

# RAPPORT ANNUEL

# D'ACTIVITE 2023

***Année d'exercice 2022***

***CNR Legionella***

	<b>Organisme / Structure d'hébergement</b>	<b>Responsable</b>
<b>Laboratoire CNR</b>	Hospices Civils de Lyon	<a href="#">Pr Sophie JARRAUD</a>

Résumé analytique	4
Executive summary	4
<b>1. Missions et organisation du CNR</b>	<b>5</b>
<b>2. Activités d'expertise</b>	<b>6</b>
2.1 Evolution des techniques	6
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	6
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	8
2.4 Collections de matériel biologique	8
2.5 Activités d'expertises	9
2.5.1 Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses	9
2.5.2 Transmission des résultats expertisés	11
2.6 Activités de séquençage	11
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	14
<b>3. Activités de surveillance</b>	<b>15</b>
3.1 Description du réseau de partenaires	15
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	17
3.2.1 Formes cliniques atypiques	18
3.2.2 Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR	19
3.2.3 Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR	22
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	23
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	27
3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	27
3.4.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens (ECDC)	27
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	28
<b>4. Alertes</b>	<b>33</b>
4.1 Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal	33
4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	33
<b>5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil</b>	<b>34</b>
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	34
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	35
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	35
<b>6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR</b>	<b>36</b>
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	36
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	36

<b>7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux</b>	<b>38</b>
<b>8. Programme d'activité pour les années suivantes</b>	<b>39</b>
<b>9. Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR</b>	<b>41</b>
9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	41
9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	41
9.3 Locaux et équipements	43
9.4 Collections de matériel biologique	44
9.5 Démarche qualité du laboratoire	47
<b>10. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</b>	<b>51</b>
10.1 Liste des techniques de référence	51
10.2 Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique	53
10.3 Liste des techniques recommandées par le CNR	53

## Résumé analytique

L'année 2022 a été marquée par un nombre de cas de légionellose (n=1897) sensiblement similaire à 2021 (-8%), avec une incidence plus « lissée » sur la période estivale par rapport à 2021. Nous avons isolé et/ou identifié un nombre croissant de souches cliniques de *L. pneumophila* séro-groupe non 1 ou de *Legionella non pneumophila* (78 / 535 soit 15% en 2022 versus 67 / 564 soit 12% en 2021), témoins de l'**implémentation croissante de méthodes diagnostiques multiplexes** dans nos laboratoires partenaires et/ou de l'**envoi plus systématique d'échantillons pulmonaires** au CNR pour PCR et culture. La part croissante de cas à *L. longbeachae* nous incite à investiguer de nouvelles sources potentielles de contamination telles que les terreaux et à développer des **techniques de NGS** permettant de distinguer plusieurs espèces au sein de prélèvements complexes. Le développement de telles techniques a été rendu possible par l'acquisition d'une expertise en NGS par le CNR et un accès à l'ensemble des technologies de la **plateforme GenEPII**. Ces nouveaux outils utilisés désormais en routine au CNR ont parallèlement contribué à identifier des cas de **co-infections** par différentes espèces ou sérogroupes jusqu'ici rarement décrites. Enfin, l'implémentation en routine du WGS avec la possibilité de caractériser le core genome (cg)ST et la phylogénie des isolats cliniques et environnementaux permet désormais d'apporter des conclusions robustes quant à l'origine de contamination des cas.

Sur le plan des investigations autour des cas, leur nombre reste stable mais limité à 50 à 60 par an sur la période 2021-2022. L'**identification des sources de contamination** des cas sporadiques de légionellose reste ainsi un **enjeu prioritaire** pour le CNR. A la demande de la Direction Générale de la Santé et en collaboration avec Santé publique France, le CNR coordonnera le projet LEGIODOM visant à préciser le rôle exact des **domiciles** comme source de contamination, domiciles qui pour le moment ne font pas l'objet d'investigation systématique.

## Executive summary

The number of Legionnaires' disease (LD) cases in 2022 (n=1897) was similar to that in 2021 (-8%), with a more even incidence over the summer period than in 2021. We have isolated and/or identified an increasing number of clinical strains of *L. pneumophila* serogroup non 1 or *Legionella non pneumophila* (78/535 or 15% in 2022 versus 67/564 or 12% in 2021), reflecting the increasing implementation of multiplex PCR in our partner laboratories and the more systematic sending of lung samples to the CNR. The increasing number of *L. longbeachae* cases is prompting us to investigate new potential sources of contamination, such as potting soil, and to develop NGS techniques that can distinguish multiple species within complex samples. The development of such techniques has been made possible by the acquisition of NGS expertise and access to the full range of technologies on the HCL' GenEPII platform. These new tools, now routinely used at the CNR, have also helped to identify cases of co-infection by different species or serogroups, which had rarely been described before. Finally, the routine implementation of WGS, with its ability to characterise core genome (cg)ST and the phylogeny of clinical and environmental isolates, now allows us to draw robust conclusions on the origin of contamination of cases.

The number of cases under investigation is stable and limited to 50 to 60 in 2021 and 2022. Identifying the sources of contamination of sporadic cases of LD therefore remains a key challenge for the CNR. At the request of the *Direction Générale de la Santé* and in collaboration with Santé Publique France, the CNR will lead the LEGIODOM project, which aims to clarify the exact role of domestic water as a source of contamination, which is currently not systematically studied.

## 1. Missions et organisation du CNR

L'organigramme fonctionnel du CNR est présenté en Figure 1.

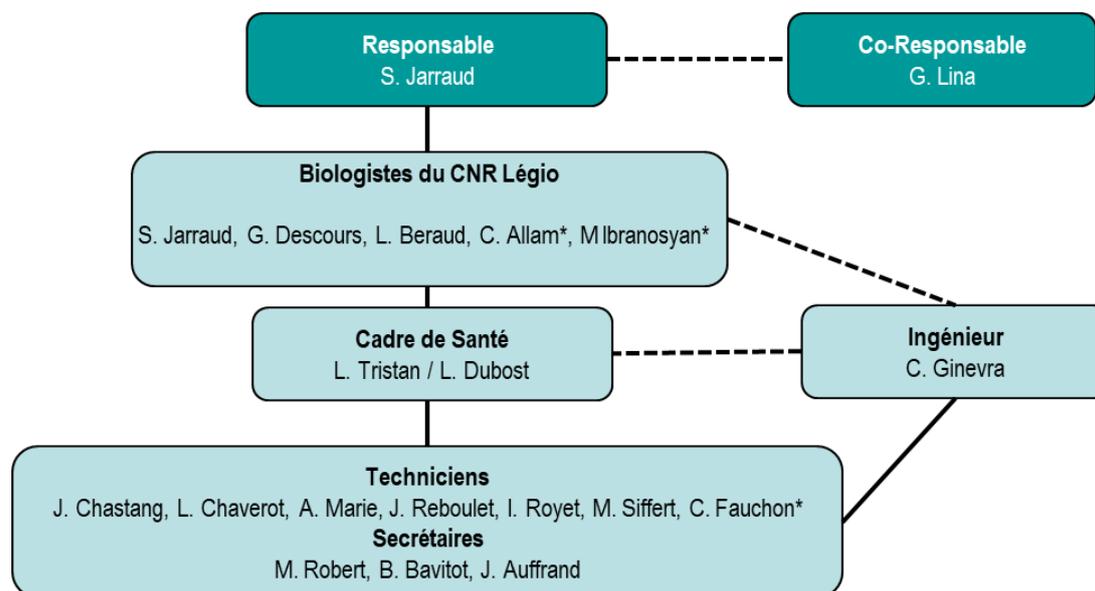


Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR en 2022.

\* Sur le plan des personnels :

L'encadrement a été marqué par le départ de Héléna Rutschi, remplacée par L. Tristan puis L. Dubost.

Marine Ibranosyan succède à Camille Allam qui a quitté le CNR en Novembre 2022 suite à la fin de son contrat d'assistante hospitalo-Universitaire.

C. Fauchon a quitté le CNR et a été remplacée par J. Reboulet.

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 2022.

### Démarche Qualité

L'engagement dans la démarche d'accréditation est effectif depuis 2012 selon la norme 17025 et depuis 2016 selon la norme 15189. En 2022, le CNR a obtenu l'accréditation en portée B pour l'analyse du Sequence Type (ST) des souches de *Legionella* par NGS et pour la sérologie *Legionella* par Immuno Fluorescence (IF).

Le CNR est ainsi accrédité pour la recherche de *Legionella* par culture et PCR dans les eaux propres, la recherche de *Legionella* dans les prélèvements respiratoires par PCR et culture, l'identification et le typage (ST) des souches de *Legionella* isolée ou reçues au CNR, l'antigénurie *Legionella* par immuno-chromatographie et ELISA et la sérologie *Legionella* par ELISA et IF.

Le dernier audit réalisé au CNR selon la norme 17025 a eu lieu en juin 2022 et a relevé 2 écarts (1 critique, 1 non critique) pour lesquels des réponses ont été apportées. Le dernier audit selon la norme 15189 a eu lieu en janvier 2022 et n'a relevé aucun écart.

## 2. Activités d'expertise

### Éléments clés de l'année 2022 en termes de production d'expertise

- Nombre de cas de légionellose notifiés en France (n=1897) relativement similaire à 2021 (-8%), avec une stabilité des demandes d'expertise sur le diagnostic des cas (PCR et typage) et des demandes d'investigations autour des cas
- Une souche est disponible pour 27,9% des cas de légionellose (530 isolats), avec une tendance sensiblement à la hausse sur les 5 dernières années (+5% depuis 2018); point important, le CNR a isolé 339 souches, soit 2/3 des souches.
- Le CNR a typé un nombre croissant de souches cliniques de *L. pneumophila* séro groupe non 1 ou de *Legionella* non *pneumophila* (78 / 535 soit 15% en 2022 versus 67 / 564 soit 12% en 2021), témoins de l'implémentation croissante de méthodes diagnostiques multiplexes dans nos laboratoires partenaires et de l'envoi des échantillons au CNR
- A noter que peu de kits PCR détectent l'ADN de *L. non pneumophila* ; à considérer en cas de suspicion de légionellose avec un test de détection des antigènes urinaire et/ou une PCR *L. pneumophila* négatif
- Les cas liés à *L. longbeachae* sont de plus en plus diagnostiqués, bien que l'identification formelle de la source de contamination reste un enjeu pour le CNR.
- La décroissance de l'activité de sérologie, technique de contribution diagnostique limitée, se poursuit : -83% en 5 ans suite à la sensibilisation des laboratoires sur les sérums devant nous être envoyés (confirmation de titre) ;
- Le CNR a renforcé en 2022 sa veille sur l'antibiorésistance avec plus de 320 antibiogrammes par microdilution réalisés ; des mutations associées à la résistance sont systématiquement recherchées pour toutes les souches séquencées, et des souches environnementales résistantes aux macrolides ont été identifiées. Le CNR s'est doté de la technique Sensititre qui montre de bonnes performances et présente une facilité domicile d'utilisation par rapport à la technique « maison ».
- Etude en cours pour la caractérisation de la distribution des CMI des principaux antibiotiques et des ECOFF pour *L. pneumophila*, en collaboration avec plusieurs CNR européens (Grant ESGLI, projet porté par le Royaume-Uni, B. Spiller)

La description des techniques disponibles au CNR est présentée en [Annexe 2](#).

### 2.1 Evolution des techniques

- Mise au point de nouvelle PCR maison ciblant *Legionella* spp, *L. pneumophila* et *L. pneumophila* séro groupe 1 pour le diagnostic de légionellose (en cours en 2022) (cf 2.2).
- Utilisation en routine du séquençage NGS de la région intergénique 23S-5S (23S-5S NGS) pour l'identification des *Legionella* sur prélèvements cliniques et environnementaux (intérêt en présence de plusieurs espèces de *Legionella*)
- Antibiogramme par méthode Sensititre – plaque standardisée 96 puits pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide associée à un lecteur optique (cf 2.2).

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

- Evaluation d'une nouvelle PCR maison ciblant *Legionella* spp, *L. pneumophila* et *L. pneumophila* séro groupe 1

En 2022, le CNR a travaillé au transfert de sa PCR *L. pneumophila* / *L. pneumophila* séro groupe 1 sur le thermocycleur QuantStudio5 (PCR ESGLI adaptée de Mentasti M. *et al.* Design and validation of a qPCR assay for accurate detection and initial serogrouping of *Legionella pneumophila* in clinical specimens by the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015), ainsi qu'au développement, suite à l'arrêt de la commercialisation du kit Diagénode d'une PCR *Legionella* spp / *L. pneumophila* (adaptée de Templeton KE. *et al.* Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. J Clin Microbiol. 2003).

Les performances de ces méthodes ont été évaluées sur plus de 300 échantillons dont 200 négatifs. La limite de détection des techniques a été évaluée grâce à des gammes d'ADN réalisées à partir de l'ADN étalon commercialisé par le CNR. Les

performances montrent des valeurs prédictives négatives comprises entre 98,2 et 99,7% en fonction des cibles, des valeurs prédictives positives entre 89,9 et 96,5% en fonction des cibles et une limite de détection à 0,5 UG pour certaines cibles. Ces méthodes seront mises en place au CNR en 2023 en remplacement des autres PCR. Elles seront accréditées.

- Evaluation de la méthode Sensititre pour la réalisation d'antibiogrammes par microdilution

Nous avons évalué les performances de la technique Sensititre sur 109 souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 (Lp1) d'origine clinique et un panel de souches Lp1 résistantes aux antibiotiques parmi lesquelles :

- 5 souches avirulentes résistantes aux fluoroquinolones sélectionnées *in vitro* (mutations GyrA T83I, GyrB Q467D, GyrA T83I + ParC D79G, GyrA T83I + ParC D79H, GyrA T83I + ParC D78D ; souches sélectionnées *in vitro*) ;
- 9 souches avirulentes résistantes aux macrolides sélectionnées *in vitro* (mutations ARNr 23S A2058 (3/3 copies mutées), A2058 (2/3 copies mutées), G2057T (3/3), C2611T (2/3), C2611T (3/3), C2611G (2/3), mutations protéine L4 G196C, G197C, et double mutant protéines L4/L22 T65K/G91D; souches sélectionnées *in vitro*) ;
- 3 souches environnementales résistantes aux macrolides (mutation A2058G, 3/3 copies) ;
- 2 souches avirulentes résistantes à la rifampicine sélectionnées *in vitro* (mutations RpoB Ser537Phe et His541Tyr; souches sélectionnées *in vitro*).

Ces plaques 96-puits ont été réalisées à façon et utilisées avec le milieu de culture BYE « maison », avec une lecture après incubation de 48h à 35°C. Les antibiotiques pour lesquels les résultats ont été comparés à la technique « maison » étaient : azithromycine (Azi), érythromycine (Ery), ciprofloxacine (Cip), moxifloxacine (Mox), doxycycline (Dox), rifampicine (Rif).

La distribution des CMI des 109 souches Lp1 d'origine clinique est présentée dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Distribution des CMI de 109 souches *L. pneumophila* séro groupe 1 d'origine clinique par les techniques de microdilution « maison » et Sensititre.

		CMI (mg/L)																
		0,00012	0,00025	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
Azi	Maison								1	26	52	12	4	8	5	1		
	Sensititre									14	47	32*	8*	4*	3*	1*		
Ery	Maison									1	20	47	28	8	5			
	Sensititre									2	22	42*	37*	6*				
Cip	Maison						9	53	45	2								
	Sensititre						5	13	91									
Mox	Maison						5	29	66	9								
	Sensititre						26	17	64	2								
Dox	Maison											1	1	7	55	45		
	Sensititre														1	5	53	50
Rif	Maison	4	38	56	11													
	Sensititre		1	22	83	3												

\* Souches ST 1/6/177/259/701 possédant la pompe à efflux LpeAB.

Parmi les 109 souches testées, 16 possédaient la pompe à efflux LpeAB sélective des macrolides et présentaient des CMI distribuées dans les valeurs hautes pour Azi et Ery. Les % de concordance de CMI (CMI identique à ± une dilution) étaient de : 84,4% pour Azi ; 85,3% pour Ery ; 89,0% pour Cip ; 95,4% pour Mox ; 26,6% pour Dox et 67% pour Rif.

L'ensemble des souches résistantes aux fluoroquinolones, à la rifampicine et aux macrolides par des mutations affectant l'ARNr 23S présentaient des CMI élevées, au-delà de la distribution des souches sauvages :

- CMI (ciprofloxacine) > 0,25 mg/L et CMI (moxifloxacine) à 0,12-0,25 mg/L en présence de mutation dans *gyrA* ou *gyrB*, et à 1 mg/L en présence de mutations additionnelles sur *parC* ;
- CMI (rifampicine) à 32 ou 64 mg/L en présence de mutation sur *rpoB* ;
- CMI (azithromycine) > 256 mg/L et CMI (érythromycine) > 512 mg/L pour les souches présentant des mutations A2058G (2/3 ou 3/3 copies), et respectivement > 4 mg/L (Azi) et 8 mg/L (Ery) pour les souches présentant des mutations en positions 2057 ou 2611.

Néanmoins, avec la technique Sensititre, les souches présentant une résistance de bas niveau aux macrolides (mutations des protéines L4//22) présentaient des CMI pour l'érythromycine à 0,5 ou 1 mg/L, à la limite des valeurs normales, tandis que la technique « maison » montre pour ces souches des CMI ≥ 4 mg/L, semblant permettre une meilleure identification.

Au total, dans l'ensemble, la technique Sensititre donne satisfaction; elle permet un gain de temps considérable pour la réalisation des antibiogrammes par rapport à la technique « maison » (10 min versus plus d'une heure). Combinée au WGS, elle permet la détection de résistances, qui restent néanmoins exceptionnelles chez *Legionella*.

Cette technique a été utilisée dans un second temps de façon systématique et prospective sur les souches reçues au CNR de septembre à décembre 2022 (cf 3.3). Elle a également été appliquée à des souches de *Legionella non pneumophila* pour lesquelles la sensibilité aux antibiotiques reste peu décrite dans la littérature.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune technique en 2022.

## 2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont présentées en annexe 1.

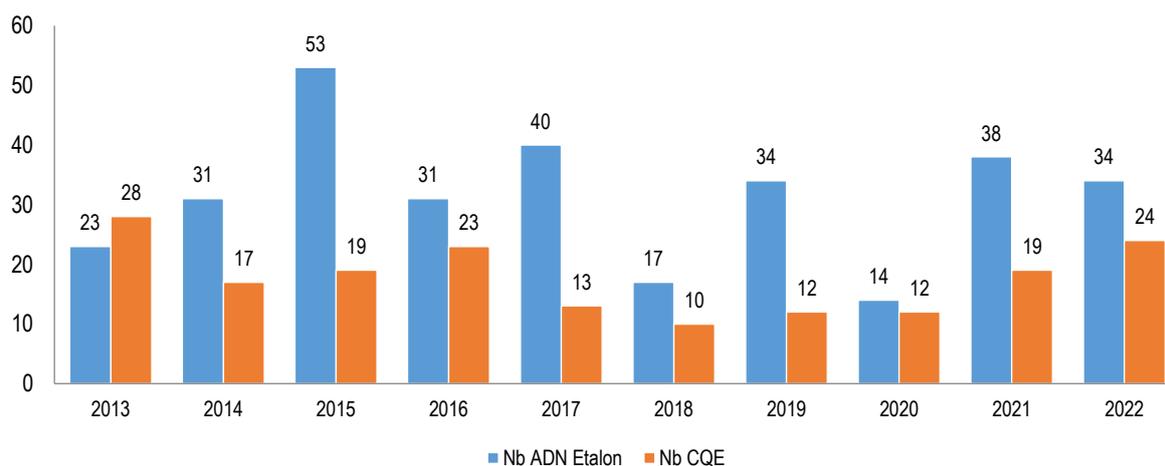
Il n'y a pas d'évolution des collections depuis le début du mandat actuel (2023-2027).

Distribution de matériel biologique par le CNR en 2022 :

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

En 2022, 34 ADN étalon et 24 contrôles quantitatifs (CQE raccordés à l'ADN étalon) ont été envoyés directement par le CNR à 5 laboratoires environnementaux (Figure 2).

