

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Legionella

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Hospices Civils de Lyon	Pr Sophie JARRAUD

Résumé analytique	4
Executive summary	5
1. Missions et organisation du CNR	6
2. Activités d'expertise	7
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	7
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	8
2.4 Collections de matériel biologique	8
2.5 Activités d'expertises	10
2.5.1 Rôle du CNR dans le diagnostic des légionelloses	10
2.5.2 Transmission des résultats expertisés	12
2.6 Activités de séquençage	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	16
3. Activités de surveillance	17
3.1 Description du réseau de partenaires	17
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	19
3.2.1 Formes cliniques atypiques	20
3.2.2 Caractéristiques des souches cliniques analysées au CNR	21
3.2.3 Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR	25
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	26
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	26
3.4.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France	26
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
4. Alertes	30
4.1 Procédure d'alerte de Santé publique France et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal	30
4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	30
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	32
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	32
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	33
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	33
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	34
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	34
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	35

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	36
8. Programme d'activité pour les années suivantes	37
9. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	39
9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	39
9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	39
9.3 Locaux et équipements	40
9.4 Collections de matériel biologique	42
9.5 Démarche qualité du laboratoire	44
10. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	48
10.1 Liste des techniques de référence	48
10.2 Liste des techniques disponibles pour le typage, y compris en terme de séquençage génomique	50
10.3 Liste des techniques recommandées par le CNR	50

Résumé analytique

L'année 2023 a été marquée par un nombre record de cas de légionellose en France (n=2193) allant de pair avec un nombre historique de souches isolées (n=590). Fait marquant, nous avons observé une tendance à la baisse du nombre de souches cliniques de *L. pneumophila* séro groupe non 1 ou de *Legionella* non *pneumophila* isolées (10,3% versus 12,8% en 2022), pouvant témoigner d'une stabilisation de l'implémentation des méthodes diagnostiques multiplexes dans nos laboratoires partenaires.

Le CNR isole une part importante des souches de *Legionella* en France, correspondant à 2/3 des souches en 2023 ; il a réceptionné un nombre croissant de prélèvements pour culture (+25% par rapport à 2022) et pour PCR (+15% par rapport à 2022) soulignant la possible diminution du nombre de laboratoires réalisant la culture de *Legionella* en France mais également la bonne observance des recommandations du CNR de recevoir tous les prélèvements pulmonaires en absence de souches.

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. L'intégralité des souches d'origine clinique et des souches environnementales adressées dans le cadre d'une investigation autour d'un cas (n=1090) ont été séquencées en 2023, parmi lesquelles 454 souches dans un contexte d'investigation de la source de contamination et 636 dans un contexte de surveillance. Au total 68% des investigations microbiologiques (hors cas groupés) réalisées ont permis d'identifier la source de contamination ; les réseaux d'eau sanitaire étaient la source la plus probable de contamination.

Plusieurs épisodes de cas groupés de plus de 10 cas ont été investigués en 2023 comprenant un épisode à Charleville Mezières de 15 cas et un épisode de 50 cas dans l'Oise pour lesquels la source de contamination n'a pas été identifié ; et un épisode de 11 cas associés à un établissement de tourisme à l'île Maurice et de 12 cas de fièvre de Pontiac associés à une baignade dans un Jacuzzi.

L'évaluation de la diversité des génotypes intra-patient est une question récurrente et sa complexité pourrait avoir un impact sur les conclusions des études épidémiologiques. Dans le but d'évaluer la diversité des génotypes intra-patient, nous avons séquencé de façon rétrospectives plus de 700 colonies isolées de prélèvements de 178 patients ; une microdiversité intra-patient de 1 à 10 SNPs est observée dans 8.2% des souches testées.

L'identification des sources de contamination des cas sporadiques de légionellose reste un enjeu prioritaire pour le CNR. A la demande de la Direction Générale de la Santé et de Santé publique France, le CNR coordonne le projet LEGIODOM, dont les premières inclusions démarreront en 2024, qui vise 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 year 2023 was marked by a record number of cases of Legionnaires' disease in France (n=2193) and a record number of strains isolated (n=590). We observed a decrease in clinical strains of *L. pneumophila* non-serogroup 1 or *Legionella* non-pneumophila isolated (10.3% versus 12.8% in 2022), which may reflect a stabilisation in the implementation of multiplex diagnostic methods in our partner laboratories.

The NRC isolates a significant proportion of *Legionella* strains in France, corresponding to 2/3 of the strains in 2023; it has received an increasing number of samples for culture (+25% compared to 2022) and for PCR (+15% compared to 2022), highlighting the possible reduction in the number of laboratories carrying out *Legionella* culture in France, but also good compliance with the NRC recommendations to receive all pulmonary samples in the absence of strains.

The routine implementation of WGS, with the ability to characterise the core genome (cg)ST and phylogeny of clinical and environmental isolates, means that robust conclusions can now be drawn about the source of contamination of cases. All clinical and environmental strains submitted as part of a case investigation (n=1090) were sequenced in 2023, including 454 strains as part of the source of contamination investigation and 636 as part of surveillance. A total of 68% of microbiological investigations (excluding cluster cases) identified the source of contamination; domestic water systems were the most likely source of contamination.

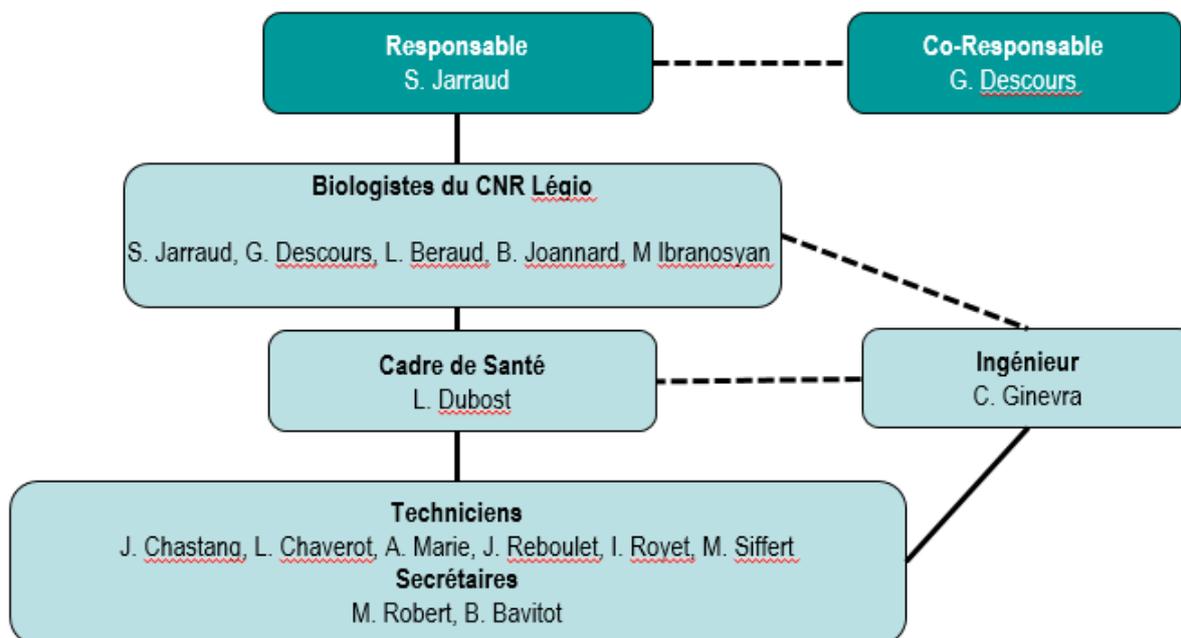
Several clusters of more than 10 cases were investigated in 2023, including an outbreak of 15 cases in Charleville Mezières and an outbreak of 50 cases in the Oise region for which the source of contamination was not identified; an outbreak of 11 cases linked to a tourist establishment in Mauritius and 12 cases of Pontiac fever linked to bathing in a jacuzzi.

