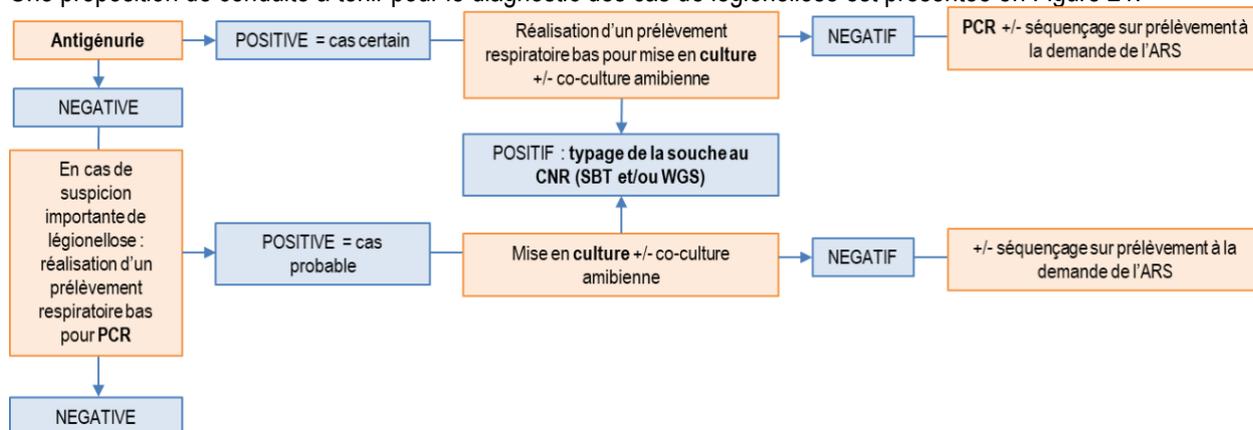


Figure 22. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.

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.