En parallèle, l'ADN étalon et les contrôles quantitatifs sont distribués par le distributeur spécialisé LGC Standard uniquement à des laboratoires à l'étranger. Nous avons envoyé 14 ADN étalon et 20 contrôles quantitatifs à LGC à leur demande (6 envois).



**Figure 2.** Nombre d'échantillons d'ADN étalon et de contrôles quantitatifs distribués entre 2013 et 2022.

- Distribution de souches de *Legionella*

Envoi d'une souche de Lp1 au laboratoire de l'institut Mutualiste Montsouris à Paris, souche isolée d'un prélèvement respiratoire lui-même envoyé par ce même hôpital.

Envoi de deux souches de *Legionella pneumophila* Paris CIP 107629T portant un plasmide codant les protéines GFP ou MCherry (promoteur inducible par IPTG, gène de résistance au chloramphénicol) à Hetty Kleinjan, Chef de projet R&D, CEBEDEAU, Belgique.

## 2.5 Activités d'expertises

La synthèse quantitative de l'activité du CNR pour l'année 2022 et son évolution depuis 2017 est présentée en tableau 2.

**Tableau 2.** Evolution de l'activité du CNR, 2017-2022.

Nombre de prélèvements ou souches	2017	2018	2019	2020	2021	2022
<b>EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (hors protocole de recherche clinique et évaluation de kits)</b>						
Sérologie	842	495	349	203	341	144 <sup>1</sup>
Culture de prélèvements cliniques	451	689	648	523	941	852 <sup>2</sup>
PCR à visée diagnostique	254	226	213	199	270	282
Co-culture de prélèvements pulmonaires	253	434	150	90	162	169 <sup>4</sup>
Expertise antigènes urinaires	110	131	61	68	57	43
Identification de souches cliniques <sup>5</sup>	377	489	441	317	564	535 <sup>6</sup>
Expertise souches environnementales	462	472	485	320	459	464
Détection par culture de prélèvements d'eau complexe	2	5	6	8	16	18 <sup>7</sup>
Détection par PCR de prélèvements d'eau complexe	6	3	4	6	7	20 <sup>8</sup>
Antibiogrammes par microdilution	8	5	103	175	174	326 <sup>9</sup>
<b>SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE</b>						
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	65	62	58	50	64	60
Isolats <i>Legionella</i> analysés en AP-PCR <sup>10</sup>	-	-	282	195	-	-
PCR Lp1 <sup>11</sup>	358	459	348	210	117	3
PCR de typage sur prélèvement ESGLI Lp / Lp1	79	21	51	26	400	414
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	115	91	46	27	42	36
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou WGS)	440	650	596	428	1451	801
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS	366	434	517	555	1451	921 <sup>12</sup>

<sup>1</sup> parmi lesquelles 64 réalisées par technique ELISA et 131 par immunofluorescence, correspondant à 144 patients.

<sup>2</sup> 53 cultures additionnelles en 2022 pour un protocole de recherche clinique.<sup>4</sup> 5 cocultures additionnelles pour un protocole de recherche clinique ; Depuis 2019, analyse réalisée uniquement sur les prélèvements présentant une contamination importante.

<sup>5</sup> pour des raisons de cohérence avec les données de Santé publique France, nous avons pris en compte les souches reçues ou les souches isolées au CNR à partir de prélèvements chez des patients dont la date de début des signes se situe dans l'année analysée.

<sup>6</sup> correspondant à 196 souches reçues et 339 souches isolées au CNR (non redondant) ; correspondant à 535 patients.

<sup>7</sup> 11 terreaux, 5 eaux d'appareil d'oxygénothérapie, 1 eau pluviale, 1 eau de tuyau d'arrosage

<sup>8</sup> 11 terreaux, 7 eaux d'appareil d'oxygénothérapie, 1 eau pluviale, 1 eau de tuyau d'arrosage

<sup>9</sup> dont 24 par technique « maison » et 302 par technique Sensititre (réalisation en systématique sur une période limitée à visée épidémiologique)

<sup>10</sup> abandon de la technique en 2021 au profit du NGS

<sup>11</sup> abandon de la technique en 2022 au profit de la PCR ESGLI Lp / Lp1 pour le typage

<sup>12</sup> 554 souches à des fins de surveillance et 367 souches à des fins d'investigation de cas

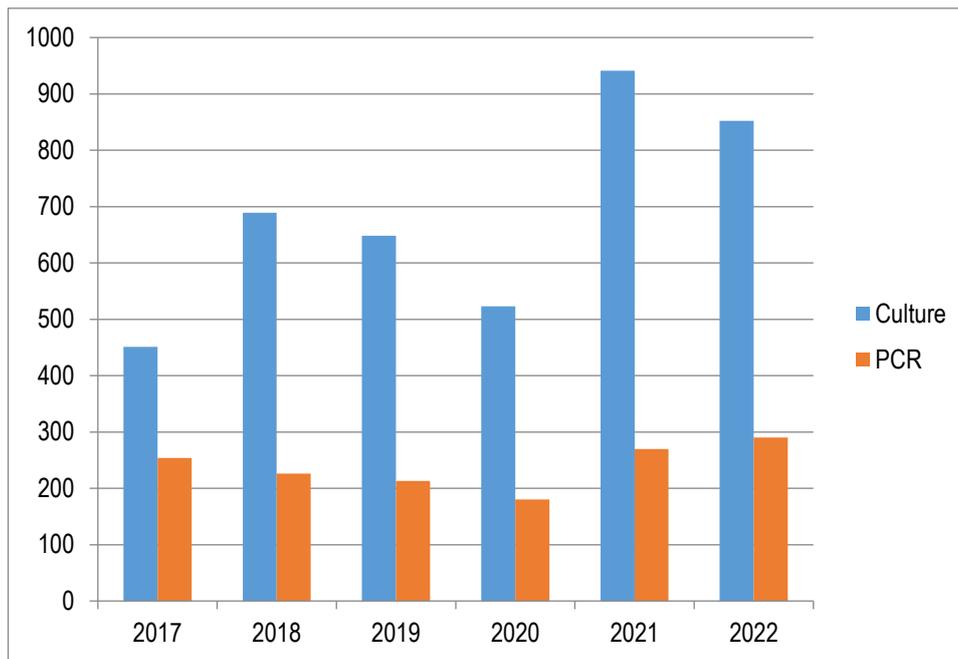
### 2.5.1 Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses

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* et/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 a légèrement diminué (-10%) et par rapport à 2021, probablement en lien avec la diminution de l'incidence de la légionellose en 2022 (-8%) (Figure 3).



**Figure 3.** Evolution du nombre de prélèvements broncho-pulmonaires adressés pour mise en culture et PCR à visée diagnostique au CNR, 2017-2022.

- **Culture**

En 2022, parmi les 852 prélèvements pulmonaires mis en culture sur milieux gélosés (patients avec antigène urinaire positif et/ou PCR positive, protocole de recherche clinique exclu), la culture conventionnelle s'est révélée positive pour 355 prélèvements, **soit 41,7 %** des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis amibien (*Amoebae Plate Test*, APT) mise en œuvre sur 144 prélèvements contaminés présentant une culture négative a permis d'isoler 10 souches additionnelles. Au total, des légionelles ont été isolées pour 365 prélèvements par culture conventionnelle et/ou co-culture amibienne, soit **42,8% 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 2022, le CNR a isolé plus de la moitié (340/535, soit 63.6%) 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 2022, le CNR a réalisé différents types de PCR à visée diagnostique sur 282 échantillons de patients. Parmi celles-ci,

- **64 étaient positives pour *Legionella* spp dont 40 pour *L. pneumophila***
- **7 étaient positives pour *Legionella non pneumophila*** ; la PCR 23S-5S réalisée dans un second temps a permis d'identifier 6 cas à *L. longbeachae* et 1 cas avec une co-infection *L. longbeachae* et *L. pneumophila*.

Le nombre de prélèvements qui nous ont été adressés pour PCR diagnostique en 2022 (n=282) est relativement stable par rapport à 2021 (+4%), probablement en lien avec l'acquisition croissante d'outils diagnostiques syndromiques dans les laboratoires en France. La très grande majorité de ces PCR a été réalisée suite à un résultat d'antigénurie négative. Ainsi, en 2022, **44 cas de légionellose** ont été diagnostiqués et déclarés aux ARS à la suite d'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 2022, 43 urines correspondant à 41 patients et testées avec différents kits par les laboratoires expéditeurs ont été analysées, dans différents contextes :

- confirmation diagnostique : n=18
- résultats discordants avant et après chauffage ou impossibilité de chauffage : n=19

- résultat douteux (faible positivité par exemple) : n=1
- résultats discordants entre deux antigénuries successives : n=4
- résultats discordants entre deux techniques : n=1

Le nombre d'urines expertisées est en diminution par rapport à l'année 2021 (-19%).

Parmi les urines positives expertisées, 79% ont été confirmées (34/43). Les 9 antigénuries non confirmées sont d'interprétation difficile car elles peuvent être liées notamment à la limite de détection des techniques et doivent être interprétées au regard de la clinique (contexte clinique évocateur ou non de légionellose).

A partir de décembre 2022, le CNR a recensé une augmentation des demandes d'expertise d'antigénuries réalisées avec le test SofiaFIA. Il s'agit principalement de tests détectés positifs par les laboratoires expéditeurs (sans problème technique), confirmés ou non par le CNR, et discordants avec la clinique (contexte clinique non évocateur de légionellose, absence de pneumopathie...). Une investigation est actuellement en cours chez Quidel pour investiguer ces résultats discordants.

#### • 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 : **-57,8% entre 2021 et 2022**.

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.

Le CNR a réalisé 144 sérologies, correspondant à 105 patients : 64 sérologies par technique ELISA comme méthode de screening et 131 sérologies par technique d'immunofluorescence.

Parmi les 131 sérums testés par technique d'immunofluorescence ; 12 étaient positifs en Lp1 et/ou en Lp non 1  
A noter qu'il existe de nombreuses réactions croisées entre les sérogroupes de *L. pneumophila* non 1.

### 2.5.2 Transmission des résultats expertisés

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

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

**Les activités de séquençage du CNR comprennent :**

- Séquençage du génome entier (Whole Genome Sequencing, WGS) applicable sur souche d'origine clinique et souche environnementale. La préparation des banques est réalisée à l'aide du kit DNAPrep, puis elles sont séquencées en paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) ou NovaSeq de la plateforme GenEPII de l'IAI.

Interprétation : un script du laboratoire écrit sous nextflow et utilisant des images singularity est utilisé pour les analyses de l'ensemble des souches séquencées. Il comprend en plus de différentes mesures de qualité :

- o La détermination du ST sur la base des 7 gènes classiquement utilisés pour la méthode de référence (PCR + séquençage Sanger) ;
- o La détermination du cgMLST (schéma de 50 gènes standardisé au niveau international en Août 2018) ;
- o La recherche de la pompe à efflux LpeAB ;
- o La recherche de mutations associées à la résistance aux antibiotiques utilisés en thérapeutique ;
- o La recherche du gène lag (facteur associé à une prévalence clinique plus importante des souches).

Pour la comparaison plus fine de souches clonales, nous réalisons une analyse phylogénétique basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) par rapport à une souche de référence du même fond génétique (Script du laboratoire utilisant Snippy).

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

- Les génomes de certaines souches d'intérêt sont finis par assemblage hybride illumina / nanopore. Pour ce faire les librairies sont préparées *via* le rapid barcoding kit de nanoporetech, puis séquencées sur des flowcells 9.4.1 via un séquenceur GridION.
- Le séquençage de la région intergénique 23S-5S par NGS applicable sur prélèvements pulmonaires et les matrices complexes environnementales

**En 2022**, toutes les souches d'origine clinique et les souches d'origine environnementale adressées dans le cadre d'une investigation autour d'un cas ont été séquencées en NGS soit un **total de 921 souches** (cf 3.2.2). A ces souches s'ajoutent le séquençage de 29 CQE et de 238 souches rétrospectives ou pour des études du CNR. Au total **le CNR a séquencé 1188 souches de Legionella en 2022**.

En cas de PCR positive en *L. non pneumophila* sur prélèvements pulmonaires, le séquençage de **la région intergénique 23S-5S par NGS** a été utilisé à la place de la méthode Sanger pour identifier l'espèce de Legionella en cause et rechercher de possible co-infection par différents sérogroupes et/ou espèces de légionelles.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Interne aux Hospices Civils de Lyon</p> <p>Le CNR a accès à la plateforme de séquençage GENEPII qui dispose de plusieurs automates : un starlet (Hamilton) pour l'aliquotage, 1 extracteur haut débit Sp960 (MGI), un extracteur bas débit Maxwell (Promega), 1 DremPrep (Tecan), 2 Dragonfly (SPTLabtech), 3 Mosquito HV (SPTLabtech) et un Epimotion (Eppendorf) pour la préparation des librairies, un Qubit (ThermoFisher) et une TapeStation (Agilent) pour la quantification et la qualification des librairies, un Nextseq 550, un Novaseq 6000 (Illumina®) et un GridION (Nanoporetech) pour le séquençage des librairies. Le CNR a également en interne un extracteur Maxwell (Promega) et un séquenceur MinION (Nanoporetech).</p>

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Expertise bio-informatique interne et externe</p> <p><u>Interne</u> : La plateforme possède les ressources pour l'analyse et le stockage des données générées avec plusieurs stations de calcul informatique utilisables à distance dont une station de calcul GPU, 2 serveurs de stockage sécurisés à la direction des systèmes numériques (DSN) 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.</p> <p>Le CNR utilise de nombreux outils open source inclus ou non dans des pipelines « maison » (Samtools, Bcftools, Bwa, Minimap2, Bowtie, Fastqc, Trimmomatic, Spades, Fastani, OrthoANI, Pilon, Snippy, Nullarbor, Prokka, Roary, Bakta, Parsnp, Figtree, Raxml, Fastree, Iqtree, RAxML, Seaview, Chewbbaca, Unicycler, Porechop, Guppy, Gubbins, Albacore, Deepbinner, Clair3, Medaka, Nanopolish, Fly, Dorado...). Ces pipelines « maison » sont codés sous Nextflow, appellent des containers singularity, sont versionnés et déposés sur github. La DSN 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.</p> <p><u>Externe</u> : Le CNR participe également à un groupe de travail européen pour le design et l'évaluation d'analyse de typage par cgMLST de <i>Legionella pneumophila</i>.</p> <p>Le CNR a accès aux outils bioinformatiques développés par le service de bioinformatique du LBMC de l'ENS de Lyon ainsi qu'à ceux développés par le service de bioinformatique (BIBS) du Centre de recherche en infectiologie de Lyon (CIRI) dont il est membre du comité de pilotage.</p> <p>Le CNR a accès aux formations proposées par le service BIBS du CIRI et le LBMC (formation R, gitlab, Nextflow, RNAseq...) auxquelles il a participé en 2022.</p>

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

<input type="checkbox"/> <b>NON</b>	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> <b>OUI</b>	<p>Pour les activités suivantes :</p> <p><u>Investigations d'épidémies</u> : Le séquençage NGS est réalisé dans le cadre d'investigation d'épidémies en particulier lorsque celles-ci impliquent des clones de <i>Legionella pneumophila</i> non différenciables par les techniques standard.</p> <p><u>Surveillance</u> : Dans le cadre de la surveillance, l'ensemble des isolats cliniques et environnementaux isolés en 2022 ont été séquencés en NGS. Ceci a été rendu possible grâce à :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- une augmentation de l'accessibilité aux automates et aux séquenceurs liés au développement de la plateforme GENEPII sur notre site ;</li><li>- une diminution des coûts de séquençage via la miniaturisation des réactions de préparation de bibliothèques 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.</li></ul> <p>Toutes les souches reçues au CNR sont séquencées qu'elles soient issues d'investigations ou reçues dans le cadre de la surveillance nationale.</p>

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

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

- Une identification d'espèce sur la base de l'homologie de séquence du génome entier par comparaison à une base de données locale de génomes des différentes espèces de légionelles ;
- Le MLST standard (SBT, 7 gènes) qui est extrait des séquences NGS et permet une correspondance entre une des méthodes de typage standard et les nouvelles méthodes ;
- Une analyse par cgMLST restreint (50 gènes) permettant de différencier des souches identiques en MLST standard ;
- Une recherche de résistance aux antibiotiques acquises par mutation des gènes cibles et/ou par la présence de gène codant des systèmes d'efflux.

D'autres analyses peuvent être effectuées en complément :

- L'analyse phylogénétique à partir de mapping sur un génome de référence ou d'assemblage de novo est réalisée pour différencier les grands clones de *Legionella pneumophila* dans un contexte épidémique.
- Une analyse par cgMLST ad hoc (>1000 gènes) peut être réalisée en complément de l'analyse phylogénétique.

## Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Dans le contexte d'investigation d'épidémies ou à la recherche de sources de contamination, **367 souches** ont été séquencées en 2022.

## Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Dans le contexte de surveillance, toutes les souches d'origine clinique reçues sont séquencées de façon prospective. En 2022, cela a représenté **554 souches** (pour certains patients un suivi des souches isolées au cours de l'infection est réalisée). A ces souches s'ajoutent le séquençage de **29 CQE** et de **238 souches** séquencées de façon rétrospective ou pour des études du CNR.

### Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Les données brutes sont stockées sur un serveur sécurisé des services informatiques des HCL

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Les données déposées dans le cadre de publications d'investigations particulières sont déposées dans une base de données publique (ENA et/ou NCBI) préalablement à chaque publication (cf. tableau 3).

**Tableau 3.** Numéros d'accèsion des différentes études déposées à l'ENA.

Accession	Secondary Accession	Title
PRJEB62570	ERP147665	Bacterial persistence in <i>Legionella pneumophila</i> clinical isolates from patients with recurring legionellosis
PRJEB51253	ERP135864	Detection of Lp1 macrolide-resistant isolates by Whole genome sequencing
PRJEB40106	ERP123705	Case report of a human pneumonia due to <i>Legionella sainthelensi</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 reduced susceptibility to macrolides owing to genes coding for an efflux pump
PRJEB14949	ERP016630	<i>Legionella pneumophila</i> macrolide resistance

## 2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Les souches et les prélèvements proviennent de laboratoires de centres hospitaliers, laboratoire privés ou environnementaux (cf 3.5.1).

Modalités de partage de séquences au niveau national / international : il n'existe pas de dépôt de type GISAID pour les *Legionella*.

Un projet sur le cgMLST intitulé: "Improving *Legionella pneumophila* microbiological surveillance: a cgMLST protocol for data sharing" devrait être soumis à l'ECCMID au nom de l'ESGLI par le CNR des Légionelles italiens (Maria Scaturro), auquel nous participerons. Plusieurs pays ont déjà leur souhait de participer au projet (Portugal, Autriche, Allemagne, Scotland, Slovenie). D'autres pays vont être sollicités.

Les séquences des souches produites par le CNR peuvent être partagées à la demande.

### 3. Activités de surveillance

#### Éléments clés en termes de surveillance en 2022

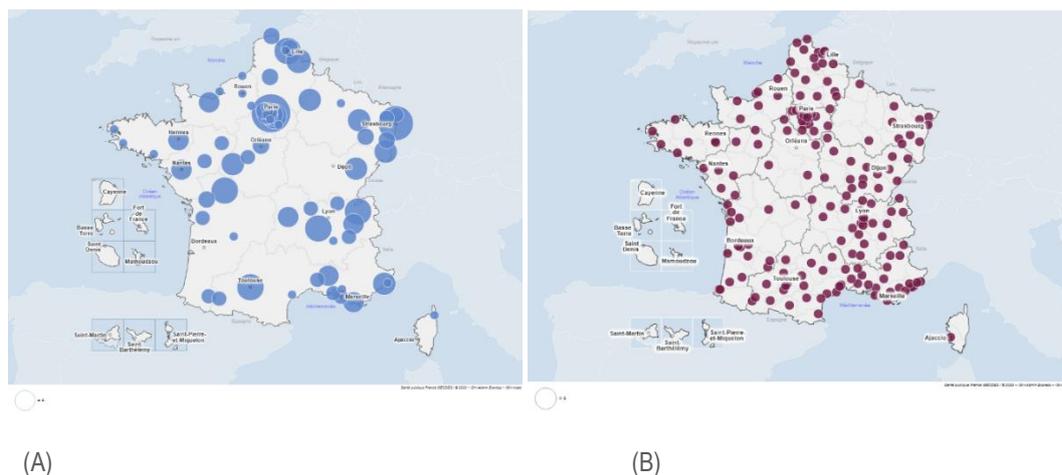
- Très forte interaction avec l'ensemble des Agences Régionales de Santé ;
- L'intégralité des souches d'origine clinique et des souches environnementales adressées dans le cadre d'une investigation autour d'un cas (n=861) ont été séquencées en 2022.
- 921 souches ont été typées par WGS, dont 367 souches dans un contexte d'investigation de la source de contamination et 554 dans un contexte de surveillance ;
- 83% des investigations microbiologiques par WGS se sont révélées positives ; les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination
- Les techniques de NGS, permettant la détermination des cgST et la phylogénie des clones majoritaires (ST1, 23, 40 et 62) disponibles au CNR sont un atout majeur pour la résolution des investigations.