The assessment of within-patient genotypic diversity is a recurring problem, and its complexity may affect the conclusions of epidemiological studies. To assess the diversity of intra-patient genotypes, we retrospectively sequenced more than 700 colonies isolated from samples from 178 patients; intra-patient microdiversity of 1 to 10 SNPs was observed in 8.2% of the strains tested.

Identifying the sources of contamination for sporadic cases of Legionnaires' disease remains a key challenge for the NRC. At the request of the Direction Générale de la Santé and Santé Publique France, the NRC is coordinating the LEGIODOM project, the first cases of which will be included in 2024. The aim of this project is to determine the exact role of the household as a source of contamination, which is not currently systematically studied.

1. Missions et organisation du CNR

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



A ces personnes s'ajoutent Florence Ader, Infectiologue au service des Maladies Infectieuses à Lyon et membre de l'équipe Legiopath, qui participe ponctuellement sur sa fonction universitaire à l'activité du CNR des légionelles.

Figure 1. Organigramme fonctionnel du CNR en 2023.

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 2023.

Sur le plan des personnels, le seul changement est l'arrivée de Brune Joannard, biologiste (assistante spécialiste), en août 2023.

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 2023, le CNR a changé de mode opératoire pour la réalisation de la PCR *Legionella* dans les eaux et obtenu l'accréditation pour cette nouvelle technique (BioRad) début 2024.

En 2023, le CNR est 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, la recherche d'antigénurie *Legionella* par technique immuno-chromatographique et ELISA et la sérologie *Legionella* par ELISA et IF.

Le dernier audit réalisé au CNR selon la norme 17025 a eu lieu en décembre 2023 et janvier 2024 et a relevé 3 écarts, tous non critiques. Le dernier audit selon la norme 15189 a eu lieu en septembre 2023 et n'a relevé aucun écart sur le secteur du CNR.

2. Activités d'expertise

Éléments clés de l'année 2023 en termes de production d'expertise

- Nombre de cas de légionellose notifiés en France historique (n=2193) avec une augmentation des demandes d'expertise sur le diagnostic des cas par PCR, +15% (hors épidémie)
- Une souche est disponible pour 26,9% des cas de légionellose (590 isolats), avec une tendance sensiblement à la hausse sur les dernières années (+5% depuis 2018) ; point important, le CNR a isolé 398 souches, soit 2/3 des souches.
- Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour culture a augmenté (+25%) par rapport à 2022, en lien avec la forte incidence de la légionellose en 2023 et la probable diminution des laboratoires réalisant la culture en France
- Nouvelle ascension du nombre de sérologie réalisée pour confirmation de diagnostic alors que le CNR encourage les laboratoires à abandonner cette méthode diagnostique
- évaluation en cours de la nouvelle chimie 14, Flowcell 10.4.1 de la technologie long reads de nanopore ainsi que les outils bioinformatique associés pour le séquençage de génome entier de *Legionella* à partir des souches isolées
- évaluation de nombreuses optimisations pour le séquençage de *Legionella* directement à partir d'échantillon pulmonaire pour les cas de légionellose culture négatif incluant notamment : la déplétion en ADN humain par l'utilisation des kits MicrobEnrichment (NEB®) et CRISPRclean-human-DNA-depletion-kit, la lyse différentielle des cellules humaines et bactériennes avec élimination de l'ADN humain par un traitement DNase, l'adaptive sampling (Nanopore) pour l'enrichissement en séquence de *Legionella* pendant le séquençage shotgun. L'association de plusieurs procédés éliminant l'ADN humains seront probablement nécessaire afin d'obtenir suffisamment de reads de *Legionella* exploitables pour obtenir l'ensemble du génome.

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

2.1 Evolution des techniques

- Mise en production et accréditation de nouvelles PCR maison ciblant *Legionella* spp, *L. pneumophila* et *L. pneumophila* séro groupe 1 pour le diagnostic de légionellose.
- Utilisation en première intention des anticorps de Dresden pour le sérogroupage des *Legionella pneumophila*
- Antibiogrammes par technique Sensititre (ThermoFisher Scientific) en remplacement de la technique « maison »

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Les travaux d'évaluation de techniques et de réactifs ont concernés principalement le NGS (Next Generation Sequencing) en 2023.

Optimisation du séquençage sur souches :

*Dans un souci de diminution des coûts et des temps de traitement, nous avons évalué une extraction rapide (Quick Extract) pour l'extraction d'ADN des souches avant séquençage. Sur un total de 619 souches testées, les performances sont inférieures à l'extraction actuelle (Maxwell Promega®). De résultats encourageant ont été obtenu en diluant l'extrait au demi, d'autres optimisations sont en cours d'étude (figure ci-dessous).

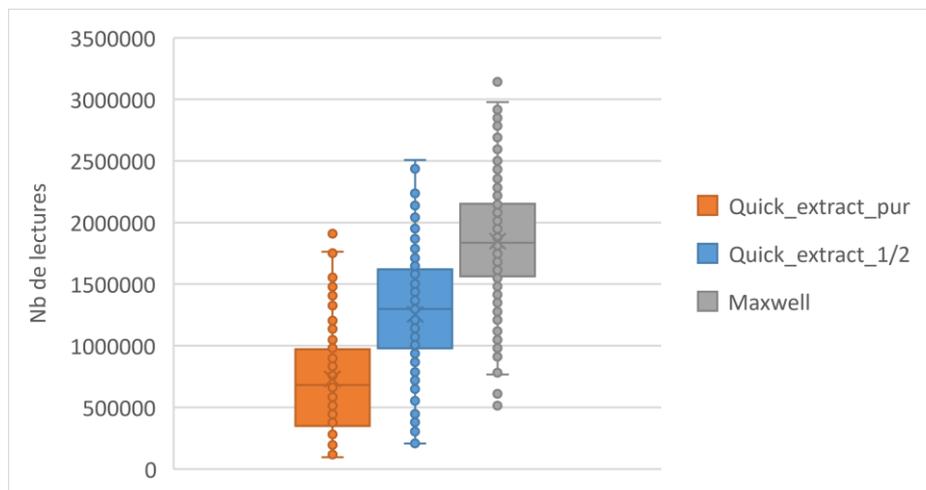


Figure. Comparaison du nombre de lecture en NGS sur des souches extraites par méthode d'extraction QuickExtract ou par l'extraction Maxwell DNA blood (Promega®).