#### 3.1 Description du réseau de partenaires

Nos partenaires sont répartis sur l'ensemble du territoire français à la fois en métropole et dans les DOM, notamment à la réunion où des prélèvements sont fréquemment reçus des centres hospitaliers et des laboratoires privés.

En 2022, **70 partenaires** nous ont envoyé **219 souches cliniques** (Figure 4A). Comme les années précédentes, ce sont majoritairement des laboratoires de centres hospitaliers (CHU et CH) qui réalisent la culture. Paris du fait de sa démographie et Strasbourg du fait de l'incidence plus forte dans le Nord-Est de la France sont les villes qui nous ont envoyé le plus de souches en 2022, avec respectivement 14 et 11 souches.

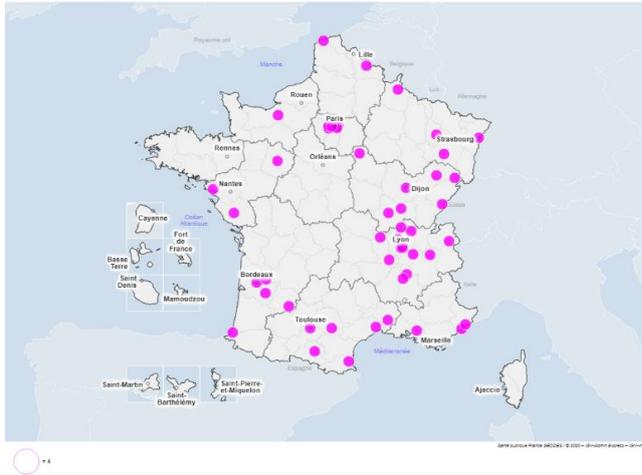
En parallèle, **199 partenaires** (Figure 4B) nous ont envoyé **713 prélèvements respiratoires** pour mise en culture (diagnostic déjà réalisé par antigénurie et/ou PCR). Ce nombre important de prélèvements reçus pour mise en culture semble indiquer une bonne sensibilisation des partenaires. L'augmentation du nombre de partenaires observé en 2021 se confirme en 2022 avec à la fois des centres hospitaliers et des laboratoires. 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 préconisations. Nous notons à nouveau l'utilisation plus fréquente de PCR à visée diagnostique par nos partenaires avec **153 prélèvements** reçus pour lequel une PCR avait déjà été réalisée, parmi lesquelles 130 positives et 50 chez des patients présentant une antigénurie négative.



**Figure 4.** Villes partenaires ayant envoyé en 2022 des souches cliniques (A) ou des prélèvements respiratoires pour mise en culture (B), le diagnostic de légionellose étant retenu par antigénurie et/ou PCR positive.

Le CNR est également sollicité pour l'aide au diagnostic de légionellose. En 2022, 57 partenaires (Figure 5) nous ont envoyé **278 prélèvements respiratoires pour diagnostic** (antigénurie négative, non réalisée ou douteuse). Parmi eux, 49 sont des centres hospitaliers. Le nombre de partenaires est en augmentation par rapport à 2020 et 2021 (moins de 40 partenaires)

mais reste inférieur à 2019 (79 partenaires) signant le développement des PCR au sein des laboratoires en France. Par contre, le nombre d'analyses demandées est en nette augmentation.

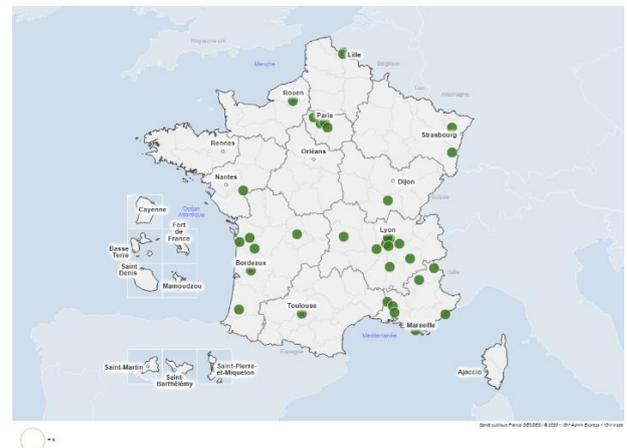


**Figure 5.** Villes partenaires ayant envoyé en 2022 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.

De plus, **49 partenaires** nous ont envoyé des prélèvements d'**urines** (Figure 6A) pour expertise et **34 partenaires** nous ont fait parvenir des **sérums** pour diagnostic ou confirmation sérologique (Figure 6B).



(A)



(B)

**Figure 6.** Villes partenaires ayant envoyé en 2022 des urines (A) ou des sérums pour expertise (B).

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

En 2022, **20 partenaires** nous ont envoyé des souches environnementales pour **identification** (Figure 7A) et **46 partenaires** nous ont envoyé des souches environnementales pour **comparaison** avec une souche clinique (Figure 7B). Le nombre de partenaires nous ayant envoyé des souches pour comparaison reste stable par rapport aux années précédentes et la baisse observée depuis 2020 du nombre de partenaires nous envoyant des souches pour identification se confirme. Pour les souches environnementales envoyées pour comparaison, 10 partenaires (principalement laboratoires environnementaux privés) nous adressent près de 70% des souches. Les autres souches sont reçues de centres hospitaliers.

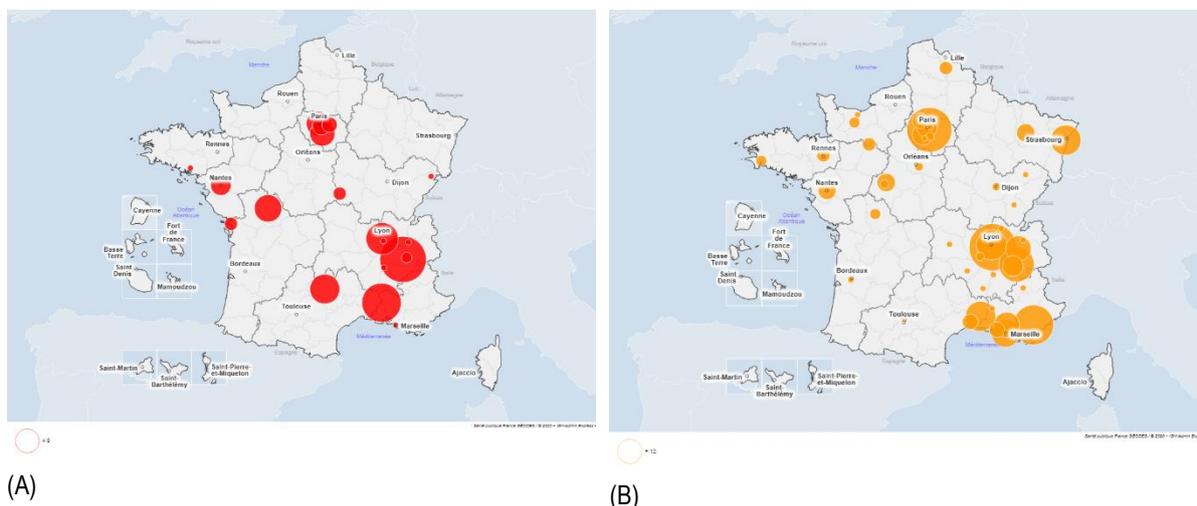


Figure 7. Villes partenaires ayant envoyé en 2020 des souches environnementales pour identification (A) ou comparaison (B).

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

- **Nombre et caractéristiques des cas diagnostiqués en France (données SpF)**

En 2022, 1 897 cas de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire. Parmi eux, 27 cas étaient des résidents des DROM (11 cas à la Réunion, 2 en Guyane, 7 en Guadeloupe et 7 en Martinique) et 33 cas étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux de notification des cas de légionellose en France était de 2,7/100 000 habitants (2,8/100 000 habitants en France métropolitaine).

Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2022 était inférieur à celui de 2021 (-8%) avec 2 060 cas, correspondant à un taux de notification de 3,0/100 000 habitants en 2021) mais comparable au nombre moyen de cas notifiés entre de 2017 et 2021 (1793 cas) (Figure 8).

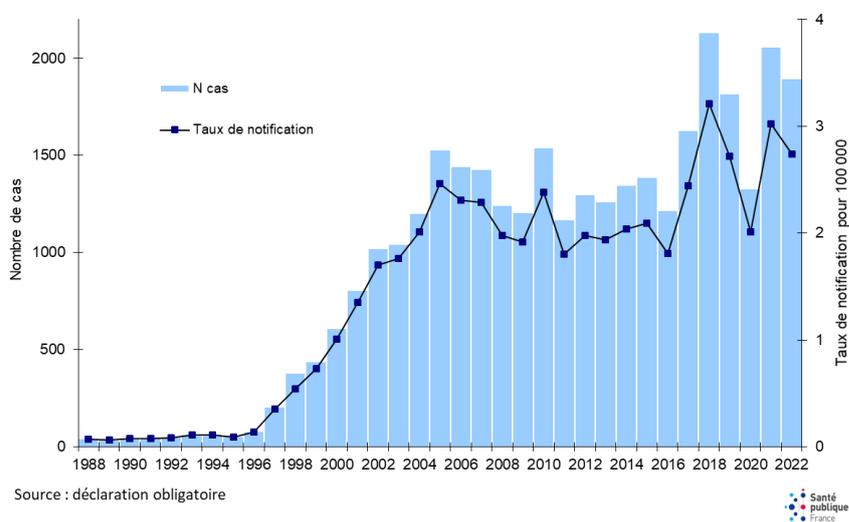
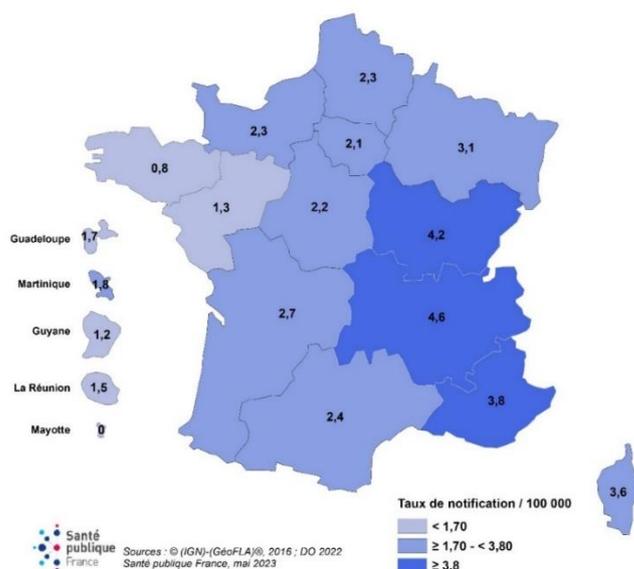


Figure 8. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2022 (Santé publique France).

En métropole, le gradient géographique Ouest-Est du taux de notification des cas de légionellose demeurerait toujours très marqué, variant de 0,8 /100 000 habitants en Bretagne à 4,6/100 000 habitants en Auvergne-Rhône-Alpes (Figure 9). En comparaison avec 2021, le taux de notification en 2022 était inférieur dans toutes les régions exceptées dans 3 régions pour lesquelles une augmentation était observée : Corse (3,6/100 000 habitants en 2022 vs 1,8 en 2021), Normandie (2,3/100 000 habitants en 2022 vs 1,8 en 2021) et Nouvelle Aquitaine (2,7/100 000 habitants en 2021 vs 2,1 en 2022).

Dans les DROM, en comparaison avec 2021, le taux de notification en 2022 était en augmentation en Martinique et Guadeloupe, stable en Guyane et en baisse à La Réunion.



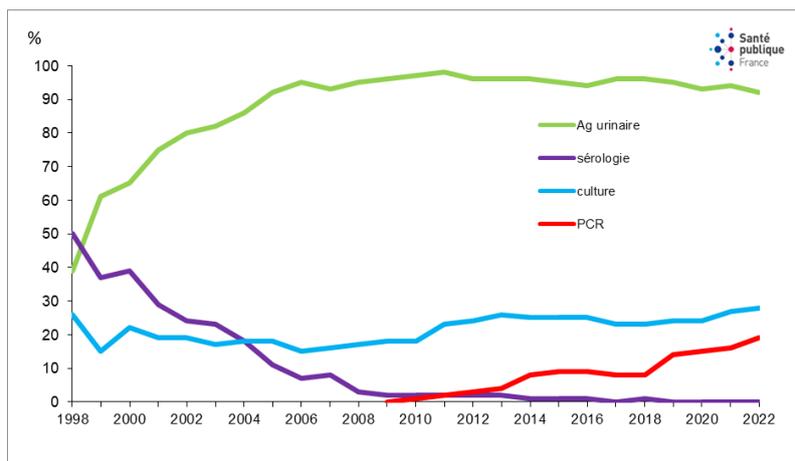
**Figure 9.** Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2022 (Santé publique France).

\*standardisé sur le sexe et l'âge

L'âge médian des cas était de 66 ans [min-max : 16-100 ans]. Le sexe ratio homme/femme était de 2,4 (1 333 hommes et 564 femmes). L'incidence augmentait avec l'âge et le taux d'incidence le plus élevé était toujours observé chez les personnes de plus de 80 ans (8,8/100 000). Parmi l'ensemble des cas, 43 (2,3%) n'avaient pas été hospitalisés, part légèrement supérieure à celle des cas notifiés de 2017 à 2021 (136 cas sur soit 1,5% ; p=0,02). Sur les 1 897 cas, 74% présentaient au moins un facteur favorisante.

Parmi les 1 897 cas, 1 840 (97%) étaient des cas confirmés diagnostiqués principalement en première intention par la détection des antigènes solubles urinaires (1 745 cas, 92%). Une PCR sur prélèvement respiratoire était positive pour 358 cas (19%), proportion en augmentation par rapport aux années précédentes (15% pour 2019-2021 ; p<10<sup>-6</sup>). Pour 57 (3%) cas, la PCR était la seule méthode de diagnostic biologique, proportion comparable à 2019-2021. Seize cas ont été uniquement diagnostiqués par culture et aucun cas n'a été diagnostiqué par sérologie (Figure 10).

La grande majorité des cas de légionellose était due à l'espèce *Legionella pneumophila* de sérotype 1 (Lp1) (1 773/ 1897, 93%).



**Figure 10.** Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2022 (données Santé publique France).

\*Plusieurs méthodes de diagnostic pour un cas

### 3.2.1 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 2022, le CNR a reçu notamment :

- une souche de *L. pneumophila* sérotype 1 du laboratoire de l'IHU de Marseille isolée d'un **abcès cérébral massif** suite à un geste chirurgical. L'hypothèse est une surinfection du site opératoire ; l'enquête environnementale réalisée et les

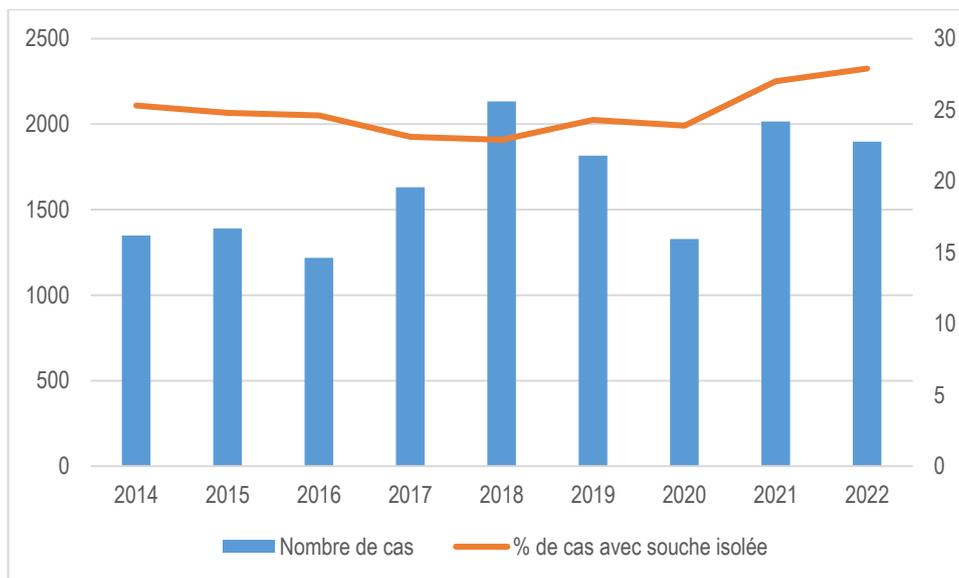
données de NGS ont permis d'identifier l'eau du domicile de la patiente comme étant la source probable de contamination ;

- une souche de *L. cincinnatiensis* isolée d'un **nodule sous-cutané** au niveau de la face postérieure de l'avant-bras inflammatoire initialement avec des douleurs au niveau de la gaine des extenseurs de la main droite. Ce nodule s'est résolu spontanément sans traitement antibiotique ;
- une souche de *L. longbeachae* isolée d'un prélèvement de **talon d'achille** en présence d'une pneumonie qui deviendra abcédée non documentée bactériologiquement. Le tableau initial d'arthralgies de mains et des pieds suspecté de poussée lupique avec atteinte articulaire avait été traité par bolus de solumédrol.

Un diagnostic d'endocardite infectieuse à *L. pneumophila* sérotype 1 a par ailleurs été diagnostiqué par PCR.

### 3.2.2 Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR

Parmi les 1897 cas de légionellose notifiés en 2022, **une souche a été isolée et analysée par le CNR pour 530 cas soit 27,9%** des cas. Ce pourcentage reste comparable à celui de 2021 (26,8%) mais la tendance à l'augmentation observée chaque année depuis 2018 continue (25,2% pour 2019-2021 ;  $p=0,02$ ) (Figure 13).



**Figure 11.** Evolution du pourcentage de cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2014 – 2022.

#### \* 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 WGS 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).

La très grande majorité (517/530, 98%) des souches isolées était de l'espèce *Legionella pneumophila*, dont 456 (88,2%) du sérotype 1 (Lp1) et 61 (11,8%) d'autres sérogroupes. Parmi les 13 autres souches, 9 étaient des *L. longbeachae*, 2 *L. anisa*, 1 *L. micdadei* et 1 *L. lansingensis*

Un cas de co-infection à *L. longbeachae* (souche isolée) et *L. pneumophila* sérotype 1 (PCR positive, pas de souche isolée) a été mis en évidence.

Quatre souches dont 1 de Lp1 et 3 de *L. non pneumophila* (non comptabilisés dans le bilan SPF) ont été isolées de prélèvements extra-pulmonaires : liquide articulaire, pus au niveau du tendon d'Achille, abcès, abcès cérébral.

A noter une souche de *L. longbeachae* isolée chez un patient hospitalisé à Nouméa (non comptabilisée dans le bilan SPF).

**Tableau 4.** Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupes de *L. pneumophila*, 2013 – 2022.

Espèces de <i>Legionella</i>	Nombre d'isolements									
	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
<i>Legionella pneumophila</i>	321	333	342	296	373	478	433	313	549	518
séro groupe 1	305	313	328	281	361	456	398	293	492	457 <sup>1</sup>
séro groupe non 1	16	20	14	15	12	22	35	20	57	61
séro groupe 2	2	3			1		6	4	10	11
séro groupe 3	9	6	3	1	5	6	6	3	12	14
séro groupe 4				1						
séro groupe 5	2	1	1				2			1
séro groupe 6	2	2	4	6	2	5	4	2	2	4
séro groupe 7	1	2	3	1	1		4	2	5	10
séro groupe 8		2		1	1	2	5	5	2	4
séro groupe 9								1	2	1
séro groupe 10		3	1	3		2	2		1	1
séro groupe 12					1	1				
séro groupe 13				1				1	1	
séro groupe 14						1	1			
séro groupe indéterminé <sup>2</sup>		1	2	1	1	5	5	2	21	15
<i>Legionella non pneumophila</i>	2	7	4	4	5	11	8	5	10	17
<i>Legionella dumoffii</i>	1				1	1				
<i>Legionella micdadei</i>		1		2		1			1	1
<i>Legionella longbeachae</i>	1	5	2			8	5	4	9	11 <sup>3</sup>
<i>Legionella anisa</i>			1		1					2
<i>Legionella gormanii</i>					1					
<i>Legionella bozemanii</i>		1	1	1	1		2			1 <sup>4</sup>
<i>Legionella feelei</i>					1					
<i>Legionella ciniciensis</i>										1 <sup>5</sup>
<i>Legionella sainthelensis</i>						1				
<i>Legionella maceachernii</i>				1				1		
<b>Total</b>	<b>323</b>	<b>340</b>	<b>346</b>	<b>300</b>	<b>378</b>	<b>489</b>	<b>441</b>	<b>318</b>	<b>564</b>	<b>535</b>

<sup>1</sup> dont 1 souche isolée d'un prélèvement d'abcès cérébral, non comptabilisée dans le bilan de Santé publique France

<sup>2</sup> réaction croisée en immunofluorescence directe

<sup>3</sup> dont 1 souche isolée d'un prélèvement de pus au niveau du tendon d'Achille, et 1 souche isolée d'un LBA prélevé chez un patient hospitalisé à Nouméa, non comptabilisées dans le bilan de SPF

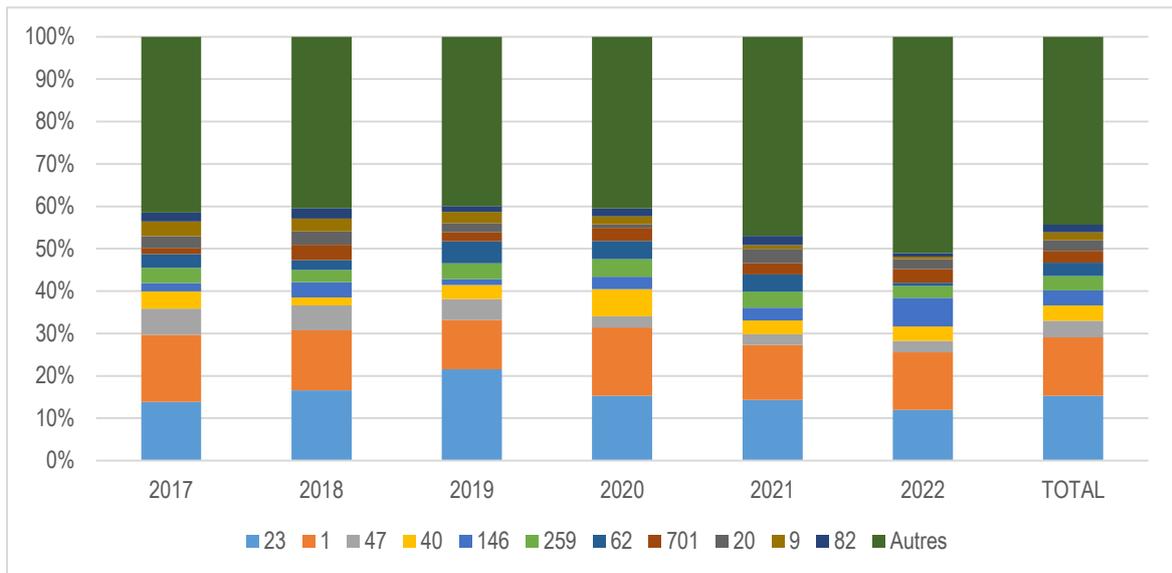
<sup>4</sup> souche isolée d'un prélèvement de liquide articulaire, non comptabilisée dans le bilan de SPF

<sup>5</sup> souche isolée d'un prélèvement d'abcès, non comptabilisée dans le bilan de SPF

#### \* Résultats du typage des isolats cliniques et des souches d'origine environnementale en lien avec les patients

- **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. En 2022, 921 isolats cliniques et environnementaux de Lp ont été analysés. L'ensemble des Lp analysées appartenait à 116 Sequence Type (ST) différents. En 2021 et 2022 il semble

qu'il y ait une tendance à l'augmentation du nombre et de la proportion de ST unique par rapport aux années précédentes, cela est dû à l'augmentation du nombre de souches environnementales génotypées. (Figure 12).



**Figure 12.** Evolution de la distribution des 44 principaux STs associés à l'infection en France de 2015 à 2022.

- **NGS.** Un total de 1188 souches a été analysé par WGS, 367 souches dans un contexte d'investigation de la source de contamination et 554 dans le contexte de surveillance prospectivement, 122 rétrospectivement, 116 dans le cadre d'études et 29 CQE (Contrôle de Qualité Externe), 18 CQI (Contrôle de qualité interne) (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 14).

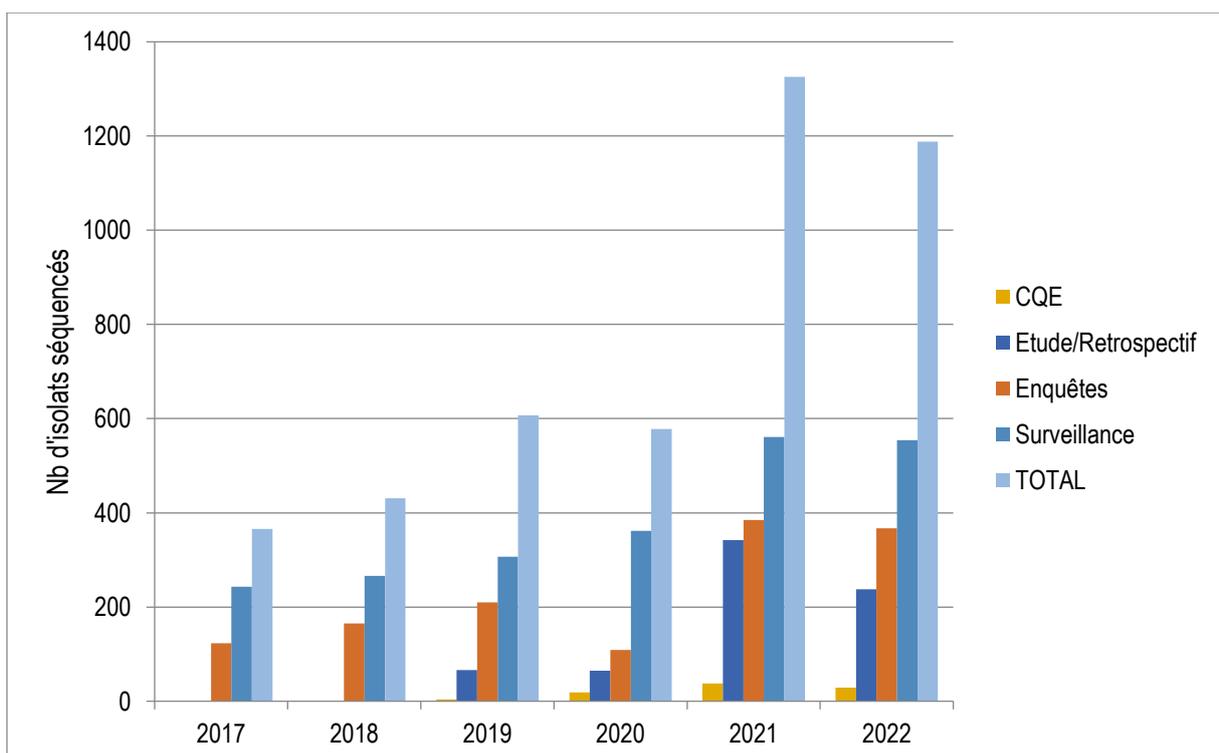


Figure 13. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.

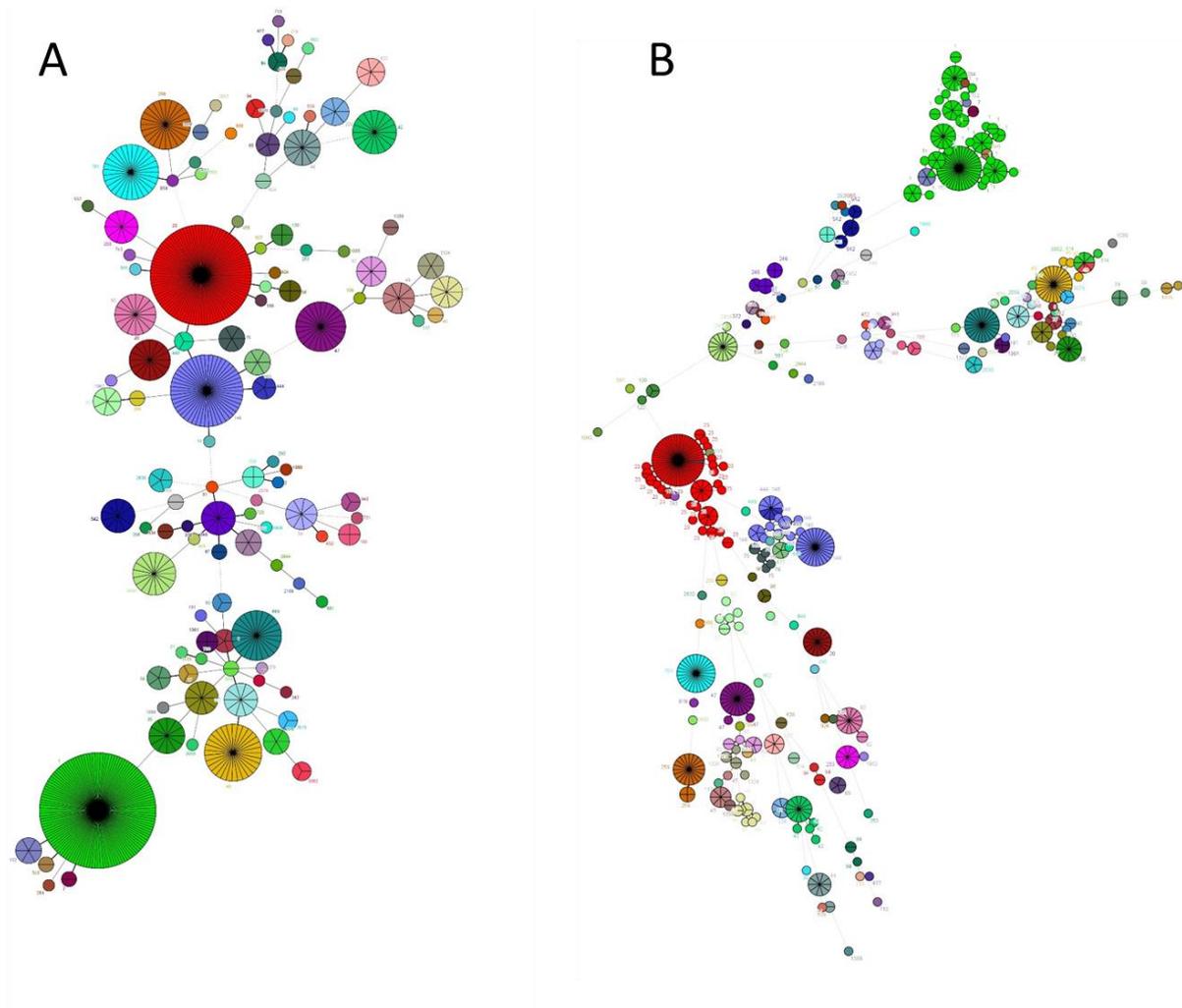


Figure 14. Typage par SBT (A) et cgMLST (B) des souches de *Legionella pneumophila* isolées en 2022.

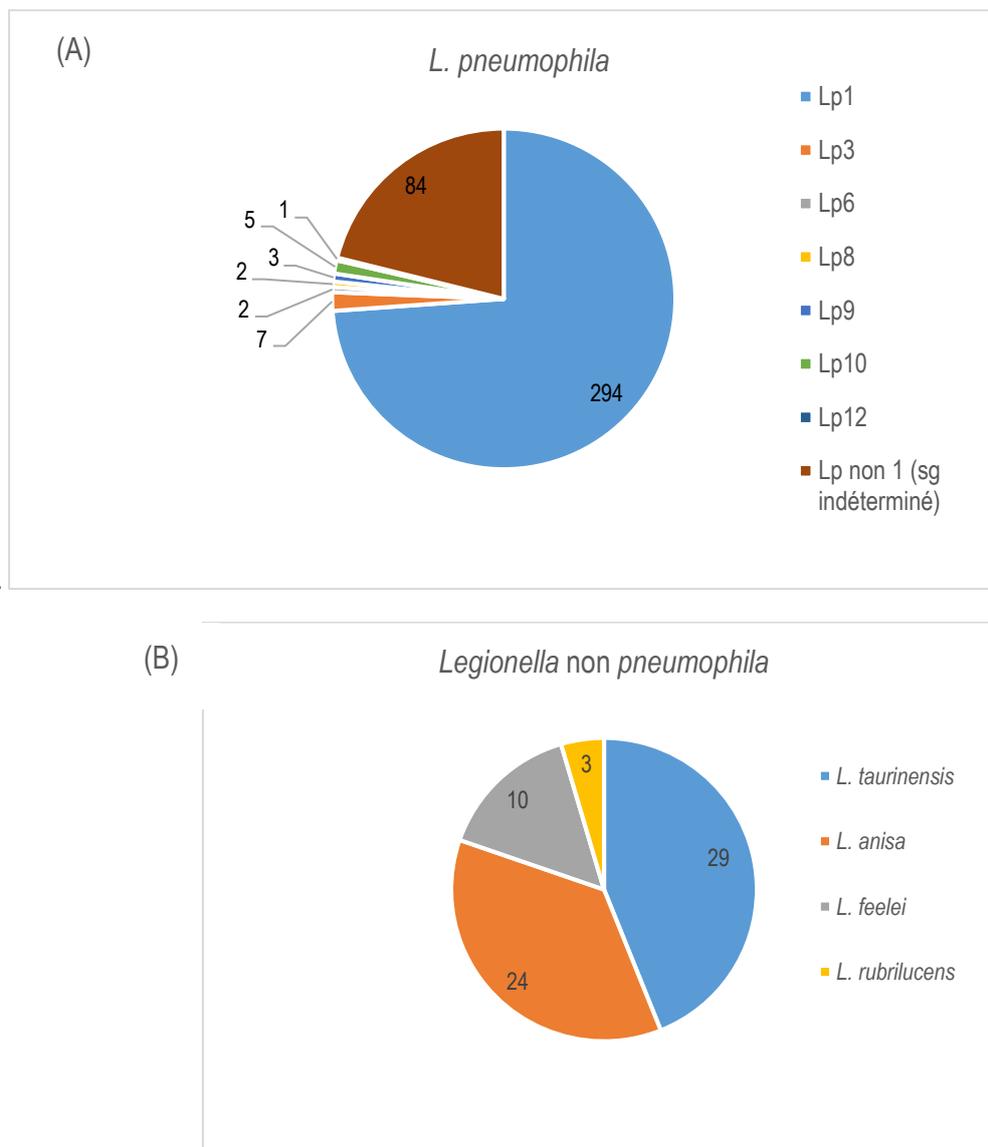
- **Typage en cas de culture négative.** En l'absence de souche clinique isolée, la technique de SBT nichée ou nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. Cette technique, qui présente de faibles performances, n'est à présent réalisée que de façon ciblée, à la demande des ARS lors d'investigations épidémiologiques et uniquement sur les prélèvements montrant une PCR spécifique Lp1 positive. En 2022, 21 prélèvements ont été analysés par cette technique. Un ST complet a été obtenu directement sur prélèvement respiratoire pour 1 seul cas ; pour 9 prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié.

### 3.2.3 Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR

En 2022, 467 souches environnementales nous ont été adressées par des laboratoires extérieurs (+46% par rapport à 2021). Parmi elles, 330 étaient adressées au CNR dans le cadre d'une comparaison avec un cas, 124 pour identification précise de séro groupe ou d'espèce (121 d'entre elles étant des Lp non 1 ou *Legionella non pneumophila*), et 13 (toutes Lp1) pour recherche de résistance (3 souches isolées lors d'un suivi de réseau colonisé par des souches résistantes aux macrolides en lien avec un cas, et 10 souches suspectes de résistance en provenance du CNR d'Italie).

La répartition des sérogroupes de *L. pneumophila* (n=398) est présentée en Figure 15A. Le CNR allemand de Dresden ne mettait plus à disposition en 2022 les anticorps monoclonaux de l'ensemble des sérogroupes de *L. pneumophila* et nous avons utilisé des latex monovalents commercialisés (Prolab) expliquant la hausse des sérogroupes non identifiés (84 en 2022, contre une vingtaine habituellement).

L'identification des 24 souches d'origine environnementale (5,2%) 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 15B.



**Figure 15.** Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2022 en termes de sérogroupe des souches de *L. pneumophila* (A) et d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila* (B).

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

#### Définitions utilisées pour exprimer la résistance

- **Techniques phénotypiques**

Le CNR réalise des antibiogrammes par microdilution selon la technique de microdilution préconisée par l'EUCAST ([https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Guidance\\_documents/Legionella\\_guidance\\_note\\_-\\_20210528.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Legionella_guidance_note_-_20210528.pdf)). Ces antibiogrammes ne sont pas réalisés en systématique mais à la demande dans des contextes de légionellose persistante. Il n'existe actuellement pas de kit de microdilution prêt à l'emploi commercialisé pour *Legionella*, et nous disposons d'une technique « maison ».

En 2022, nous nous sommes dotés de plaques à façon Sensititre qui permettent la réalisation d'antibiogrammes en une dizaine de minutes (versus une heure pour la technique « maison ») de façon standardisée. C

- **Techniques moléculaires**

Les mutations associées à une résistance aux antibiotiques indiqués dans la légionellose sont les suivantes :

- 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 sont recherchées à l'aide d'un pipeline « maison » appliqué sur toutes les données de WGS des souches.

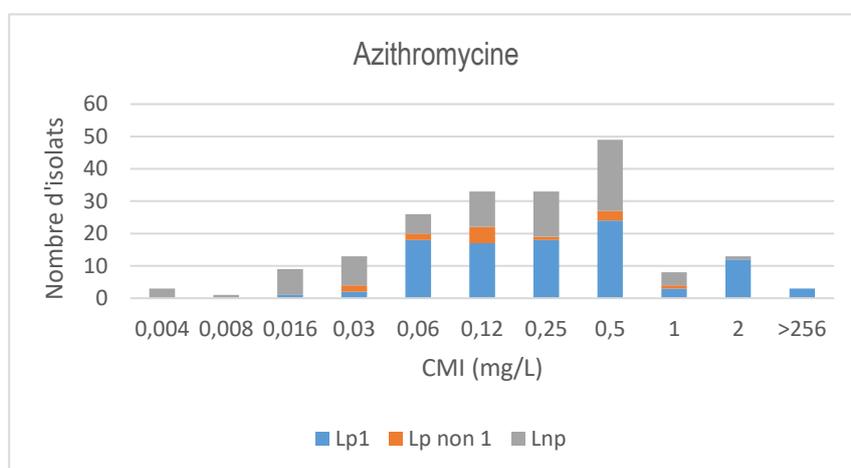
Afin de s'affranchir de la nécessité de disposer d'une souche, le CNR dispose également de PCR ciblées pour détecter ces mutations. Après réalisation d'une PCR en temps réel ciblant les gènes mutés en cas de résistance, un séquençage NGS est réalisé sur les produits de PCR. Il présente l'avantage de pouvoir détecter des sous-populations résistantes présentes dans une proportion de 0,5% au sein de la population totale.