*Les technologies long reads de type nanopore permettent d'obtenir des assemblages de meilleures qualités en termes de nombre de contigs que les technologies short reads. La technologie nanopore souffre toutefois d'un manque de précision au niveau des bases séquencées. Une nouvelle chimie plus précise est en cours d'évaluation (chimie 14, Flowcell 10.4.1), ainsi que les outils bioinformatique associés pour le séquençage de génome entier de *Legionella* à partir de souches isolées (résultats en cours d'analyses).

Séquençage de génomes de *Legionella* directement à partir du prélèvement respiratoire :

Une des problématiques du laboratoire est de typer les Légionelles chez les patients-culture négative. Pour cela différentes étapes peuvent être optimisées.

- Evaluation du protocole de T. Charalampous et al. pour le prétraitement de l'échantillon clinique avant séquençage (Charalampous T, Kay GL, Richardson H, Aydin A, Baldan R, Jeanes C, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. Nat Biotechnol. juill 2019;37(7):783-92.). Ce protocole est basé sur une lyse différentielle des cellules humaines et bactériennes avec élimination de l'ADN humain par un traitement DNase situé entre la lyse cellules humaines et la lyse des cellules bactériennes. Un enrichissement en ADN bactérien d'un facteur 2 à 3000 a pu être obtenu sur des prélèvements frais.
- Evaluation des kits de déplétion en ADN humain MicroEnrichment (NEB®) et CRISPRclean-human-DNA-depletion-kit (étude toujours en cours).
- Evaluation de l'adaptive sampling pour l'enrichissement en séquence de *Legionella* pendant le séquençage shotgun d'ADN extrait de prélèvement respiratoire (étude toujours en cours).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune technique en 2023.

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 2023 :

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

En 2023, 19 ADN étalons ont été envoyés directement par le CNR à 6 laboratoires environnementaux (Figure 2). En parallèle, l'ADN étalon est distribué par le distributeur spécialisé LGC Standard uniquement à des laboratoires à l'étranger. Nous avons envoyé 34 ADN étalon à LGC à leur demande (5 envois).

Aucun contrôle quantitatif (CQE raccordé à l'ADN étalon) n'a été envoyé en 2023.

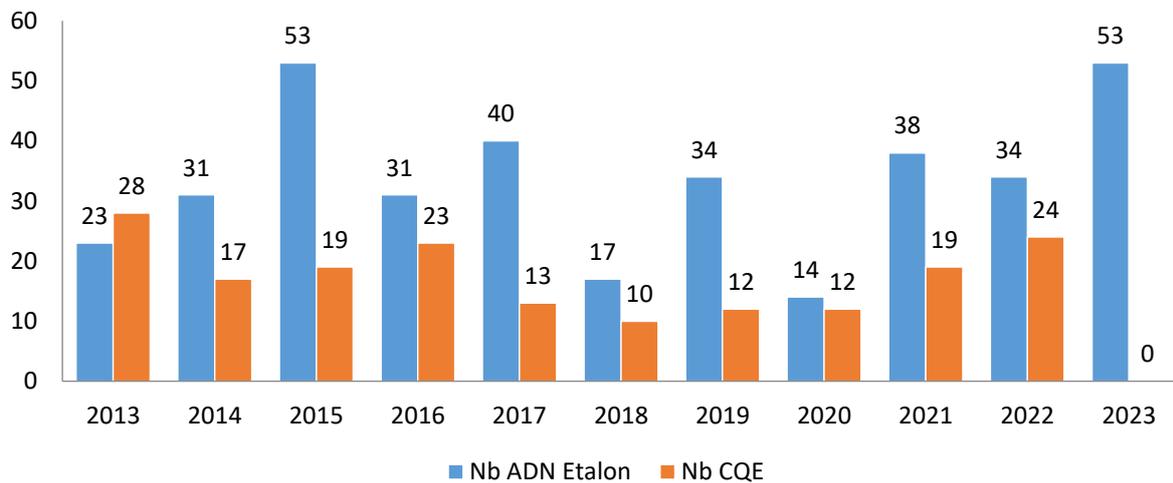


Figure 2. Nombre d'échantillons d'ADN étalon et de contrôles quantitatifs distribués entre 2013 et 2023.

- Distribution de souches de *Legionella*

Envoi d'une souche de Lp15 typée par immunofluorescence au laboratoire Aveyron Labo dans le but d'accréditer leur PCR *Legionella pneumophila*.

Envoi de 12 souches *L. pneumophila* au CNR Belge, sélectionnées pour tester leur pipeline d'analyse de WGS

2.5 Activités d'expertises

La synthèse quantitative de l'activité du CNR pour l'année 2023 et son évolution depuis 2017 est présentée en tableau 1.

Tableau 1. Evolution de l'activité du CNR, 2017-2023.

Nombre de prélèvements ou souches	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE (hors protocole de recherche clinique et évaluation de kits)							
Sérologie	842	495	349	203	341	144	269¹
Culture de prélèvements cliniques	451	689	648	523	941	852	1068²
PCR à visée diagnostique	254	226	213	199	270	282	379³
Co-culture de prélèvements pulmonaires	253	434	150	90	162	169	115
Expertise d'antigènes urinaires	110	131	61	68	57	43	150
Identification de souches cliniques	377	489	441	317	564	535	590⁴
Expertise de souches environnementales	462	472	485	320	459	464	669
Culture sur prélèvements environnementaux complexes	2	5	6	8	16	18	6⁵
PCR sur prélèvements environnementaux complexes	6	3	4	6	7	20 ⁸	30⁶
Antibiogrammes	8	5	103	175	174	326	8⁷
SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE / ALERTE							
Participation à des enquêtes épidémiologiques environnementales	65	62	58	50	64	60	64
Isolats <i>Legionella</i> analysés en WGS	366	434	517	555	1451	921	1090
Isolats <i>Legionella</i> – détermination du ST (SBT ou WGS)	440	650	596	428	1451	801	933
PCR de typage sur prélèvement ESGLI Lp / Lp1	79	21	51	26	400	414	465
PCR de typage ST1							14
Analyse de SBT appliquée au prélèvement (Nested-SBT)	115	91	46	27	42	36	36

¹ parmi lesquelles 134 réalisées par technique ELISA (dépistage) en première intention ayant déclenché 35 analyses d'immunofluorescence et 135 par immunofluorescence (titrage) en première intention.

² correspondant à 915 patients.

³ dont 55 PCR réalisées dans le cadre de l'enquête autour de Charleville-Mézières (cf. chapitre 4.2)

⁴ pour des raisons de cohérence avec les données de Santé publique France, sont comptabilisées les souches reçues ou isolées au CNR pour des patients dont la date de début des signes se situe dans l'année analysée.

⁵ 2 terreaux, 3 eaux d'appareil d'oxygénothérapie, 1 eau chaude sanitaire de domicile

⁶ 9 terreaux, 6 eaux d'appareil d'oxygénothérapie, 13 extraits d'ADN, 1 eau de cuve et 1 eau froide

⁷ 2 souches cliniques isolées à partir de prélèvements d'un même patient à 3 semaines d'intervalle, 6 souches environnementales Lnp (fin de l'évaluation Sensititre)

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 augmenté (+25%) par rapport à 2022, en lien avec la forte incidence de la légionellose en 2023.