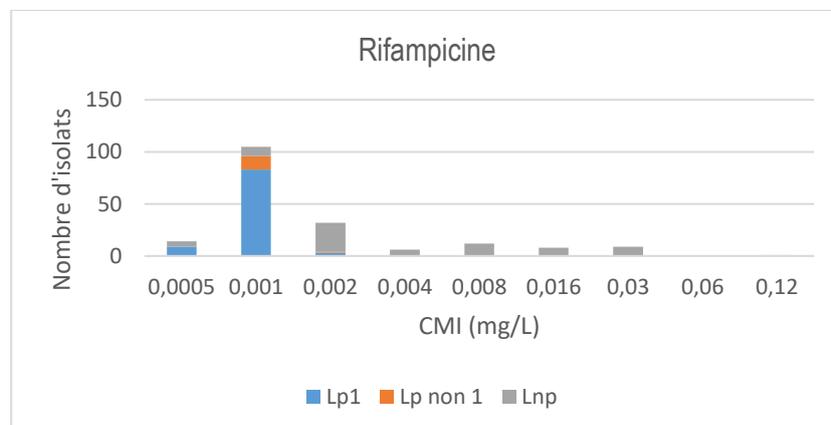
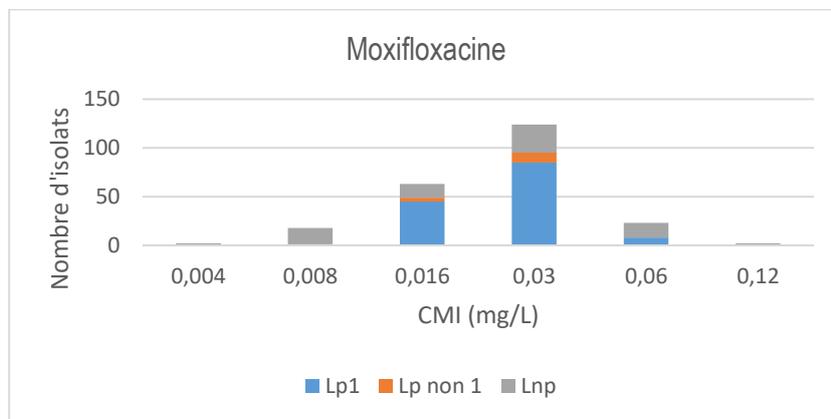
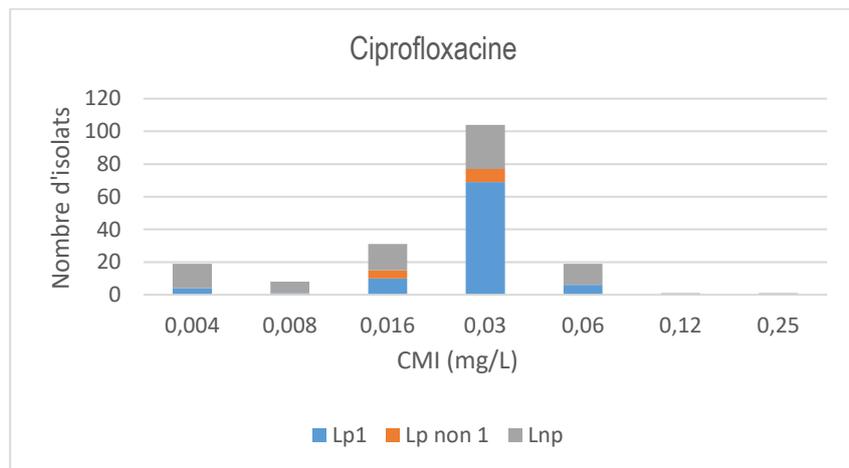
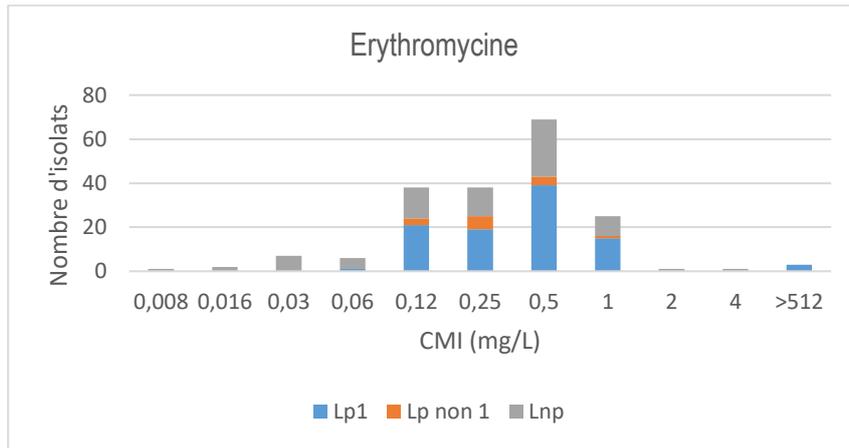
- **Résultats & analyse des tendances**

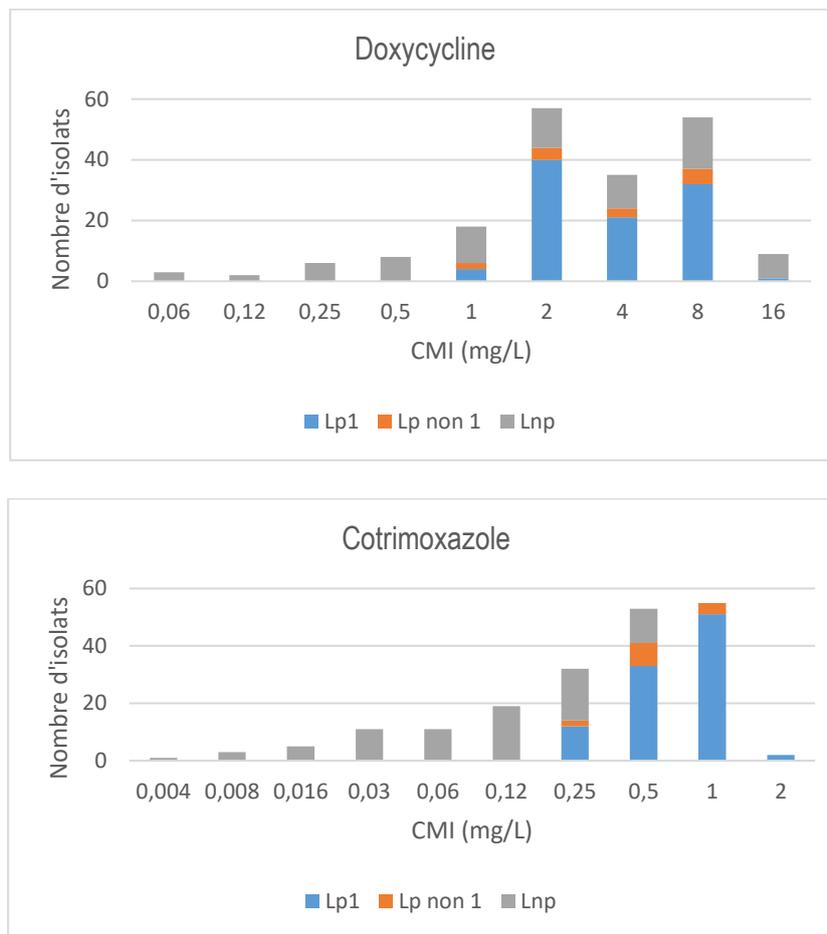
En 2022, la technique « maison » a été réalisée sur **24 souches** : 10 souches Lp1 provenant du CNR italien (Maria Louisa Ricci) pour lesquelles une résistance aux antibiotiques était suspectée, 3 souches environnementales pour lesquelles des mutations associées à une résistance aux macrolides étaient identifiées (suivi d'un réseau d'ECS dans le cadre d'une investigation autour d'un cas) et 11 souches cliniques de patients d'évolution défavorable.

La technique **Sensititre**, évaluée dans un 1<sup>er</sup> temps sur un panel de **109 souches** (cf 2.2) en comparaison avec la technique « maison », a été appliquée à un panel de **193 souches** constitué de 99 Lp1 et 14 Lp non 1 isolées prospectivement à partir d'échantillons cliniques en 2022, et de 80 souches cliniques (n=57) et environnementales (n=23) de *Legionella non pneumophila* (35 *L. longbeachae*, 10 *L. bozemanii*, 6 *L. taurinensis*, 4 *L. anisa*, 4 *L. dumoffi*, 4 *L. rubrilucens*, 3 *L. feelei*, 2 *L. micdadei*, 2 *L. maceachernii*, 2 *L. londiniensis*, 1 *L. gormanii*, 1 *L. israelensis*, 1 *L. jordanis*, 1 *L. lansingensis*, 1 *L. erythra*, 1 *L. cincinnatiensis*, 1 *L. nautarum*, 1 *L. sainthelensis*) isolées prospectivement ou conservées dans la souchothèque du CNR.

Les résultats obtenus avec cette technique sont présentés en Figure 16.







**Figure 16.** Distribution des CMI de sept antibiotiques sur un panel de 193 souches de *Legionella* avec la technique Sensititre.

Les points clés sont les suivants :

- Pour les macrolides : parmi les 16 souches (15 Lp1, 1 Lp non 1) possédant une CMI Azithromycine à 1 ou 2 mg/L (2<sup>nd</sup> pic, distribution bimodale), toutes possèdent la pompe à efflux LpeAB ; de la même façon, 15 des 16 souches possèdent une CMI Erythromycine à 1 mg/L et une à 0,5 mg/L ; la technique Sensititre permet donc de bien individualiser les souches porteuses de cette pompe à efflux pour les macrolides comme la technique « maison » ;
- Les trois souches environnementales résistantes aux macrolides (mutations A2058G) analysées en 2022 sont correctement identifiées avec la technique Sensititre avec des CMI supérieures aux valeurs hautes des gammes d'azithromycine et d'érythromycine (>256 et > 512 mg/L respectivement), concordant avec les valeurs obtenues avec la technique « maison » ;
- *Legionella non pneumophila* : tendance à des CMI Rifampicine plus élevées que pour *L. pneumophila*, et tendance à des CMI plus faibles pour les antibiotiques bactériostatiques (macrolides, doxycycline, cotrimoxazole) ;
- Cette étude décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois la distribution des CMI de *Legionella* pour le cotrimoxazole, antibiotique non testé avec la technique « maison ».

Les mutations sur les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques (respectivement *rpID*, *rpIV*, *rrl*, *gyrA* et *rpoB*) ont été systématiquement recherchées sur toutes les souches pour lesquelles un WGS a été réalisé (n=1110 en 2022). Trois souches environnementales résistantes aux macrolides (mutations dans les gènes *rrl* A2058G) ont été identifiées parmi les souches testées en 2022.

## 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 2022, des **courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF pour **923 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**

\* **Mise en place du protocole du projet d'étude LEGIODOM** - Cas isolés de légionellose et exposition à domicile (voir chapitre 3.1.9)

### 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. En 2022 il n'y a pas eu de réunion ELDSNet. Les membres du réseau se sont, pour une part, rencontrés lors du 10<sup>ème</sup> congrès international sur *Legionella* (20-24 Sept 2022, Yokohama, Japon). Le CNR était représenté par S. Jarraud et C. Ginevra.

\* Le CNR a participé à la campagne d'évaluation externe de la qualité proposé par l'ECDC (1 campagne par an). Cet EEQ auquel 24 laboratoires (20 pays de l'Union européenne, 4 de l'Europe de l'Ouest hors UE) ont participé permettait l'analyse de 30 échantillons cliniques (prélèvements respiratoires et urines) et environnementaux.

\* Les **données de typage par SBT** de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation sont systématiquement envoyées afin de renseigner la base de données EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Le site du PHE abritant les données de SBT est depuis une longue période indisponible en ligne ce qui peut entraîner des difficultés d'attribution des ST (lorsqu'il s'agit de nouveau ST) des souches analysées. Le CNR a détourné la problématique pour les ST déjà connus en 2019 par la création d'un pipeline spécifique. Pour les STs nouveaux, un mail est fait en systématique au PHE afin d'avoir une réponse spécifique.

\* **Membre du groupe d'étude européen groupe d'étude ESCMID (European Study Group for Legionella Infection) pour les infections à Legionella (ESGLI)** (S Jarraud, présidente en 2022) comprenant 69 membres européens et internationaux. Le groupe ESGLI est un groupe de scientifiques dont l'objectif est d'étudier et d'améliorer le diagnostic, le traitement, le contrôle et la prévention de la légionellose. Pour ce faire, il encourage et soutient la recherche, l'éducation, la formation et les bonnes pratiques médicales.

- **Collaborations**

\* L'expertise du CNR sur l'étude de la **résistance de *Legionella* aux antibiotiques** a permis une collaboration initiée avec **Cardiff University** (Brad Spiller) et **plusieurs CNR** (Royaume-Uni, Italie, Espagne, Belgique, Suisse, Allemagne, Danemark). L'objectif est de déterminer la distribution des CMI et les ECOFF pour un panel de souches cliniques de *Legionella pneumophila* par une technique de microdilution standardisée commune aux différents pays. Les premières discussions techniques ont eu lieu en 2022, l'étude devrait être menée en 2023.

\* Collaboration avec le **CNR des légionelles d'Italie** dans le cadre du **typage des souches ST23** fréquentes en France et en Italie par WGS

Publication en commun en 2022 : Genome analysis of *Legionella pneumophila* ST23 from various countries reveals highly similar strains. Ricci ML, Fillo S, Ciannaruconi A, Lista F, Ginevra C, Jarraud S, Girolamo A, Barbanti F, Rota MC, Lindsay D, Gorzynski J, Uldum SA, Baig S, Foti M, Petralito G, Torri S, Faccini M, Bonini M, Gentili G, Senatore S, Lamberti A, Carrico JA, Scaturro M. Life Sci Alliance. 2022 Mar 2;5(6):e202101117.

\* Collaboration avec la **Norvège** (CH d'Oslo) pour la caractérisation d'une **endocardite infectieuse à *L. bozemanii*** : publication du Case report en 2022. Le CNR est intervenu en réalisant les sérologies spécifiques de *L. bozemanii* (réalisées par très peu de laboratoires) : A prosthetic valve endocarditis caused by *Legionella bozemanii* in an immunocompetent patient. Fraz MSA, Dahle G, Skaug KM, Jarraud S, Frye S, Bjørnholt JV, Nordøy I. Front Med (Lausanne). 2022 Nov 3;9:1055465.

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

#### \* Etude LEGIODOM - Cas isolés de légionellose et exposition à domicile

**Contexte – Objectifs.** Le nombre de cas de légionellose notifiés reste élevé ou du moins, ne diminue pas ces dernières années. La majorité (60%) des cas sont des cas communautaires sans exposition particulière rapportée. Les résultats des investigations épidémiologiques environnementales et microbiologiques menées autour des cas isolés ont montré que l'eau des réseaux sanitaires peut être à l'origine de la contamination des cas de légionellose mettant en exergue l'importance des mesures de prévention, de la surveillance et le contrôle du « risque légionelles » dans les réseaux d'eaux qui ne sont pas tous soumis à une réglementation. Afin d'améliorer les connaissances sur les sources de contamination des cas de légionellose, il s'avère donc primordial de documenter la part des cas de légionellose pouvant être liée à une contamination à domicile via les réseaux de distribution d'eau. Cette exploration s'inscrit dans le contexte de la Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine décliné dans le Plan national de santé environnement (PNSE 4) lancé en 2021, par son action n°12 vise à mieux comprendre et prévenir les cas de légionellose. Un des deux axes de cette action prévoit l'exploration de la part potentielle des cas de légionellose en lien avec des contaminations à domicile.

L'objectif **principal** de cette étude est de déterminer la part potentielle des contaminations à domicile dans les sources de contamination des cas sporadiques de légionellose.

Les objectifs **secondaires** permettront d'identifier les facteurs pouvant être liés à la contamination du réseau d'eau, aux caractéristiques microbiologiques de l'eau et des *Legionella* et à la sévérité des cas

**Partenaires et contributions du CNR.** Le Centre national de référence des légionelles (CNR-L) (Pr Sophie Jarraud (HCL, CNR-L) en qualité d'investigateur principal de cette étude et Santé publique France (Christine Campese) en tant qu'investigateur associé sont à l'initiative du montage de l'étude. Le CNR-L sera en charge du monitoring de l'étude, de la récolte des données, de leurs validations ainsi que des analyses en lien avec l'unité Hygiène, Epidémiologie et Prévention Pôle Santé Publique des Hospices Civils de Lyon.

Un comité d'appui thématique (CAT) a été mis en place, il est composé de Sophie Jarraud, Christine Campese et Marjorie Brou (DGS) et de :

- Karine Alleaume, ingénieure d'études sanitaires, Agence régionale de santé (ARS) de Grand Est
- Thierry Chesnot, chef d'unité adjoint microbiologie des eaux, ANSES
- Olivier Correc, responsable du Pôle "Innovation, recherche et certification de services", Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB)
- Olivier Coulon, Ingénieur d'études sanitaires, Agence régionale de santé de Provence-Alpes-Côte d'Azur
- Cédric Dananché, Maître de Conférence des Universités Méthodologiste, biostatisticien - Praticien Hospitalier, Unité d'Hygiène, Epidémiologie et Prévention, Pôle Santé Publique, Hospices Civils de Lyon
- Laurent Devien, médecin chargé de missions, service de veille sanitaire, Agence régionale de santé des Hauts-de-France
- Béatrice Jedor, Adjointe à la cheffe du bureau de la qualité des eaux, Direction Générale de la Santé
- Stéphanie Langolff-Valet, Ingénieure santé environnement, Agence régionale de santé de Normandie

- Pierre Le Cann, Enseignant chercheur, École des Hautes Études en Santé Publique
- Amélie Planel, Ingénieure Génie sanitaire, Agence régionale de santé d'Auvergne-Rhône-Alpes
- Sophie Raguét, Chargée de projets scientifiques, région Grand Est Santé publique France

**Etat d'avancement.** De nombreuses réunions ont eu lieu en 2022 pour mettre en place cette étude. Le protocole final de l'étude a été validé par le CAT, une demande d'autorisation CNIL est en cours (en 2023). L'étude doit démarrer fin 2023.

#### \*Point de situation des cas de légionelloses à *Legionella longbeachae* en France

**La Direction générale de l'alimentation (DGAL)** veille à la sécurité et à la qualité des aliments à tous les niveaux de la chaîne alimentaire, ainsi qu'à la santé et à la protection des animaux et des végétaux. Un point de situation des cas de légionelloses à *Legionella longbeachae* en France possiblement liés à la manipulation de terreaux et composts a été réalisé lors d'une réunion d'échange avec la DGAL et les professionnels en août 2022. Les institutions présentes étaient la DGAL, l'ANSES et la DGCCRF (Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes).

**Signalement.** Faisant suite à l'alerte, fin juillet de la DGAL sur des cas de légionellose causés par *Legionella longbeachae* possiblement en lien avec la manipulation de terreau, un point de situation des cas de légionellose à *Legionella longbeachae* a été fait par le Centre National de Référence des légionelles et la direction des maladies infectieuses de Santé publique France.

***Legionella longbeachae.*** Contrairement à l'Australie et à la Nouvelle Zélande, les cas de légionellose à *L. longbeachae* rapportés dans les autres pays sont rares. Les cas de légionellose à *Legionella non pneumophila* représentent en Europe moins de 5% des cas dont 1% sont des cas à *L. longbeachae* (15 cas en 2019 et 17 en 2020 par isolement de souche). Les données de la littérature sur les cas de légionelloses à *L. longbeachae* documentent que l'exposition aux terreaux et aux composts présente un risque particulier d'infection notamment par à l'inhalation ou l'aspiration de poussière contaminés. Suite à ce constat, de nombreuses études ont été menées sur la composition des terreaux, les types d'expositions, les mesures prises lors des manipulations. Une étude en Australie montre que 14% des gants des jardiniers contiennent des *Legionella longbeachae* qui peuvent persister plusieurs jours. Des recommandations ont été émises par plusieurs pays dans le monde et en Europe notamment sur des mesures à prendre lors de la manipulation des terreaux : port de masque, gants, lavage des mains après manipulation.