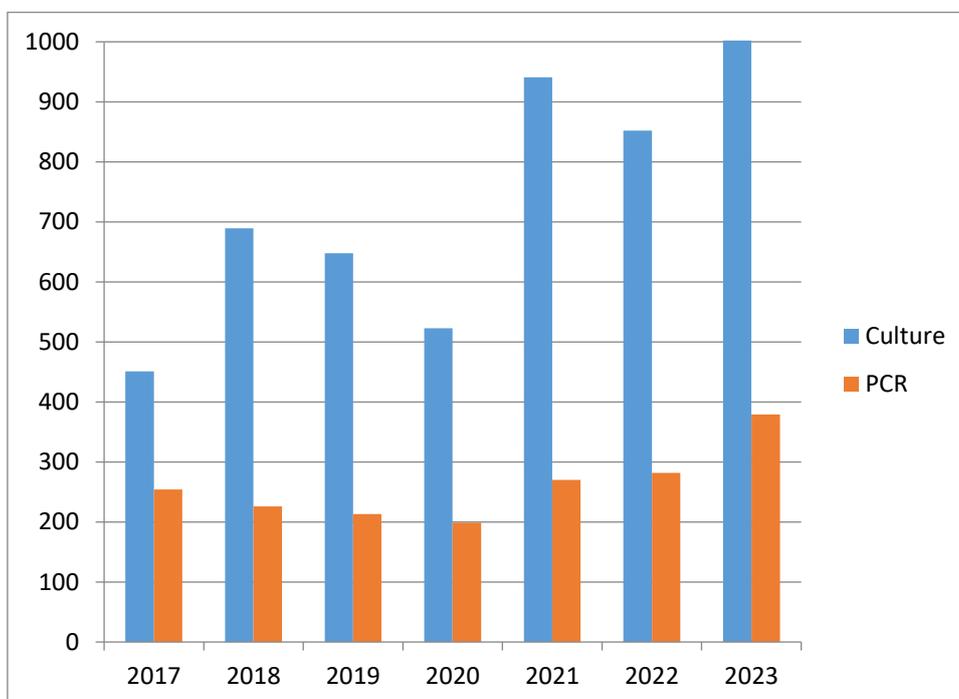


Figure 3. Evolution du nombre de prélèvements broncho-pulmonaires adressés pour mise en culture et PCR à visée diagnostique au CNR, 2017-2023.

• Culture

En 2023, parmi les **1068** prélèvements pulmonaires mis en culture sur milieux gélosés, 897 provenaient de patients pour lesquels un diagnostic avait été posé par antigénurie, et 263 provenaient de patients pour lesquels un diagnostic avait été posé par PCR (dont 224 par le laboratoire expéditeur), certains patients présentant à la fois des résultats d'antigénurie et de PCR positives.

La culture conventionnelle s'est révélée positive pour 457 prélèvements, **soit 42,8 %** des prélèvements. La technique de co-culture sur tapis ambien (*Amoebae Plate Test*, APT) a été mise en œuvre sur 115 prélèvements contaminés et s'est avérée positive sur 8 prélèvements (7%) et a permis d'isoler 1 seule souche additionnelle. Au total, des légionelles ont été isolées pour 458 prélèvements (représentant 398 patients) par culture conventionnelle et/ou co-culture ambiennne, soit **42,9% des prélèvements de patients pour lesquels le diagnostic de légionellose avait été posé.**

Enfin, ces données montrent que sur les souches de *Legionella* isolées en France en 2023, le **CNR a isolé les 2/3 (398/590, soit 67,5%) des souches disponibles au niveau national.** Cette proportion de souches isolées par le CNR est croissante sur les 5 dernières années.

• 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. Elles sont également réalisées en cas de doute sur le diagnostic par le laboratoire expéditeur.

En 2023, le CNR a réalisé différents types de PCR à visée diagnostique sur 379 échantillons. Parmi celles-ci,

- **42 étaient positives pour *L. pneumophila***
- **22 étaient positives pour *Legionella* spp (*Lp négative*)**
 - o **Parmi celles-ci l'espèce a été identifiée** par PCR 23S-5S pour : 3 cas à *L. longbeachae*, 1 cas avec une co-infection à *L. longbeachae* et *L. micdadei* (cf. paragraphe 3.2.1), 1 cas à *L. bozemanii* (3 prélèvements reçus pour ce patient) et 1 cas à *L. lytica* (cf. paragraphe 4.2).

La hausse du nombre de prélèvements sur lesquels une PCR diagnostique a été réalisée en 2023 (n=379 soit +34%) par rapport à 2022 est à relier notamment à la surincidence de cas sur le secteur de Charlevilles-Mezières (+20%) (cf. paragraphe 4.2).

Au total, en 2023, **39 cas de légionellose** ont été diagnostiqués par PCR au CNR (antigénurie négative ou non réalisée) et déclarés aux ARS par les laboratoires expéditeurs.

• Expertise de prélèvements urinaires

En 2023, 150 urines correspondant à 138 patients et testées avec différents kits par les laboratoires expéditeurs ont été analysées, avec différents objectifs :

- confirmation après chauffage non réalisée par le laboratoire expéditeur : n=22
- confirmation d'un diagnostic douteux, non concordant avec la clinique ou non concordant entre différents tests :
 - o tests initiaux réalisés avec le test SofiaFIA : n=50
 - o tests initiaux réalisés avec le test BinaxNOW : n=6
 - o tests initiaux réalisés avec le test SD Biosensor : n=9
 - o tests initiaux réalisés avec le test Nadal : n=1
 - o tests initiaux non précisés : n=8
- confirmation d'un résultat négatif, alors qu'une PCR ou une culture est positive : n=10
- investigation des cas autour de Charleville-Mézières : n=44 (cf. paragraphe 4.2).

Le nombre d'urines expertisées a été multiplié par un facteur 3 par rapport à 2022, en lien avec une forte demande d'expertise de la part des utilisateurs du test SofiaFIA et avec l'épisode de surincidence sur le secteur de Charleville-Mézières. La positivité a été confirmée par le CNR avec au moins un test pour 111 échantillons.

• Expertise pour la sérologie

Après une décroissance significative en 2022 (144 sérums analysés), le nombre de sérologies réalisées en 2023 montre une nouvelle ascension (269 sérums analysés) sans atteindre les valeurs des années précédant 2018 (date à laquelle une sensibilisation du CNR auprès de ses partenaires sur la pertinence de la sérologie avait été réalisée).

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 (IF) sans refaire de test de dépistage. Ces cas représentaient 135 analyses (50%) en 2023. Dans les cas où la technique de dépistage n'est pas réalisée, conformément à la volonté du CNR de diminuer le nombre de sérums analysés, nous encourageons les laboratoires à abandonner cette méthode diagnostique ou à faire appel à d'autres laboratoires prestataires. Cette situation correspond à 134 sérums (50%) en 2023 dont seulement 34 se sont avérées positifs et ont nécessité une technique de titrage.