**En France,** il est observé depuis 2018 une augmentation du nombre de cas de *L. longbeachae* (Tableau 5). Comparable aux caractéristiques des cas de légionellose habituellement rencontrées, la majorité des cas à *L. longbeachae* sont des hommes (26 hommes et 9 femmes) et 74% présentent un facteur de risque mais les cas sont plus âgés (médiane 71 ans vs 63 ans). Sur la période 2018-2022, la plupart des cas sont survenus au printemps.

**Tableau 5.** Nombre de cas de légionellose à *L. longbeachae* en France depuis 2016.

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de cas en France	1218	1603	2133	1816	1328	2060	1897
Nombre de souches isolées (%)	300 (25%)	377 (23%)	489 (23%)	441 (24%)	317 (24%)	552 (27%)	530 (28%)
Nombre de cas à <i>L. Longbeachae</i>	0	0	9	6	6	9	16
Souche isolée	-	-	8	5	4	8	9
PCR	-	-	1	1	2	1	7

Contrairement à la majorité des cas liés à *Legionella pneumophila* séro groupe 1 diagnostiqué par une détection d'antigène dans les urines, le diagnostic pour les *L. longbeachae* s'effectue à partir d'un prélèvement respiratoire bas par isolement de souche ou par une PCR ciblant *Legionella non pneumophila*. Suite à la réception de chaque déclaration obligatoire de légionellose, l'ARS interroge le cas ou son entourage sur les expositions à risques incluant la notion de jardinage et manipulation de terreau. Dans le cadre des légionelloses à *L. longbeachae*, si la manipulation de terreau est retrouvée, une demande de prélèvement et d'analyse au CNR est préconisée permettant de documenter si le terreau est à l'origine de la maladie.

**De 2018 à 2022,** le CNR a analysé 27 prélèvements de terres ou terreaux. La culture de ces prélèvements s'avère difficile car ces prélèvements sont fortement contaminés par d'autres espèces bactériennes et par des moisissures de l'environnement. En l'absence de culture positive, le développement du séquençage NGS permet au CNR d'identifier la présence de plusieurs espèces au sein d'un prélèvement et de conclure à la présence de *L. longbeachae* dans presque tous les terreaux analysés ; d'autres espèces pathogènes comme *L. pneumophila* ou *L. bozemanii* sont quelquefois détectées.

**Cas groupés en Vendée :** entre le 15/05/2020 et le 29/07/2021, 5 cas de légionellose à *L. longbeachae* ont été diagnostiqués par PCR avec 3 souches isolées au CNR-L. Il s'agissait de 5 hommes, âgés de 54 à 82 ans, domiciliés dans différentes communes de Vendée ; 2 sont décédés. Tous les cas avaient manipulé du terreau, du compost et/ou du fumier durant leur période d'exposition ou ils possédaient ce type de produits à domicile. Cependant aucun produit commun aux cas n'a été identifié et aucune autre source d'exposition évidente n'a été retrouvée par ailleurs.

### **Conclusion**

Le nombre de cas de légionellose à *Legionella non pneumophila* dont les *L. longbeachae* est très probablement sous-estimé et pour ces cas un lien est établi par les données de la littérature avec la manipulation de terreau.

Dans ce contexte, il est nécessaire de continuer à promouvoir le diagnostic des cas de légionelloses à *L. non pneumophila*. Lors de forte suspicion de légionellose et/ou de notion de manipulation de terreau, et pour les cas de pneumonie avec un test d'antigénurie à Lp1 négatif et/ou une PCR *L. pneumophila* négative, il est recommandé d'envoyer un prélèvement respiratoire au CNR pour diagnostiquer les cas à *L. longbeachae*. De plus, l'envoi au CNR de prélèvements pour lesquels une PCR *L. non pneumophila* s'avère positive pourrait également permettre d'identifier de nouveaux cas à *L. longbeachae*.

Afin de poursuivre la documentation des cas à *L. longbeachae*, l'envoi de terreau manipulé lors de la période d'exposition au CNR doit se poursuivre selon les modalités à discuter au cas par cas entre le CNR et l'ARS.

Au final, afin de limiter le risque lié au terreau, il s'avèrerait opportun d'envisager des préconisations pour la mise en place de mesures de protection lors de la manipulation de terreau.

### **\*Enquête en cours sur l'évaluation de la diffusion environnementale d'une souche hautement résistante aux macrolides identifiée en 2021 dans un hotel en France.**

En 2021, dans le cadre d'une investigation autour d'un cas (souche clinique non isolée), des souches environnementales qui nous ont été adressées pour comparaison ont révélé des mutations associées à une résistance de haut niveau (CMI x 1000) aux macrolides. En lien avec l'ARS concernée, SpF et les laboratoires d'analyses environnementales assurant les prélèvements et les analyses d'eau de cet hôtel, notre objectif était de réaliser un suivi de la persistance de ces souches dans le réseau de l'hôtel concerné et de réaliser une cartographie plus large du réseau desservant cet établissement afin de caractériser une éventuelle diffusion plus étendue de telles souches.

De nouvelles souches isolées en juin 2022 sur le réseau de l'hôtel nous ont été transmises, elles présentaient elles-aussi des mutations de résistance, témoignant d'une persistance de la souche dans le réseau de l'hôtel. En 2022, une réunion afin d'établir le plan d'action à mettre en œuvre a été planifiée (pour 2023), afin de cartographier le réseau d'eau sur la ville concernée. Ce plan prévoit pour 2023 :

- Récupération auprès de mairies des résultats d'analyses légionelles sur leurs ERP
- Récupération des résultats d'analyses pour les ESMS
- Listing des ERP type hôtel/gites
- Récupération des résultats des études recherche de médicaments et pesticides sur eau brute en station/eau du département
- Recherche de légionelles dans des réseaux d'ECS autres que celui de l'hôtel
- Recherche de macrolides / pesticides sur le réseau.

L'étude est en cours.

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

Parmi les 1897 cas de légionellose diagnostiqués en 2022 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2022), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour 58 cas de légionellose, soit 3,1 % de l'ensemble des cas et 11% des cas avec souche disponible. Pour 2 cas, 2 sources potentielles d'infection ont été investiguées montrant le nombre de comparaisons réalisées à 60. Parmi les 60 comparaisons effectuées, les profils génomiques des souches clinique et environnementale(s) se sont révélés identiques pour 50 investigations (83%) (Figure 17).

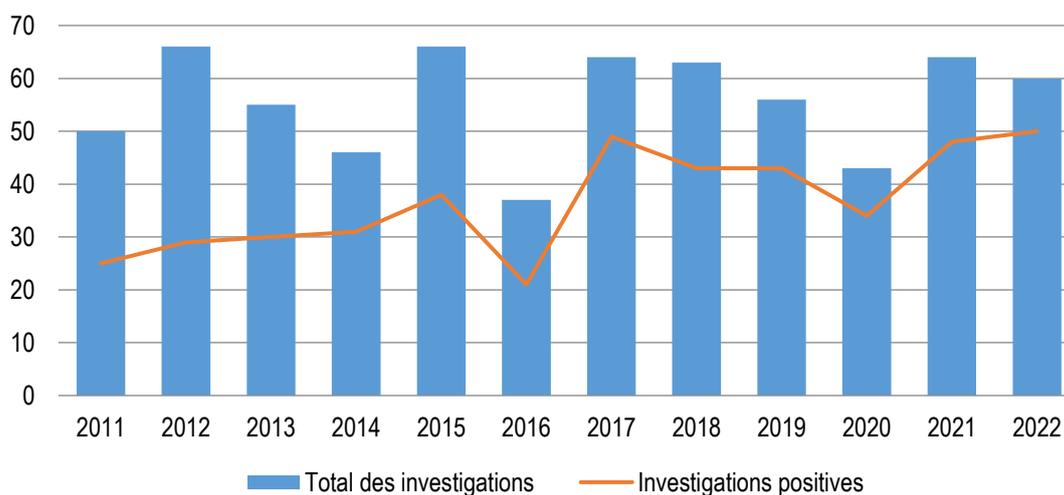


Figure 17. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2011.

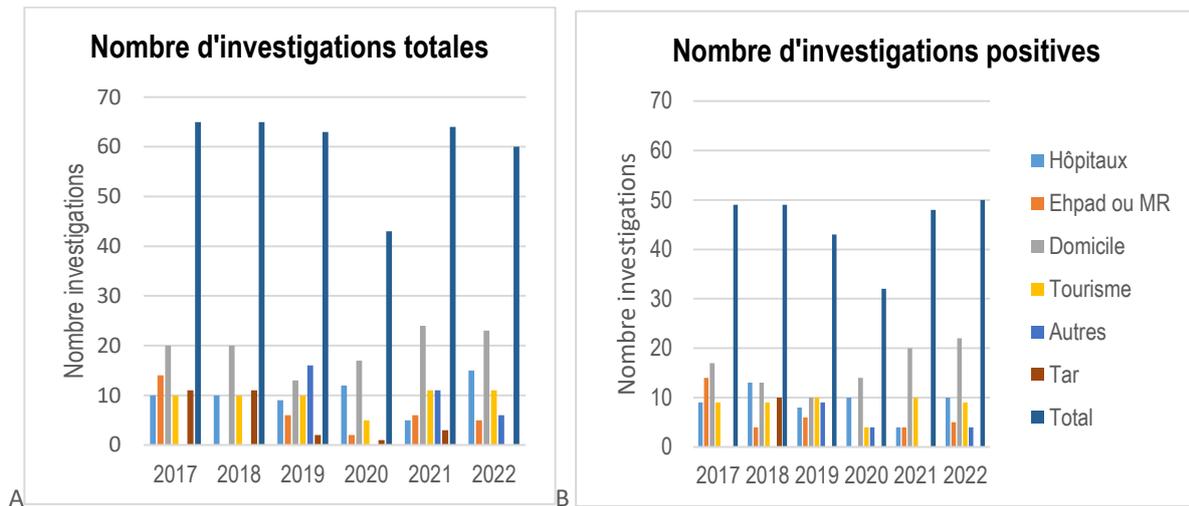
Pour les 58 cas de 2022, les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que **les réseaux d'eau sanitaire** étaient la **source la plus probable de contamination** dans 10 établissements de santé, 22 domiciles, 9 établissements de tourisme, 5 établissements de personnes âgées et 4 autres établissements (un vestiaire de piscine, un vestiaire de salle de sport, un internat et un centre d'accueil) (Tableau 6, Figure 18).

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). Parmi les sources investiguées, nous notons un jacuzzi à domicile et un bateau parmi les établissements touristiques.

Tableau 6. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2022.

	Investigations positives		Investigations négatives N	Investigations totales	
	N	%		N	%
Hôpitaux	10	67%	5	15	25%
EHPAD/ MR	5	100%	0	5	8,5%
Domicile	22	96%	1	23	38,5%
Tourisme	9	82%	2	11	18%
Autres	4	67%	2	6	10%
TAR	0	0%	0	0	0%
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>83%</b>	<b>10</b>	<b>60</b>	<b>100%</b>

MR : maison de retraite



**Figure 18.** Investigations épidémiologiques réalisées (A) et positives (B) entre 2017 et 2022 en fonction du lieu d'investigation et du résultat de l'enquête.

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

Pour chaque enquête, nous avons comparé la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire du patient à 1 à 27 souches environnementales issues de prélèvement d'eau auquel le patient avait potentiellement été exposé. La comparaison des souches se base sur la comparaison du ST (Sequence Type, 7 gènes) et du cg ST (core genome Sequence Type, 50 gènes) des souches obtenues par WGS (Whole Genome Sequencing). Ces seules données étaient suffisantes pour conclure 44 des investigations. Pour 16 investigations, le ST et cgST des souches cliniques et environnementales étaient identiques mais appartenait à un clone endémique, ST1 ou ST23. Pour ces 16 investigations, une analyse phylogénétique du génome avec détermination du nombre de SNPs a dû être réalisée et a conclu à des souches identiques.

## 4. Alertes

---

### 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](mailto:alerte@sante.gouv.fr)).

En 2022, le signalement de 2 situations avec l'existence de profils identiques entre des patients provenant de régions différentes a été réalisé. Aucun lien épidémiologique entre ces patients n'a été identifié.

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

**Ne sont exposés ici que quelques investigations les plus « atypiques » de 2022.**

#### **Episode de cas groupés de légionelloses en lien avec la fréquentation des thermes de Saujon (Charente-Maritime), avril 2022.**

Depuis 2019, 8 cas confirmés de légionelloses à *pneumophila* séro-groupe 1 ayant un lien avec les thermes de Saujon (exposition au cours des 14 jours précédant le début des signes) ont été signalés, dont 4 en 2019 (juillet-octobre), 3 en 2021 (septembre-novembre) et 1 en 2022 (avril). Sur ces 8 cas, un est décédé (2019). Une souche clinique a été isolée pour 2 cas (1 en 2019 et 1 en 2022) avec identification d'un ST42 dont les analyses phylogéniques réalisées au CNR ont confirmé que ces souches étaient très proches (quelques SNPs de différences). Toutes ces personnes ont fréquenté l'établissement thermal de Saujon et ses installations. Contrairement aux investigations environnementales de 2021 qui avaient permis d'identifier des souches de *L. pneumophila* séro-groupe 1 identiques aux souches du patient, les analyses environnementales effectuées en avril 2022 n'ont pas mis en évidence une présence de légionelles sur les différents réseaux d'eaux (ECS, EFS, EMN) et au niveau des installations. Les résultats d'analyse génomique réalisés au CNR de la souche clinique du cas de 2022 (ST 42) sont compatibles à ceux de la souche clinique d'un cas de 2019 et avec les souches environnementales issues des installations des thermes en 2021, laissant fortement supposer une source d'exposition commune au niveau des thermes de Saujon.

#### **Episode de cas groupés de légionellose en lien avec un quartier approvisionné en eau chaude collective à St Priest Bel Air (Rhône).**

En 2022, un nouveau cas de légionellose a été identifié pour un patient résident dans le quartier Mansart bel Air à St Priest. Des investigations environnementales réalisées en juin et septembre 2022 ont retrouvés des souches identiques à celle isolée chez le patient. Plusieurs autres cas en lien avec ce quartier ont été identifiés au cours des dernières années dont un en 2021 pour lequel le CNR avait isolée la souche de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1. Le CNR a réalisé le typage et la comparaison des souches cliniques et environnementales.

#### **Episode de cas groupés de légionellose en lien avec l'hôpital du Charme à Aubenas (Ardèche).**

Dans le cadre de l'enquête autour d'une surincidence de cas en lien avec l'hôpital du Charme à Aubenas, le CNR a isolé 4 souches de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 de prélèvements respiratoires de 4 patients entre décembre 2021 et septembre 2022. Nous avons également reçu 28 souches environnementales isolées de différents points d'eau de cet établissement. Le CNR a réalisé le séquençage de génome complet de l'ensemble de ces souches ainsi que la comparaison épidémiologique et conclu que ces résultats sont en faveur de cette source de contamination commune.

#### **Co-infections de *Legionella***

Suite à une discordance entre un diagnostic par PCR (positif pour *Legionella pneumophila*) et l'espèce isolée en culture (*Legionella Longbeachae*), nous avons pu mettre en évidence une co-infection avec ces 2 espèces par l'utilisation d'une méthode de type NGS ciblée, basée sur l'amplification et le séquençage de la région intergénique séparant l'ARNr 23S et l'ARNr 5S. Séquençage qui permet une identification au niveau de l'espèce de toutes les légionelles présentes dans l'échantillon.

Grâce au séquençage systématique de tous les isolats cliniques, nous avons pu mettre en évidence une triple co-infection par des souches de *Legionella pneumophila* de 3 différents génotypes chez un patient suite à une noyade dans un étang.

## 5. Activités de mise à disposition de l'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 ». G. Descours, 1h30, 15 Nov 2022 en distanciel.

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

\*Accueil de Luna Girolamini (doctorante de l'Alma Mater Studiorum, Université de Bologne, programme de doctorat "Sciences de la terre, de la vie et de l'environnement" (STVA)) du 5 Sept 2022 au 2 Décembre 2022 pour la caractérisation de nouvelles espèces de *Legionella*. L'objectif du stage de Luna était d'apprendre certaines techniques pour mieux caractériser de nouvelles espèces et de collaborer avec nous sur cette thématique. Le projet "The development of bioinformatic tools to evaluate the antibiotics gene resistance to support the characterization of novel *Legionella* species discovered in the Emilia-Romagna region" a permis à Luna de caractériser le potentiel infectieux et la sensibilité aux antibiotiques d'isolats de *Legionella* appartenant à trois nouvelles espèces. La caractérisation de l'infectivité était basée sur différents modèles in vitro d'infection d'amibes (*Acanthamoeba castellanii* et *Acanthamoeba polyphaga*) ou de lignées cellulaires humaines (U937, A549). Pour atteindre cet objectif, des plasmides permettant l'expression de rapporteurs fluorescents ont été introduits dans les bactéries par électroporation. Luna a également réalisé des tests de sensibilité aux antibiotiques en utilisant la méthode de microdilution et a participé à l'évaluation d'un protocole différent pour la lecture de la méthode (test à la rezasurine).

\*Accueil d'étudiants qui ont eu des activités d'évaluation de kits ou de méthodologie développée au CNR :

- Martin Clerc, étudiant en 5<sup>ème</sup> année hospitalo-universitaire, Faculté de Pharmacie – ISPB, Lyon : évaluation de la technique Sensititre pour l'antibiogramme de *Legionella*. Janvier – Septembre 2022.
- Manon Obossou, 1<sup>ère</sup> année de BTS Bioanalyses et Contrôles, Paris : mise au point de la technique REPTIS pour l'identification de persisters chez *Legionella*. Novembre – Décembre 2022.

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

Aucun guide en 2022.

- **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 patient pour lequel une souche ou un prélèvement nous a été adressé pour typage (que la souche soit isolée ou non) et chaque investigation, représentant 923 patients et un total de plus de 1000 courriers incluant les investigations parfois multiples pour un même patient en 2022.

\*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**

\* Information des professionnels de santé lors de différents congrès : XXV<sup>ème</sup> journée de Microbiologie Clinique du Col. BVH, RICAI, SF2H, Journées d'Actualités Physiopathologiques de Strasbourg, GREPI

- **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 (plus de 1000 courriers en 2022).

## 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

**ECDC (EDSNet)** – 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 (présidente, S. Jarraud). Participation aux réunions du comité exécutif (1 fois / mois) en distanciel

**DGS/DGPR – et Santé Publique France** – implication dans l'étude LEGIODOM. Santé publique France a été chargée par la DGS de la mise en place de l'étude LEGIODOM qui vise à explorer la part potentielle des légionelloses due aux contaminations à domicile (via les réseaux de distribution d'eau) (PNSE4). Suite aux premiers échanges sur ses modalités, il a été décidé que cette étude serait coordonnée par le CNR-L en collaboration avec la Direction des maladies infectieuses de SpF et l'appui de la Direction générale de la santé (DGS). Un comité d'appui technique composé d'une dizaine d'experts a été constitué pour participer à l'élaboration du montage et du suivi de cette étude (voir chapitre 3.1.9). Des contacts très réguliers pour mettre en place cette étude ont eu lieu en 2022.

**DGAL** – Réunion d'information avec SpF sur les cas de légionellose à *L. longbeachae* et les modes de contamination via les terreaux et lors du jardinage. La demande nous a été faite de tester différents terreaux et individuellement les composants de ces terreaux, notamment des écorces d'arbre.

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

Pas en 2022

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

#### \* Identification de Biomarqueurs pour le diagnostic ou le pronostic des légionelloses (ProgLegio)

L'étude ProgLegio, étude nationale interventionnelle prospective (NCT03064737) dont le CNR est coordinateur a pour objectif d'identifier des marqueurs bactériens et d'hôte associés à l'évolution péjorative de la légionellose. Cette étude a démarré en 2017, en Juin 2023, 200 patients avaient été inclus. Le critère de sévérité choisis est la ventilation mécanique à l'inclusion. Au cours de l'année 2022 (publication en cours en 2023) nous avons montré pour les 100 premiers patients que les légionelloses sévères sont marquées par une charge bactérienne pulmonaire (taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons) en phase initiale significativement supérieurs aux autres patients ; un taux de transition d'ADN et de LPS de *Legionella* sérique supérieur ; une hyperinflammation (augmentation de production significative de 7 cytokines parmi 19 recherchées pour les patients les plus sévères) associée à une immunoparalysie (altération fonctionnelle des cellules de l'immunité, non capable de répondre à un stimulant). La mise en évidence d'une immunoparalysie, comme cela est décrit pour le sepsis, est une première étape pour envisager des études ultérieures sur l'intérêt de traitement plus personnalisé immunostimulant pour les patients les plus sévères. De façon intéressante nous avons identifié la détection de LPS dans le serum à J0 comme un bon biomarqueur pronostique d'une ventilation mécanique à J8, supérieur au score SOFA à J0.

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

#### Publications nationales

1. Jarraud S, Lawrence C. *Legionella* spp. , Remic 7ème édition 2022

#### Publications internationales

1. Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila* detected by a multiplex polymerase chain reaction assay and confirmed by serology. Jovanovic, M, Mitrovic N, Beraud L, Trboljevac N, Milošević B, Spurnić A, Jovanovic S, Marić D. European Journal of Inflammation, 2022.
2. Detection of highly macrolide-resistant *Legionella pneumophila* strains from a hotel water network using systematic whole-genome sequencing. Ginevra C, Beraud L, Pionnier I, Sallabery K, Bentayeb H, Simon B, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Campese C, Jarraud S, Descours G. J Antimicrob Chemother. 2022 Jul 28;77(8):2167-2170. doi: 10.1093/jac/dkac173.
3. Genome analysis of *Legionella pneumophila* ST23 from various countries reveals highly similar strains. Ricci ML, Fillo S, Ciammaruconi A, Lista F, Ginevra C, Jarraud S, Girolamo A, Barbanti F, Rota MC, Lindsay D, Gorzynski J, Uldum SA, Baig S, Foti M, Petralito G, Torri S, Faccini M, Bonini M, Gentili G, Senatore S, Lamberti A, Carrico JA, Scaturro M. Life Sci Alliance. 2022 Mar 2;5(6):e202101117. doi: 10.26508/lsa.202101117. Print 2022 Jun.
4. Non-*Legionella pneumophila* serogroup 1 pneumonia: Diagnosis of a nosocomial legionellosis with the Biofire Pneumonia plus panel. Courboules C, Dournon N, Lawrence C, Noussair L, Descours G, Sivadon-Tardy V, Jarraud S, Herrmann JL, Gaillard JL, Espinasse F, El Sayed F, Roux AL. IDCases. 2022 Mar 25;28:e01487. doi: 10.1016/j.idcr.2022.e01487. eCollection 2022.
5. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. Rousseau C, Ginevra C, Simac L, Fiard N, Vilhes K, Ranc AG, Jarraud S, Gornes H, Mouly D, Campese C. Int J Environ Res Public Health. 2022 Jan 20;19(3):1119. doi: 10.3390/ijerph19031119.
6. Case report: A prosthetic valve endocarditis caused by *Legionella bozemanii* in an immunocompetent patient. Fraz MSA, Dahle G, Skaug KM, Jarraud S, Frye S, Bjørnholt JV, Nordøy I. Front Med (Lausanne). 2022 Nov 3;9:1055465. doi: 10.3389/fmed.2022.1055465.
7. TNF- $\alpha$  response in macrophages depends on clinical *Legionella pneumophila* isolates genotypes. Guillemot J, Ginevra C, Allam C, Kay E, Gilbert C, Doublet P, Jarraud S, Chapalain A. Virulence. 2022 Dec;13(1):160-173. doi: 10.1080/21505594.2021.2022861.

#### Communications nationales orales

1. Détection de *Legionella pneumophila* résistante aux macrolides dans un réseau d'ECS : rôle du WGS. Descours G, Beraud L, Pionnier I, Sallabery K, Bentayeb H, Simon B, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Campese C, Jarraud S, Ginevra C. 17<sup>ème</sup> Congrès National de la SFM, Montpellier, Octobre 2022.
2. Détection de *Legionella pneumophila* résistante aux macrolides dans un réseau d'ECS : rôle du WGS. Ginevra C, Beraud L, Pionnier I, Bentayeb H, Simon B, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Jarraud S, Descours G. Congrès National de la SF2H, Lyon, Juin 2022.
3. La charge en ADN et en LPS sérique de Legionella et le profil cytokinique comme potentiels biomarqueurs pronostics des légionelloses, Microbes 2022, Jarraud S. SFM Montpellier Sept 2022
4. Altérations fonctionnelles protéiques et transcriptionnelles des cellules immunitaires chez les patients atteints de Légionellose, Camille Allam, William Mouton Hugo Testaert, Chloé Albert-Vega, Christophe Ginevra Marine Ibranosyan, Ghislaine Descours, Laetitia Beraud Annelise Chapalain, Florence Ader, Gerard Lina Sophie Assant, Sophie Jarraud. Microbes 2022, SFM Montpellier Sept 2022

### **Communications nationales affichées**

1. Epidemiology of French *Legionella longbeachae* isolates over 20 years. Ginevra C, Allam C, Ibranosyan M, Descours G, Beraud L, Jarraud S. 17<sup>ème</sup> Congrès National de la SFM, Montpellier, Octobre 2022.
2. Amplicon-based next-generation sequencing revealed co-infections by several *Legionella* species. Ginevra C, Beraud L, Allam M, Descours G, Jarraud S. 17<sup>ème</sup> Congrès National de la SFM, Montpellier, Octobre 2022.
3. Sequential culture of respiratory samples highlighted a triple infection by *Legionella pneumophila*. Ginevra C, Beraud L, Allam M, Ibranosyan M, Descours G, Jarraud S. 17<sup>ème</sup> Congrès National de la SFM, Montpellier, Octobre 2022.
4. Culture-free genome comparison using shotgun deep sequencing. Ginevra C, Beraud L, Allam M, Ibranosyan M, Descours G, Jarraud S. 17<sup>ème</sup> Congrès National de la SFM, Montpellier, Octobre 2022
5. Bactéricidie du sérum vis-à-vis de souches cliniques de Legionella pneumophila sérogroupe 1 souche, complément et anticorps dépendante, C. Allam, M. Ibranosyan, A. Bolon, G. Descours, N. Fessy, J. Chastang, L. Beraud, M. Pilon, C. Ginevra, S. Jarraud. Microbes 2022, SFM Montpellier Sept 2022

### **Communications Internationales orales**

1. Sequential culture of respiratory samples highlighted a triple infection by *Legionella pneumophila*. Ginevra C, Beraud L, Allam C, Ibranosyan M, Descours G, Jarraud S, *Legionella 2022*, International congress, Yokohama, Japan, Septembre 2022.
2. Amplicon-based next-generation sequencing revealed co-infections by several *Legionella* species. Lannes J, Beraud L, Allam C, Ibranosyan M, Descours G, Jarraud S, Ginevra C. *Legionella 2022*, International congress, Yokohama, Japan, Septembre 2022.
3. *Legionella* macrolide resistance: From myth to reality. Ginevra C, Beraud L, Pionnier I, Sallabery K, Bentayeb H, Simon B, Allam C, Chastang J, Ibranosyan M, Decroix V, Campese C, Jarraud S, Descours G, *Legionella 2022*, International congress, Yokohama, Japan, Septembre 2022.
4. WGS-based detection of *Legionella* antibiotic resistance. Ginevra C. ESGLI Webinar, 22th March 2022

### **Communications Internationales affichées**

1. Epidemiology of French *Legionella longbeachae* isolates over 20 years. Ginevra C, Allam C, Ibranosyan M, Descours G, Beraud L, Jarraud S. *Legionella 2022*, International congress, Yokohama, Japan, Septembre 2022.
2. Characterisation of the lung virome in patients with Legionnaires' disease. Ibranosyan M, Ginevra C, Simon B, Destras G, Regue H, Allam C, Beraud L, Bal A, Descours G, Josset L, Jarraud S. Poster présenté à l'oral à la 6th International Conference on Clinical Metagenomics (ICCMg), 21-22 Octobre 2021, online.
3. Culture-free genome comparison using shotgun deep sequencing. Ginevra C, Beraud L, Allam C, Ibranosyan M, Descours G, Jarraud S, *Legionella 2022*, International congress, Yokohama, Japan, Septembre 2022.
4. Culture-free genome comparison using shotgun deep sequencing. Christophe GINEVRA, Laetitia BERAUD, Camille ALLAM, Marine IBRANOSYAN, Ghislaine DESCOURS and Sophie JARRAUD. 10th International Conference on Legionella, Yokohama, Japon Sept 2022
5. Development of Alternative flaA Primers for the Sequence-based Typing of Legionella pneumophila. Tahmina Rahman, Chris Corbin, Jessica Day, Natalia Kozak-Muiznieks, Marisa Scaturro, Maria Luisa Ricci, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud, Vicki Chalker and Baharak Afshar. 10th International Conference on Legionella, Yokohama, Japon Sept 2022
6. Legionella pneumophila pulmonary and serum DNA and serum Lipopolysaccharide as prognostic biomarkers of Legionnaires' disease severity. Camille Allam, Fabien Subtil, Noémie Fessy, Ghislaine Descours, Laetitia Beraud, Marine Ibranosyan Christophe Ginevra, Benjamin Youenou, Gerard Lina, Florence Ader, Sophie Jarraud. 10th International Conference on Legionella, Yokohama, Japon Sept 2022

7. Droplet digital PCR (Bio-Rad) for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in water samples. Laurie Del Valle, Laetitia Beraud, Camille Allam, Ghislaine Descours, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud. 10th International Conference on Legionella, Yokohama, Japon Sept 2022

#### **Conférences sur invitation à des congrès nationaux**

1. Performance des tests détectant les antigènes urinaires pour le diagnostic des légionelloses. Descours G. 5<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Biologie Médicale, 6 octobre 2022, Saint-Etienne.
2. Légionellose : diagnostic et thérapeutique, Jarraud S. ColBVH 2022, Juin 2022 ASIEM Paris

#### **Conférences sur invitation à des congrès Internationaux**

1. Towards new immunotherapy strategies for the treatment of severe Legionnaires' disease? Jarraud S. 10th International Conference on Legionella, Yokohama, Japon Sept 2022
2. Diagnostic improvements in legionellosis, Jarraud S. ECCMID Lisbonne April 2022

## **7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux**

---

#### Coopération avec les laboratoires environnementaux.

Nous avons travaillé avec 66 laboratoires en 2022.

\*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 :

Réunion CNR et ARS-ARA sur les études légionelles réalisées en ARA – Siège de l'ARS à Lyon, 30 Sept 2022.

Visioconférence avec les ARS-ARA et SpF pour l'investigation environnementale de la distribution de la souche hautement résistante aux macrolides isolées dans un hotel. 11 Février 2022.

\* 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

---

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

\***poursuivre les actions pour 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 et/ou hospitalisés en unités de soins intensifs. Ces actions se font à différents niveaux : communication des données du CNR et information ; évaluation de réactifs ou méthode.

\***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 2023.

### \* SUR LE PLAN DE LA SURVEILLANCE

Le NGS est maintenant l'approche généralisée au CNR avec le séquençage de toutes les souches (plus de 1000 par an) permettant de répondre aux différentes questions/objectifs du CNR :

- d'investigation des cas de légionellose et d'épidémiologie globale,
- de veille de la résistance aux antibiotiques systématique,
- de l'identification de nouvelles espèces de *Legionella*,
- de la caractérisation des populations de *Legionelles* 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 *Legionelles* présentes dans un même échantillon.

\*Dans les années à venir (travaux déjà en cours), l'objectif est le **typage des *Legionella* par séquençage directement à partir d'échantillons pulmonaires ou de prélèvements environnementaux** en absence de souches. Plusieurs stratégies sont envisagées : Enrichissement par capture *Legionella* spécifique, prétraitement du prélèvement pour minimiser la quantité de cellules humaines avant l'extraction (Lyse/centrifugation différentielle, traitement DNase), déplétion en ADN humain via immunocapture de l'ADN eucaryote méthylé, dégradation spécifique de l'ADN humain via un système CRISPR/cas9. Le point crucial étant l'enrichissement du prélèvement en acides nucléiques de *Legionella* par élimination des acides nucléiques notamment humain pour les échantillons pulmonaires.

\* sur le plan de la **résistance aux antibiotiques**. Suite à la découverte d'une souche de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 hautement résistante aux macrolides dans le réseau d'eau d'un hôtel, des études sont en cours (cf 3.5).

\*Amélioration de la **base 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 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, **étude LEGIODOM** (voir chapitre 3.1.9).

\* **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 patients non sévères.

\* **Compréhension des infections persistantes**. 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. La technique REPTIS a été mise au point au CNR en 2022, elle devrait permettre l'étude d'un panel de souches cliniques, et l'éventuelle identification de fonds génétiques plus enclins à être associés à la génération de persisters (travaux en cours).

### \*Etude de l'impact des biocides sur *Legionella* et conséquences pour la physiopathologie de l'infection

*Legionella* est une bactérie de choix pour l'étude de l'impact des biocides dans le domaine des Maladies Infectieuses en raison d'une multi-exposition aux biocides, dans son habitat naturel environnemental en amont de l'infection, puis chez l'Homme, hôte accidentel chez lequel la présence de biocides est très fréquemment détectée dans les liquides biologiques (urines, sérum) à des concentrations similaires à celles observées dans l'environnement. En ce sens, nous souhaitons développer une meilleure compréhension de leur impact sur *Legionella*.

Les objectifs du projet sont de caractériser, pour la première fois, la sensibilité d'une grande cohorte d'isolats cliniques et

environnementaux de légionelles de différentes espèces et sérogroupes à différents biocides (triclosan, pesticides, phtalates).

En lien avec notre équipe de recherche, nos objectifs sont également ;

- d'identifier les réponses adaptatives de la bactérie de certains de ces isolats aux biocides par des expériences d'évolution expérimentale consistant à exposer de façon prolongée la bactérie à des doses faibles et constantes ou croissantes de biocides seuls et en association ;
- d'appréhender l'impact des biocides sur plusieurs paramètres du cycle d'infection de Legionella : prolifération dans l'environnement au contact des amibes, formation de biofilm, infectiosité pour les cellules humaines, induction d'une réponse inflammatoire, profil de sensibilité aux antibiotiques.

Ce projet intègre pour la première fois la problématique de micropollution environnementale par les biocides dans un objectif de compréhension globale de la physiopathologie de la légionellose, en adéquation avec le concept One Health. A plus long terme, les résultats obtenus, confrontés à des données d'exposome (mode de vie, données de micropollution par PE du territoire de l'habitat du patient de type dosages de PE dans l'eau de distribution au robinet ou les sols, dosages de PE dans les liquides biologiques tels que l'urine du patient), pourraient permettre une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la légionellose (émergence de clones, répartition géographique en fonction des territoires et de leurs caractéristiques écologiques) et de sa sévérité chez certains patients.

Projet en collaboration avec J. verdon (équipe MHE, CNRS UMR7267, Université de Poitiers) et J. Lemoine (équipe ANABIO-MS, ISA, Université Claude Bernard Lyon 1).

## 9. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

---

### 9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

#### 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,
- 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,.....

### 9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

#### Personnels affectés au CNR et Organigramme

Les missions du CNR des *Legionella* sont assurées depuis Janvier 2023 par une co-direction assurée par Sophie Jarraud et Ghislaine Descours. 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 dans le Tableau 7.

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

**Tableau 7.** Personnels affectés à l'activité du CNR des Légionelles.

Noms et qualifications	Coordonnées
<b>Sophie Jarraud (directrice)</b> PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 38 <a href="mailto:sophie.jarraud@chu-lyon.fr">sophie.jarraud@chu-lyon.fr</a>
<b>Ghislaine Descours (directrice adjointe)</b> PH - IAI MCU - Faculté de Pharmacie Lyon	Tél : 04 72 07 16 50 <a href="mailto:ghislaine.descours@chu-lyon.fr">ghislaine.descours@chu-lyon.fr</a>
<b>Florence Ader (infectiologie)</b> PH - Service des maladies infectieuses PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 15 60 <a href="mailto:florence.ader@univ-lyon1.fr">florence.ader@univ-lyon1.fr</a>
<b>Laetitia Beraud (qualité)</b> PH - IAI	Tél : 04 72 07 18 44 <a href="mailto:laetitia.beraud@chu-lyon.fr">laetitia.beraud@chu-lyon.fr</a>
<b>Marine Ibranosyan</b> AHU – IAI Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 71 <a href="mailto:marine.ibranosyan@chu-lyon.fr">marine.ibranosyan@chu-lyon.fr</a>

<b>Christophe Ginevra (Biologie moléculaire et cellulaire, Bio-informatique)</b> Ingénieur IAI HCL	Tél : 04 72 07 16 27 <a href="mailto:christophe.ginevra@chu-lyon.fr">christophe.ginevra@chu-lyon.fr</a>
---	--

<b>Techniciens (Hospices Civils de Lyon)</b>
Joelle Chastang
Lucie Chaverot
Aurélie Marie
Jeremy Reboulet
Isabelle Royet
Marielle Siffert

<b>Cadre</b>	
Laetitia Dubost	<a href="mailto:laetitia.dubost@chu-lyon.fr">laetitia.dubost@chu-lyon.fr</a>

<b>Secrétaires</b>	Tél : 04 72 07 11 45 Fax : 04 72 00 37 54
Manon Robert	<a href="mailto:manon.robert01@chu-lyon.fr">manon.robert01@chu-lyon.fr</a>
Blandine Bavitot	<a href="mailto:blandise.bavitot@chu-lyon.fr">blandise.bavitot@chu-lyon.fr</a>

H : hospitalier, U : universitaire

### 9.3 Locaux et équipements

#### *Surface des locaux - plan*

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

- le R+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.

#### *Etage des CNR de Bactériologie*

Sans être un laboratoire autonome au sein du bâtiment, cet étage a été conçu d'emblée pour héberger les activités des CNR de Bactériologie, incluant les approches conventionnelles et de biologie moléculaire (cf plan – Figure 19). 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 des plateaux de Biologie Moléculaire (R+4) et de la plateforme GenePII, ainsi que de 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 est toujours joignable.

Les membres du CNR sont pour la plupart membre de l'équipe Pathogénie des Légionelles (LEGIOPATH) localisée sur le site de Gerland (Centre International de Recherche en Infecitologie, CIRI, Lyon) qui ne comporte pas de secteur spécifique pour le CNR des Légionelles. L'activité de l'équipe 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 l'équipement de la plateforme de séquençage GENEPii conjointement avec les autres CNRs de l'IAI (CNR des virus respiratoires, des Enterovirus et des Staphylocoques) : un starlet (Hamilton) pour l'aliquotage, 1 extracteur haut débit Sp960 (MGI), un extracteur bas débit Maxwell (Promega), 1 DremPrep (Tecan), 2 Dragonfly (SPTLabtech), 3 Mosquito HV (SPTLabtech) et un Epimotion (Eppendorf) pour la préparation des librairies, un Qubit (ThermoFisher) et une TapeStation (Agilent) pour la quantification et la qualification des librairies, un Nextseq 550, un Novaseq 6000 (Illumina®) et un GridION (Nanoporetech) pour le séquençage des librairies. Le CNR a également en interne un extracteur Maxwell (Promega) et un séquenceur MinION (Nanoporetech).

Il dispose également d'appareils de PCR en temps réel (QuantStudio et autres...), de nombreux thermocycleurs conventionnels, de hottes à flux laminaire et de 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, 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. Le CNR a également accès à un laboratoire de niveau L3 si nécessaire pour mener des travaux de recherche.

### Moyens informatiques

La plateforme Genepii possède également les ressources pour l'analyses et le stockage des données générées avec plusieurs serveurs de calcul et plusieurs serveurs de stockage sécurisé, le tout localisé et géré au niveau de la direction de l'informatique des Hospices Civils de Lyon (DSN). La plateforme dispose également d'un accès sécurisé à un cluster de calcul haute capacité (Université de Grenoble) et un groupe bioinformatique composé de bioinformaticiens, de biostatisticiens et de biologiste développant conjointement des outils d'analyses mutualisés pour les différents services. Le CNR a accès à cette plateforme et plusieurs applications de ces technologies sont actuellement en développement au CNR.

Concernant 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 des serveurs sécurisés à la DSN des Hospices Civils de Lyon.