Parmi les 169 sérums testés par technique d'immunofluorescence (135 demandes d'IF et 34 sérums analysés en IF suite à un test ELISA positif au CNR), 23 étaient positifs en Lp1 et/ou en Lp non 1, 1 était positif à *L. longbeachae*, 1 était positif à *L. maceachernii*. A noter qu'il existe de nombreuses réactions croisées entre les sérogroupes de *L. pneumophila* non 1. Plusieurs sérums en lien avec une suspicion d'épidémie sur un bateau ont été analysés (cf. paragraphe 4.2).

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 environnementale 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 (comptant l'isolement à partir d'un prélèvement pulmonaire) ;
- 1 mois pour une confirmation de sérologie positive.

Les résultats impactant la prise en charge clinique du patient sont systématiquement communiqués par appel téléphonique et/ou e-mail au biologiste correspondant. Un compte-rendu papier envoyé par voie postale ou disponible sur le serveur de résultat Hybrid biologie des HCL 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 ou 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'Institut des Agents Infectieux (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 cgST (schéma de 50 gènes standardisé au niveau international en Août 2018) ;
- o La recherche de la pompe à efflux LpeAB ;

- La recherche de mutations associées à la résistance aux antibiotiques utilisés en thérapeutique ;
- 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 polymorphisms (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 10.4.1 via un séquenceur GridION.
- Le séquençage de la région intergénique 23S-5S par NGS applicable sur prélèvements pulmonaires et sur matrices environnementales complexes.

Interprétation : un script du laboratoire écrit sous nextflow et utilisant des images singularity est utilisé pour la comparaison des séquences générées à une base de données locale de séquences 23S-5S de différentes espèces de *Legionella*.

En 2023, 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 1090 souches** (cf 3.2.2). A ces souches s'ajoutent le séquençage de 16 CQI, 23 CQE et de 1051 souches rétrospectives ou pour des études du CNR. Au total **le CNR a séquencé 2180 souches de *Legionella* en 2023**.

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 la(les) espèce(s) de *Legionella* en cause et rechercher de possibles co-infections par différents sérogroupes et/ou espèces de légionelles ; 42 échantillons cliniques ou environnementaux dont 2 CQE ont été testés avec cette analyse.

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	Interne aux Hospices Civils de Lyon 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).

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	Expertise bio-informatique interne et externe
	<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 à 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 International de Recherche en Infectiologie (CIRI) de Lyon 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...)</p>

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Pour les activités suivantes :
	<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 2023 ont été séquencés en NGS. Ceci a été rendu possible grâce à :</p> <ul style="list-style-type: none"> - une augmentation de l'accessibilité aux automates et aux séquenceurs liés au développement de la plateforme GENEPII sur notre site ; - une diminution des coûts de séquençage via la miniaturisation des réactions de préparation de librairies 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. <p>Toutes les souches cliniques 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, 454 souches ont été séquencées en 2023 (dont environ 2/3 de souches environnementales).

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 2023, cela a représenté **636 souches** (pour certains patients un suivi des souches isolées au cours de l'infection est réalisé). A ces souches s'ajoutent le séquençage de **23 CQE** et de **1090 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 2).

Tableau 2. 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 saintelensi</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
PRJNA1036154		Intragenomic conflicts with plasmids and chromosomal mobile genetic elements drive the evolution of natural transformation within species

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

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

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

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

Les séquences des souches utilisées dans le cadre de travaux publiés sont disponibles dans les bases de données publiques ENA (Tableau 2).

Un projet sur le cgMLST intitulé "Improving *Legionella pneumophila* microbiological surveillance : a cgMLST protocol for data sharing" a été proposé à l'ESCMID au nom de l'ESGLI par le CNR des Légionelles italiens (Maria Scaturro), auquel nous participerions s'il est accepté. Plusieurs pays ont déjà exprimé leur souhait de participer au projet (Portugal, Autriche, Allemagne, Scotland, Sloveinie) et vont être sollicités. Des échanges de séquences seront réalisés dans ce cadre.

Le CNR est également sollicité pour l'aide au diagnostic de légionellose. En 2023, 37 partenaires (Figure 5) nous ont envoyé **379 prélèvements respiratoires pour diagnostic** (antigénurie négative, non réalisée ou douteuse). Le nombre de ces partenaires est en diminution, témoignant du développement des PCR au sein des laboratoires en France.

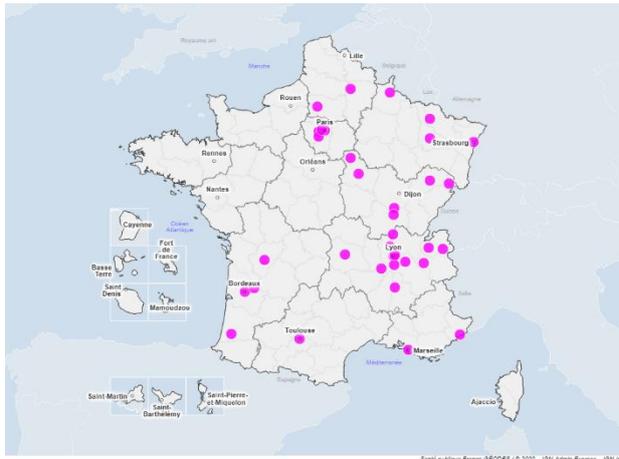
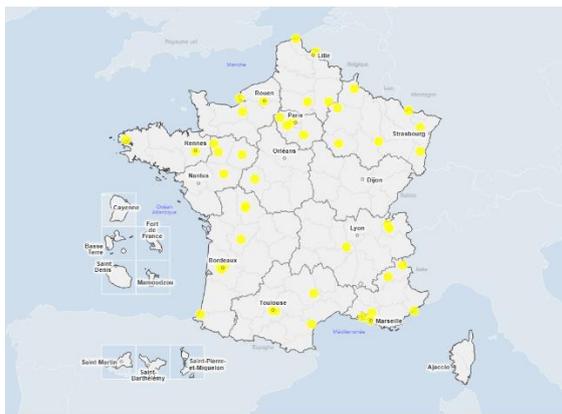


Figure 5. Villes partenaires ayant envoyé en 2023 des prélèvements respiratoires pour diagnostic.

De plus, **46 partenaires** nous ont envoyé des prélèvements d'**urines** (Figure 6A) pour expertise et **37 partenaires** nous ont fait parvenir des **sérums** pour diagnostic ou confirmation sérologique (Figure 6B).



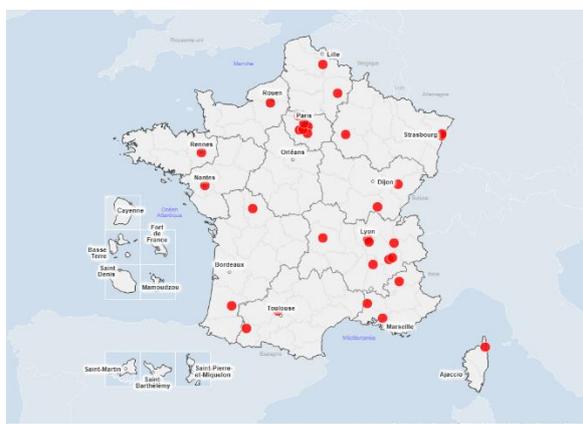
(A)



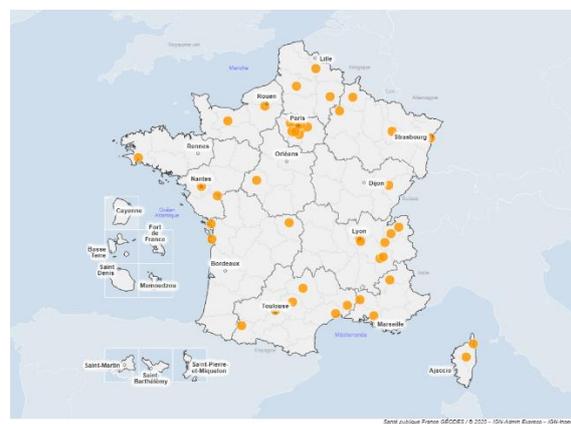
(B)

Figure 6. Villes partenaires ayant envoyé en 2023 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 2023, **21 partenaires** nous ont envoyé des souches environnementales pour **identification** (Figure 7A) et **47 partenaires** nous ont envoyé des souches environnementales pour **comparaison** avec une souche clinique (Figure 7B).



(A)



(B)

Figure 7. Villes partenaires ayant envoyé en 2023 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 2023, 2193 cas de légionellose ont été notifiés en France par le système de déclaration obligatoire. Parmi eux, 29 cas étaient des résidents des DROM (16 cas à la Réunion, 4 en Guyane, 8 en Guadeloupe et 1 à Mayotte) et 29 cas étaient des ressortissants étrangers diagnostiqués en France. Le taux de notification des cas de légionellose en France était de 3,2/100 000 habitants (3,2/100 000 habitants en France hexagonale).

Le nombre de cas de légionellose notifiés en 2023 était en augmentation par rapport à celui de 2022 (1 897 cas soit +16% correspondant à un taux de notification de 2,7/100 000 habitants) et dépassait le nombre record atteint en 2018 avec 2133 (Figure 8). Les dernières données de SpF d'avril 2024 font même état après l'analyse de tous les cas, d'un nombre de 2202 cas notifiés en 2023 ; ce bilan ne s'appuie pas sur ces dernières données.

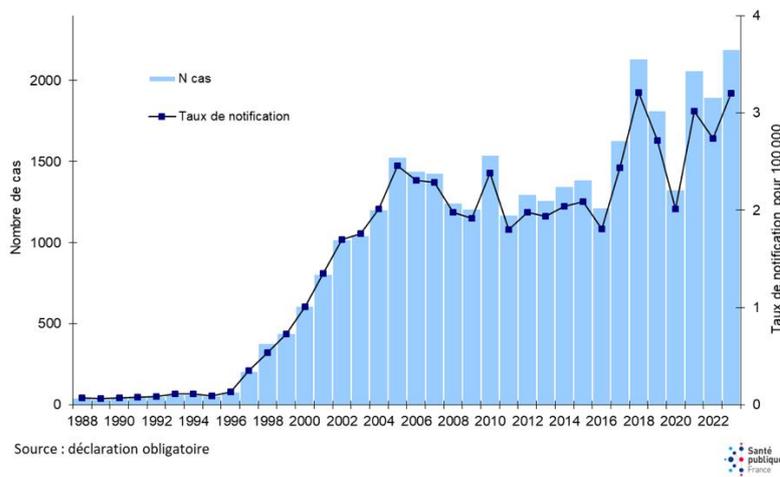
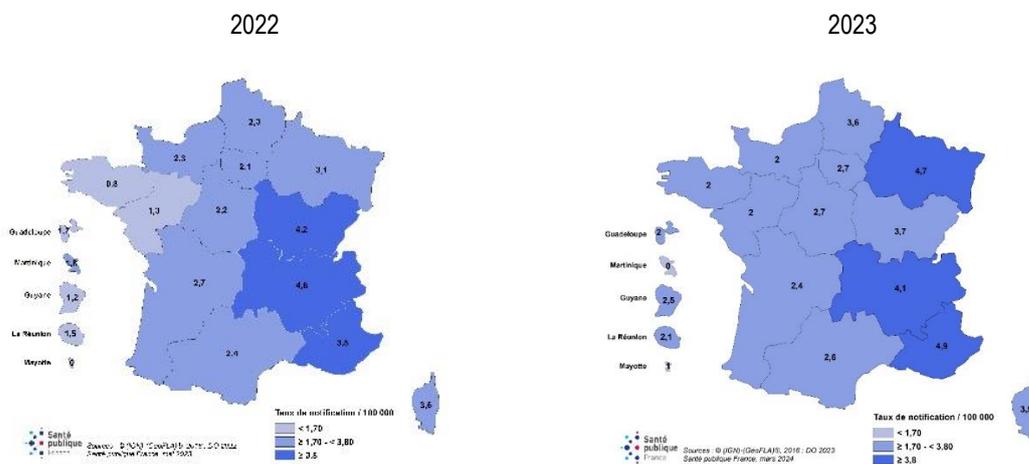


Figure 8. Evolution du nombre et du taux d'incidence annuels des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2023 (Santé publique France).

Dans l'Hexagone, le gradient géographique Ouest-Est du taux de notification des cas de légionellose était toujours présent, variant de 2,0/100 000 habitants en Bretagne, Normandie et Pays de la Loire à 4,9/100 000 habitants en Provence-Alpes Côtes d'Azur. En comparaison avec 2022, le taux de notification en 2023 était supérieur à celui de 2022 dans 9 des 13 régions notamment dans le Grand Est (+1,6), la Bretagne (+1,3), les Hauts-de-France (+1,3) et Provence-Alpes Côtes d'Azur (+1,0) (Figure 9).

Dans les DROM, en comparaison à 2022, le taux de notification en 2023 était en augmentation dans tous les territoires, excepté en Martinique où aucun cas n'a été enregistré.



*standardisé sur le sexe et l'âge

Figure 9. Distribution du taux d'incidence standardisé de la légionellose selon la région de domicile en France métropolitaine, 2022-2023 (Santé publique France).

Le nombre de cas mensuel en 2023 s'est situé tous les mois au-dessus de la moyenne mensuelle des cas notifiés de 2010 à 2023. Il a atteint un nombre record depuis le début de la surveillance en mai (190 cas), en août (338 cas) et en novembre (171 cas).

L'âge médian des cas était de 67 ans [min-max : 14-101 ans]. Le sexe ratio homme/femme était de 2,6 (1 576 hommes et 617 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 (10,6/100 000). Sur les 2 193 cas, 72% présentaient au moins un facteur favorisant. Parmi l'ensemble des cas, 56 (2,6%) n'avaient pas été hospitalisés, part supérieure à celle des cas notifiés de 2017 à 2022 (179 cas soit 1,6% ; p=0,004).