## 9.4 Collections de matériel biologique

### 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 8.

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

**Tableau 8.** Modalités de stockage de la collection du CNR.

TYPE D'ECHANTILLON	Conservation	T°	Durée
<b>Tout prélèvement « important »</b>	Tubes NUNC	-20°	Infinie
<b>LBA, LCR, Hémoc, Biopsie,...</b>			
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
<b>Urines positives et importantes</b>	Tube stérile à hémolyse	-20°C	Infinie
<b>Sérums positifs et intéressants</b>	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
<b>Souches extérieures</b>	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
<b>Terre, Boue,...</b>	Contenant d'origine	+5°	1 mois
<b>SOUCHES</b>			
<b>CLINIQUES :</b>	1 émulsion dans sang de mouton	-80°C	Infinie
<b>- reçues d'un laboratoire extérieur</b>	1 émulsion sur billes		
<b>- 1ère colonie isolée d'un prélèvement clinique</b>	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
<b>CLINIQUES :</b>	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie

- colonie 2 à 5 si disponible			
<b>ENVIRONNEMENTALES</b>	2 émulsions sur billes mises chacun dans un congélateur différent	-20°C -80°C	3 ans
<b>REFERENCE</b>	3x5 émulsions sur billes 1 émulsion dans sang de mouton	-80°C -20°C	Infinie
<b>EAUX</b>	1 émulsion sur billes	-20°C	3 ans
<b>ADN</b>			
<b>ADN de souches</b>	Microtubes	-20°C	Infinie
<b>ADN de prélèvements</b>	Microtubes	-20°C	Infinie
<b>ADN des eaux</b>	Microtubes	-20°C	1 an

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*

Compte tenu de l'importance de la collection, le CNR peut mettre à disposition un large éventail de souches et de prélèvements. Il dispose de l'ensemble des espèces et des sérogroupes de légionelles décrites.

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

Ces collections sont accessibles gracieusement (avec participation aux frais de préparation et d'expédition) après accord et signature de la lettre d'agrément pour le transfert du matériel du CNR des légionelles qui figure en annexe 6.

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/vérification et sous le seul jugement des responsables du CNR (en conformité avec le décret n° 2007-1220 du 10 août 2007). A titre d'exemple, nous avons été sollicités par le CNR de Norvège pour échanger des échantillons de sérums (15 sérums d'intérêt envoyés et 4 sérums d'intérêt reçus) dans le but de réaliser la vérification de leur méthode de screening. Ce premier échange initié en 2022 pourra être suivi les prochaines années afin d'assurer le suivi des méthodes utilisées par nos deux laboratoires.

Lors des évaluations de kits au CNR, l'utilisation d'échantillons de patients doit être précéder de la sollicitation de l'avis scientifique et éthique du Comité d'Ethique scientifique des HCL et de la mise en conformité avec la recherche n'impliquant pas la personne humaine (RIPH) de la catégorie « Recherche sur données », le cas échéant.

#### *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) (n=109 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale caractérisées par leur identification phénotypique, leur profil en champ pulsé, leur profil en Sequence Based Typing ou en AP-PCR (n=35 665 souches)
- souches d'origine clinique et environnementale séquençées (n=3046)

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 : près de 9500.

Collection de prélèvements pulmonaires de patients atteints de légionellose : plus de 8000

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

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

<b>Collection ou stockage échantillons</b>	<b>Nombre approximatif d'échantillons</b>	<b>conditions de conservation température</b>
Sérums	9876	-20°C
Souches patients	8427	-20°C et -80°C
Souches environnementales	30152	-20°C et -80°C
Souches de référence	206	-20°C et -80°C
Sérums de lapins immunisés	4 310	-20°C
Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
Prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	9625	-20°C
Urines	1502	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	7543	-20°C

## 9.5 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, l'identification et le typage (ST) des souches de *Legionella* isolée ou reçues au CNR ; l'antigénurie *Legionella* par immunochromatographie et ELISA ; et la sérologie *Legionella* par ELISA et IF. 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 20).

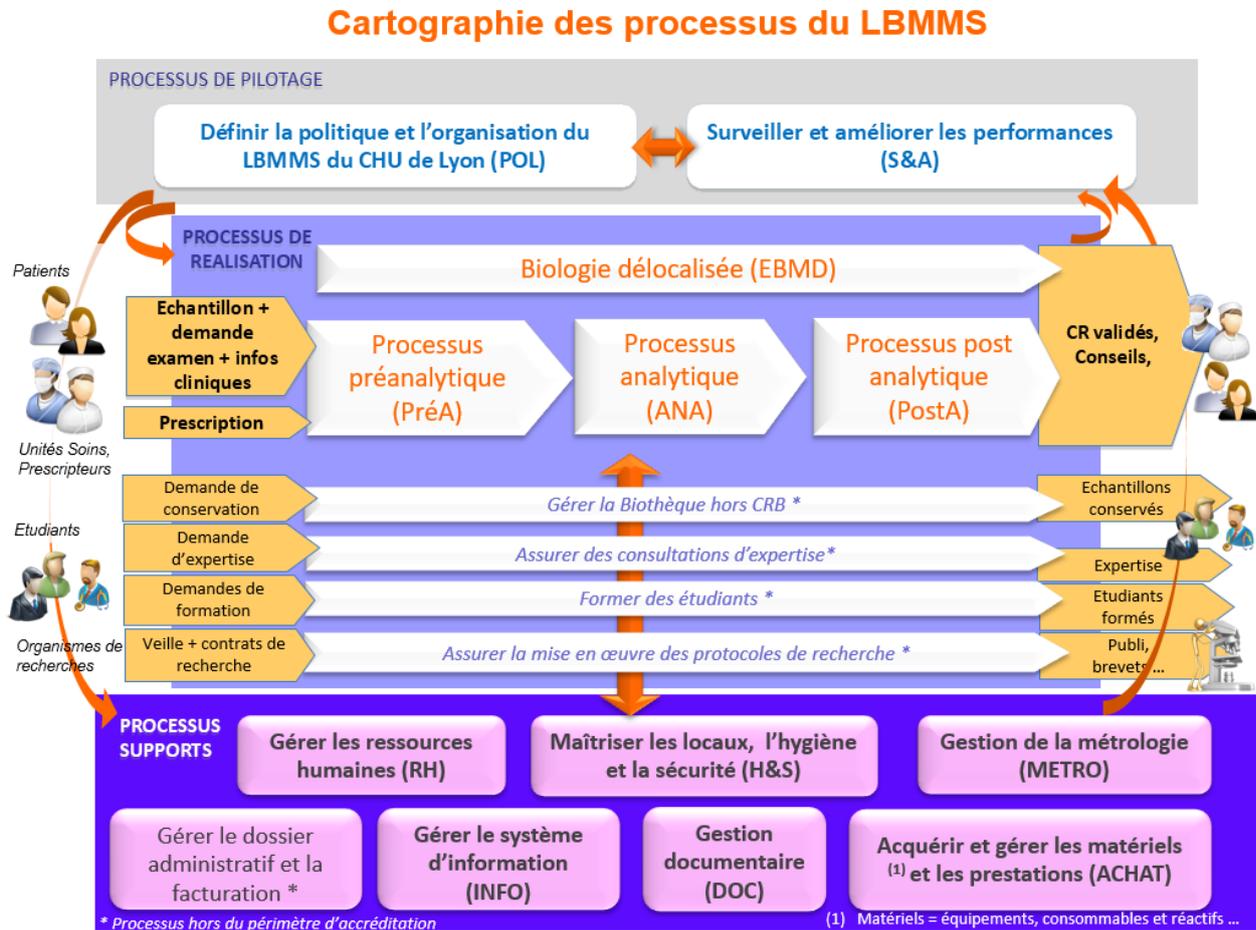


Figure 20. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).

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 21 représente un extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valable au 31 octobre 2022).

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.

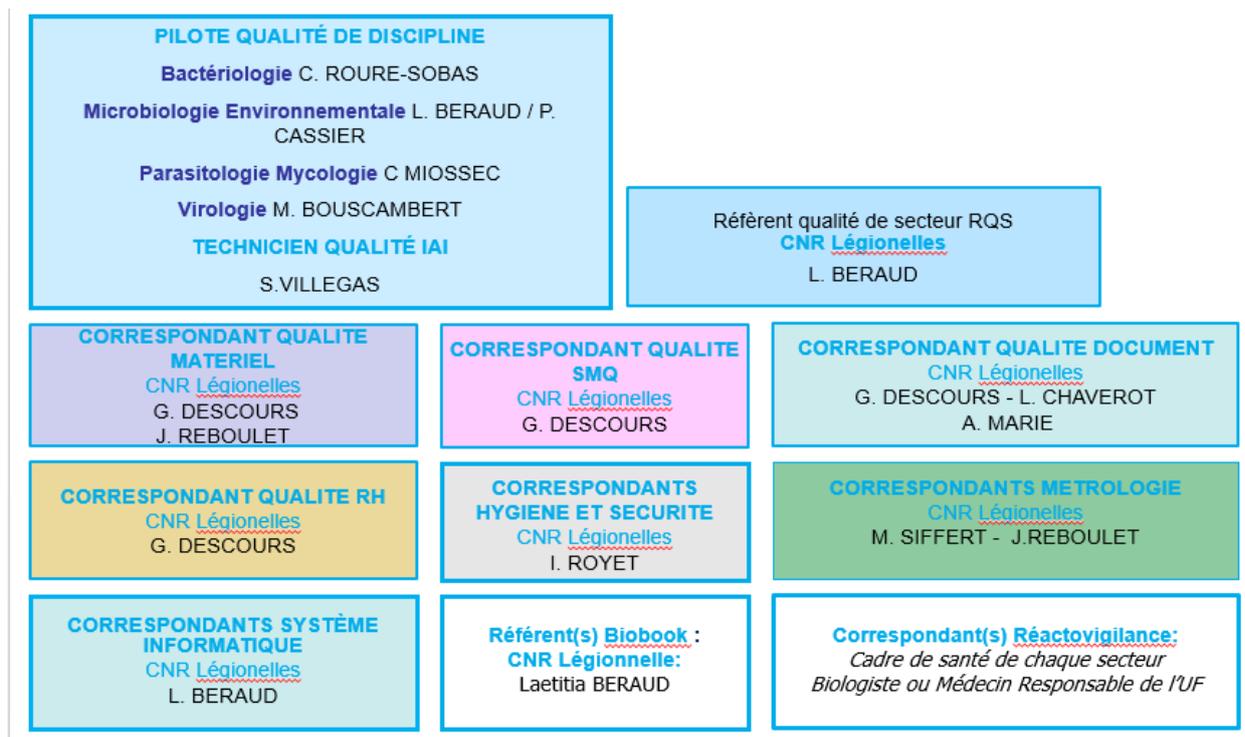


Figure 21. Extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

### Evaluation Externe de la Qualité (EEQ)

Le CNR participe à des campagnes d'EEQ pour l'ensemble de ses techniques accréditées. Les 3 techniques d'antigénurie *Legionella* sont suivies par les EEQ Aglae (3 échantillons, 2 fois par an) depuis 2019. Cet EEQ présente l'avantage de fournir un volume suffisant d'urines pour tester les 3 méthodes dans différentes conditions, notamment sur urines concentrées pour les tests acceptant ce pré-traitement. Les techniques de sérologies sont suivies depuis 2019 grâce à l'EEQ RCPAQAP (2 échantillons, 2 fois par an). La mise en place d'EIL (Echange Inter Laboratoire) avec des CNR d'autres pays européens pour ces techniques d'expertise a été initiée entre le CNR français et norvégien en 2022 mais ne s'est pas avéré suffisamment contributive et sa réalisation a été suspendue pour l'instant. Après un essai encouragé par l'ECDC en 2015, QCMD est utilisé pour le suivi des PCR *Legionella* depuis 2017 (10 échantillons, 1 fois par an). Ces échantillons permettent un suivi de nos 3 techniques de PCR (Diagenode ciblant *L.spp* et *Lp*, ESGLI ciblant *Lp* et *Lp1* et la PCR *Lp1* maison), ainsi que du typage directement sur prélèvement par 23s-5s et par nested-SBT. Enfin, depuis 2019, le CNR participe à un EEQ promu par l'ECDC réalisé 2 fois par an et simulant une enquête environnementale. Dans le cadre de ce programme, le CNR reçoit des prélèvements (urines et respiratoires) de 10 supposés patients et 10 échantillons environnementaux. Ces échantillons permettent un contrôle des techniques d'antigénurie, de PCR et de culture puis la comparaison des souches isolées des prélèvements respiratoires et environnementaux permet un suivi des techniques de typage (Sequence Type, cgMLST et phylogénie).

Pour le suivi de ses techniques sur prélèvements d'eau, le CNR participe depuis 2009 à l'EEQ recherche de *Legionella* par PCR d'Aglae (2 échantillons, 2 fois par an) et depuis 2010 à l'EEQ recherche de *Legionella* dans les eaux propres en culture de PHE (2 échantillons 4 fois par an).

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 accordé leur confiance au CNR et leurs rapports ont permis le maintien de l'accréditation (dernier audit 17025 effectué en juin 2022 et dernier audit 15189 effectué en janvier 2022).

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 formés à l'audit et donnent

lieu à des rapports qui nous permettent de mettre en place des actions d'amélioration. En 2022, un audit technique a été réalisé concernant le typage des souches de *Legionella*, ainsi qu'un audit de la gestion de la métrologie sur l'ensemble du secteur.

### **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 (183 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**

Le CNR répond aux exigences en étant accrédité pour au moins un examen représentatif (ER) de chaque ligne de portée. 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. Le CNR travaille au maintien de ce niveau élevé d'accréditation en réalisant les gestions de portée nécessaires à chaque changement de technique. En 2022, le CNR a changé sa technique d'extraction. En 2023, des changements dans la mise en culture seront réalisés, ainsi que la mise en place de nouvelles techniques de PCR. L'accréditation sera maintenue.

## 10. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

### 10.1 Liste des techniques de référence

#### Méthodes pour le diagnostic des légionelloses

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

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

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

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

H. Hannetel, J.V. Reynaud, C. Kolenda, A.G. Ranc, L. Beraud, C. Ginevra, S. Jarraud, G. Descours. Communication orale, 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* ont ainsi été re-préparés par le CNR en 2022.

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

Utilisation du réactif Diagénode® (*Legionella* species and *Legionella pneumophila* Real-time PCR) sur LightCycler\*\*\*. En 2023, cette PCR sera abandonnée au profit d'une PCR maison adaptée de la publication Templeton *et al.* ; J Clin Microbiol 2003.

- **PCR Lp/Lp1 en temps réel** multiplexe, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al.* ; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015) sur RotorGene

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. Son transfert sur QuantStudio est en cours.

- **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* à partir de prélèvements

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

\*\*\*Le CNR est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 pour la recherche de *Legionella* par culture et identification de souches depuis 2020, pour la recherche par PCR depuis 2017, pour le diagnostic par détection d'antigènes urinaires depuis 2019, pour le sérodiagnostic par ELISA depuis 2019 et pour le sérodiagnostic par IF depuis 2022 (accréditation COFRAC n°8-3442).

#### Méthodes d'identification des légionelles

- **Identification phénotypique**\*\*\* des sérogroupes des *L. pneumophila* par immunofluorescence ou ELISA à l'aide des Ac monoclonaux de Dresden (mise à disposition par Christian Lück, CNR des Légionelles, Dresden, Allemagne) ; agglutination de particules de latex sensibilisés à l'aide de réactifs commercialisés (Oxoid, Prolab) ; immunofluorescence

directe grâce aux immun-sérums polyclonaux de lapin préparés par le CNR de toutes les espèces et sérogroupes de légionelles.

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

- Identification génotypique des *L. non pneumophila* par **séquençage du gène mip** et comparaison de la séquence à la base de données disponible sur le site EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)) et par amplification et **séquençage de l'espace intergénique 23S-5S**.
- Identification des *Legionella* par la méthode **MALDI-TOF-MS\*\*\***. Le CNR dispose actuellement de MALDI-TOF (VITEK 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<sup>ème</sup> RICA 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, fluoroquinolones 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\*\*\*
- 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®)\*\*\*

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...)

## 10.2 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 : obtention du Sequence Type (ST)<sup>\*\*\*</sup>, 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)

**\*\*\*Le CNR est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 pour la la détermination du ST des souches de *Legionella* à partir des données de WGS depuis 2022 (accréditation COFRAC n°8-3442).**

### 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.

## 10.3 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 22.

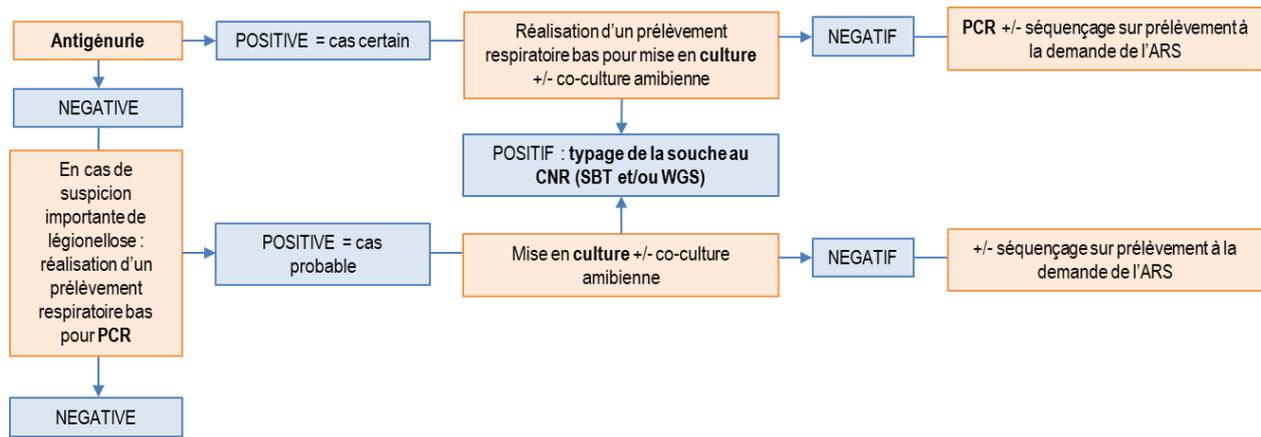


Figure 22. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.

- 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.

- PCR

Elle fait partie des critères de définition d'un cas de légionellose. Cette méthode sera employée en cas d'antigénurie négative et de suspicion de légionellose ou en 1<sup>ère</sup> intention. Elle recherchera si possible toutes les espèces de *Legionella* (PCR *Legionella* spp.) ou à minima tous les sérogroupes de *Legionella pneumophila*.

- Culture de prélèvements pulmonaires :

- Il est recommandé d'utiliser au moins 2 milieux : 1 BCYE (sans antibiotique) + 1 milieu BMPA ou MWY (milieux avec antibiotiques). Ces 2 milieux BMPA ou MWY sont à privilégier
- Le milieu GVPC n'est pas recommandé car de moins bonne sensibilité.
- Les milieux sont incubés en aérobiose à 35°C (+/- 2°C) pendant 10 jours en atmosphère humide pour éviter le dessèchement des géloses. Une culture en présence de 2,5% de CO<sub>2</sub> favorise la croissance de certaines espèces de légionelles mais n'est pas obligatoire. Par contre, une atmosphère avec 5% de CO<sub>2</sub> peut inhiber la croissance des légionelles.
- Le CNR souhaite **recevoir les prélèvements pulmonaires** en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive) :
  - si la culture est positive (envoi avec la souche)
  - si le laboratoire ne réalise pas la culture ou si celle-ci est négative
  - les analyses réalisées par le CNR dans un but épidémiologique ne seront pas facturées.

- Sérologie

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

- Identification

Elle est réalisable :

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

- Typage

- Whole Genome Sequencing et analyse basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) : pour

cette méthode une connaissance des génomes de *Legionella* peut être importante car cette méthode utilise le mapping des reads sur une souche de référence à identifier.

- Méthode standardisée au niveau européen : le *Sequence Based Typing*. La méthode SBT est décrite sur le lien [www.ewgli.com](http://www.ewgli.com) et peut être utilisée par tout laboratoire.

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

- Sensibilité aux antibiotiques

Les méthodes disponibles au CNR sont les suivantes :

- CMI en milieu liquide BYE
- 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.