Parmi les 2 193 cas, 2 118 (97%) étaient des cas confirmés diagnostiqués principalement en première intention par la détection des antigènes solubles urinaires (2 031 cas, 93%). Une PCR sur prélèvement respiratoire était positive pour 420 cas (19%), proportion identique à 2022 (Figure 10). Pour 75 (3%) cas, la PCR était la seule méthode de diagnostic biologique, proportion comparable à 2022. Quinze cas ont été uniquement diagnostiqués par culture ; cependant les données de PCR réalisés par le CNR si la culture est positive n'étaient pas jusqu'alors renseigné à SpF. Depuis 2024 une notification hebdomadaire du CNR à SpF des prélèvements avec PCR positive sous la forme de deux fichiers Excel partagés sont adressés sur une interface de partage sécurisé, comme pour les souches. Aucun cas n'a été diagnostiqué par sérologie.

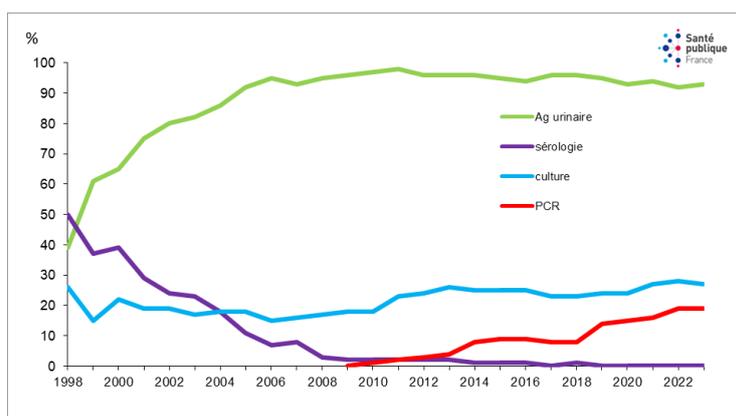


Figure 10. Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose, France, 1988-2023 (données Santé publique France).

*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 et une veille est importante pour repositionner la place de *Legionella* dans de telles infections. En 2023, le CNR a investigué notamment :

* Cas de Légionelloses extrapulmonaires

Cas d'endocardite infectieuse

Un cas d'endocardite infectieuse sans pneumopathie associée a été suspecté à *Legionella* par une antigénurie positive. Il a été confirmé au CNR par des PCR *Legionella pneumophila* positives sur la biopsie de myomectomie cardiaque et le plasma. La PCR Lp1, négative, n'a pas permis de confirmer une infection à un sérotype 1, du fait possiblement d'une faible quantité d'ADN et d'une moindre sensibilité de cette PCR. L'ADN n'a pas été détecté dans les autres prélèvements reçus (valve aortique, tube aortique, sang EDTA) et la souche n'a pas pu être isolée en culture.

Cas exceptionnel d'abcès cérébral à *Legionella bozemanii*

Un patient atteint de lymphome T traité par chimiothérapie jusqu'en avril 2023 et en rémission complète en août 2023, a développé dans l'été une masse pulmonaire lobaire nécessitant une hospitalisation prolongée, non documentée par une 1^{ère} biopsie pulmonaire en août. Devant l'absence de documentation et l'apparition d'une image d'abcès cérébral à l'IRM, une thoracotomie et

une biopsie neurochirurgicale à visée diagnostique ont été réalisées en octobre. Les cultures bactériologiques et fongiques standards, et les PCR *Nocardia* spp revenant négatives malgré la présence de bacilles à Gram négatif à l'examen direct de l'abcès cérébral, le diagnostic a été réalisé de manière fortuite par une PCR universelle puis séquençage sur l'abcès cérébral.

Deux prélèvements de biopsie pulmonaire réalisés en août et en octobre et un prélèvement d'abcès cérébral concomitant à la 2nde biopsie pulmonaire ont été reçus au CNR. Les PCR *Legionella* spp réalisées sur les 3 prélèvements sont revenues positives. La PCR d'identification d'espèce (PCR et séquençage de l'espace intergénique 23S-5S) était positive à *Legionella bozemanii* sur les 2 localisations et aux différents temps. La souche n'a pas pu être isolée par culture. Des PCR *Legionella* spp sont revenues positives sur plusieurs sérums prélevés en mai et en juin et se sont négativées sur les sérums de juillet et le sang EDTA de novembre.

Cas de péritonite à *Legionella pneumophila*

Un tableau de péritonite infectieuse foudroyante secondaire à un ulcère duodéal perforé, compliquant une légionellose grave avec syndrome de détresse respiratoire aiguë a été décrit chez un patient ayant un terrain de cardiopathie ischémique avec triple pontage, de psoriasis et d'ulcère gastrique. Chez ce patient de 49 ans, la pneumopathie à germes atypiques n'ayant pas été évoquée au 1^{er} abord, la légionellose a été diagnostiquée par une antigénurie positive. La culture du liquide péritonéal a permis d'isoler une Lp1 ST 42.

***Cas de co-infections à *Legionella* et de ré-infection**

Dans le cadre de l'enquête sur l'épidémie de Creil (chapitre 4.2), une co-infection a été détectée, grâce à l'envoi par le laboratoire expéditeur du prélèvement respiratoire et d'une souche Lp1 isolée. Le typage de la souche isolée du prélèvement au CNR et de la souche envoyée a montré 2 fonds génétiques de Lp1 différents : ST23 et ST46 respectivement. Le typage de plusieurs colonies isolées au CNR a permis de confirmer la co-existence de ces souches dans le prélèvement.

Un second cas de co-infection a été détecté chez une patiente, hospitalisée en pneumologie pour une pneumopathie bilatérale avec 2 nodules, dans un contexte de post-accident de la voie publique. Le diagnostic de légionellose a été posé par une PCR *Legionella* spp positive sur l'aspiration bronchique. La mise en culture a permis d'identifier 2 souches de *Legionella* différentes : *Legionella longbeachae* et *Legionella micdadei*. Les PCR réalisées sur le prélèvement n'ont pas mis en évidence de *Legionella pneumophila* et l'identification d'espèce par séquençage de l'espace intergénique 23S-5S sur le prélèvement a confirmé ce diagnostic.

Si le phénomène de persistance de *Legionella* chez l'hôte, chez des patients immunodéprimés et sous pression antibiotique, est exploré, la réinfection par une seconde souche est exceptionnelle. Cela a été objectivé chez un patient du CHU de Saint-Etienne à 5 mois d'intervalle. Les analyses de la souche obtenue par culture du crachat du 2nd épisode ont identifié une Lp1 ST 82. Le typage *a posteriori* de la souche directement sur le prélèvement de crachat reçu au cours du 1^{er} épisode a mis en évidence des gènes de ménage différents évoquant une Lp non 1, permettant d'affirmer la réelle réinfection. Ce patient était atteint d'un syndrome myélodysplasique et avait présenté une aplasie concomitante au 1^{er} épisode et une pancytopenie lors du 2nd épisode.

Cas de portage pulmonaire asymptomatique à *Legionella anisa

Un diagnostic fortuit de légionellose a été posé chez une patiente prise en charge en ambulatoire au Centre Léon Bérard à Lyon. Un prélèvement de liquide broncho-alvéolaire avait été réalisé devant le remaniement progressif de scanner en scanner d'une lésion dystrophique sous-jacente. La PCR *Legionella* spp est revenue positive avec un Ct à 31. L'identification d'espèce par PCR spécifique de l'espace intergénique ribosomique 23S-5S sur le prélèvement a révélé la présence de *Legionella anisa* et la souche a été isolée par culture. Malgré l'absence de symptômes et un bilan biologique normal, la patiente a bénéficié d'un traitement par azithromycine d'une durée de 5 jours.

3.2.2 Caractéristiques des souches cliniques et environnementales en lien avec les patients, analysées au CNR

Parmi les 2193 cas de légionellose notifiés en 2023, une souche a été isolée et/ou analysée par le CNR pour 590 cas soit 26,9% des cas. Ce pourcentage reste comparable à celui de 2022 (27,9%) avec une tendance à l'augmentation ces trois dernières années (27,2% de 2021-2023 vs 23,5% de 2017 à 2020 ; $p < 10^{-6}$) (Figure 11).

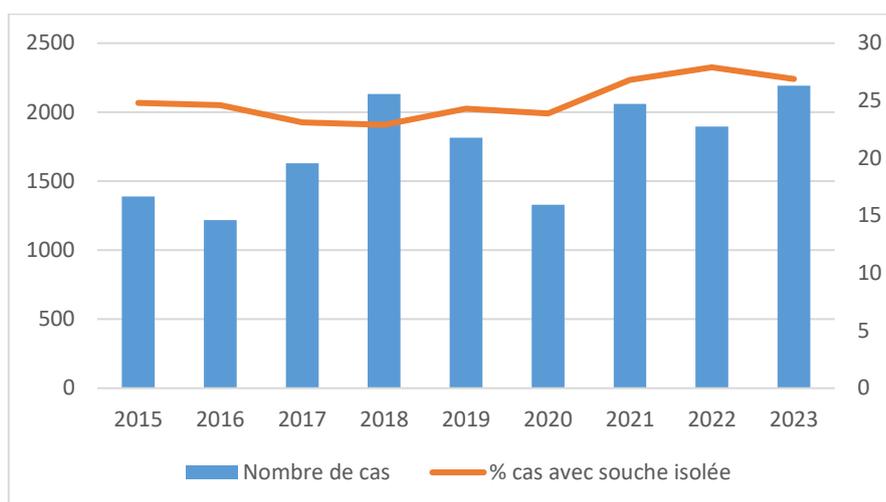


Figure 11. Evolution du pourcentage de cas de légionellose avec une souche isolée parmi l'ensemble des cas notifiés en France, 2015 – 2023.

* Espèces et sérogroupes des souches cliniques

Le sérotype des souches *L. pneumophila* est identifié par agglutination de latex (réactif Oxoid) et/ou immunofluorescence. Les souches *Legionella* non pneumophila sont identifiées par WGS et, lorsque cela est possible, par MALDI-TOF (Vitek-MS). Parmi les 590 souches isolées, la très grande majorité (579/590, 98,1%) étaient des *L. pneumophila* dont 529 Lp1 et 50 (6,8%) appartenant à d'autres sérogroupes. Parmi les 11 autres souches, 8 étaient des *L. longbeachae*, 1 *L. anisa*, 1 *L. micdadei* et 1 *L. bozemanii* (Tableau 3).

Tableau 3. Répartition des souches d'origine clinique isolées en France en termes d'espèces de *Legionella* et de sérogroupes de *L. pneumophila*, 2015 – 2023.

Espèces de Legionella	Nombre d'isolements									
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	
<i>Legionella pneumophila</i>	342	296	373	478	433	313	549	518	579	
sérotype 1	328	281	361	456	398	293	492	457	529	
sérotype non 1	14	15	12	22	35	20	57	61	50	
sérotype 2			1		6	4	10	11	8	
sérotype 3	3	1	5	6	6	3	12	14	5	
sérotype 4		1								
sérotype 5	1				2			1	3	
sérotype 6	4	6	2	5	4	2	2	4	3	
sérotype 7	3	1	1		4	2	5	10	5	
sérotype 8		1	1	2	5	5	2	4		
sérotype 9						1	2	1	1	
sérotype 10	1	3		2	2		1	1		
sérotype 12			1	1						
sérotype 13		1				1	1		3	
sérotype 14				1	1					
sérotype indéterminé ¹	2	1	1	5	5	2	21	15	22	
<i>Legionella non pneumophila</i>	4	4	5	11	8	5	10	17	11	
<i>Legionella dumoffii</i>			1	1						
<i>Legionella micdadei</i>		2		1			1	1	1	
<i>Legionella longbeachae</i>	2			8	5	4	9	11	8	

<i>Legionella anisa</i>	1		1				2		1
<i>Legionella gormanii</i>			1						
<i>Legionella bozemanii</i>	1	1	1		2			1	1
<i>Legionella feelei</i>			1						
<i>Legionella cincinatiensis</i>								1	
<i>Legionella sainthelensis</i>				1					
<i>Legionella maceachernii</i>		1					1		
Total	346	300	378	489	441	318	564	535	590

¹ réaction croisée en immunofluorescence directe

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

- **NGS.** 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 1090 souches (Figure 12). A ces souches s'ajoutent le séquençage de 16 CQI, 23 CQE et de 1051 souches rétrospectives ou pour des études du CNR. Au total 2157 souches de *Legionella* ont été séquencé en 2023.
 - 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) (Figure 13).
 - Dans le contexte de surveillance, ont été définis le Sequence Type (ST) et le core genome Sequence Type (cgST) des souches. En 2023, 1090 isolats cliniques et environnementaux de Lp ont été analysés. L'ensemble des Lp analysées appartenait à 127 Sequence Type (ST) différents (Figure 14).

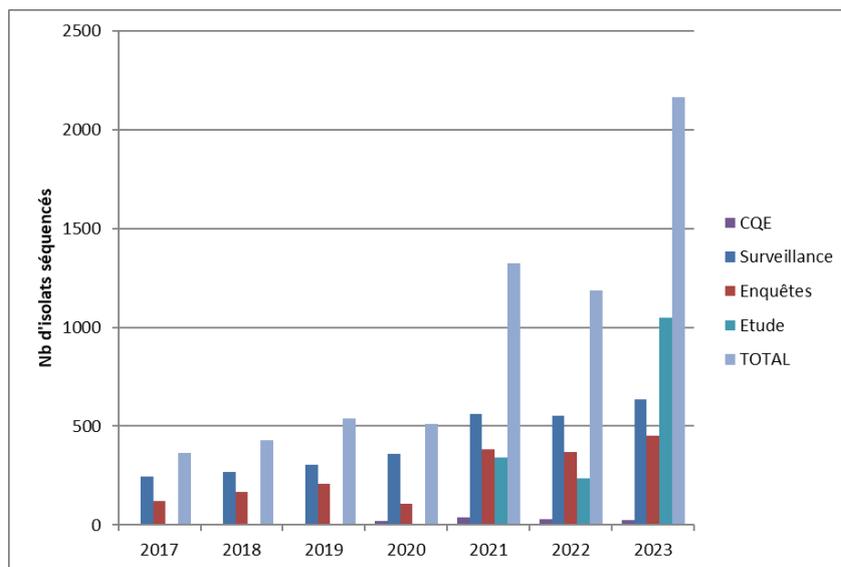


Figure 12. Nombre d'isolats cliniques et environnementaux génotypés par WGS depuis 2017.

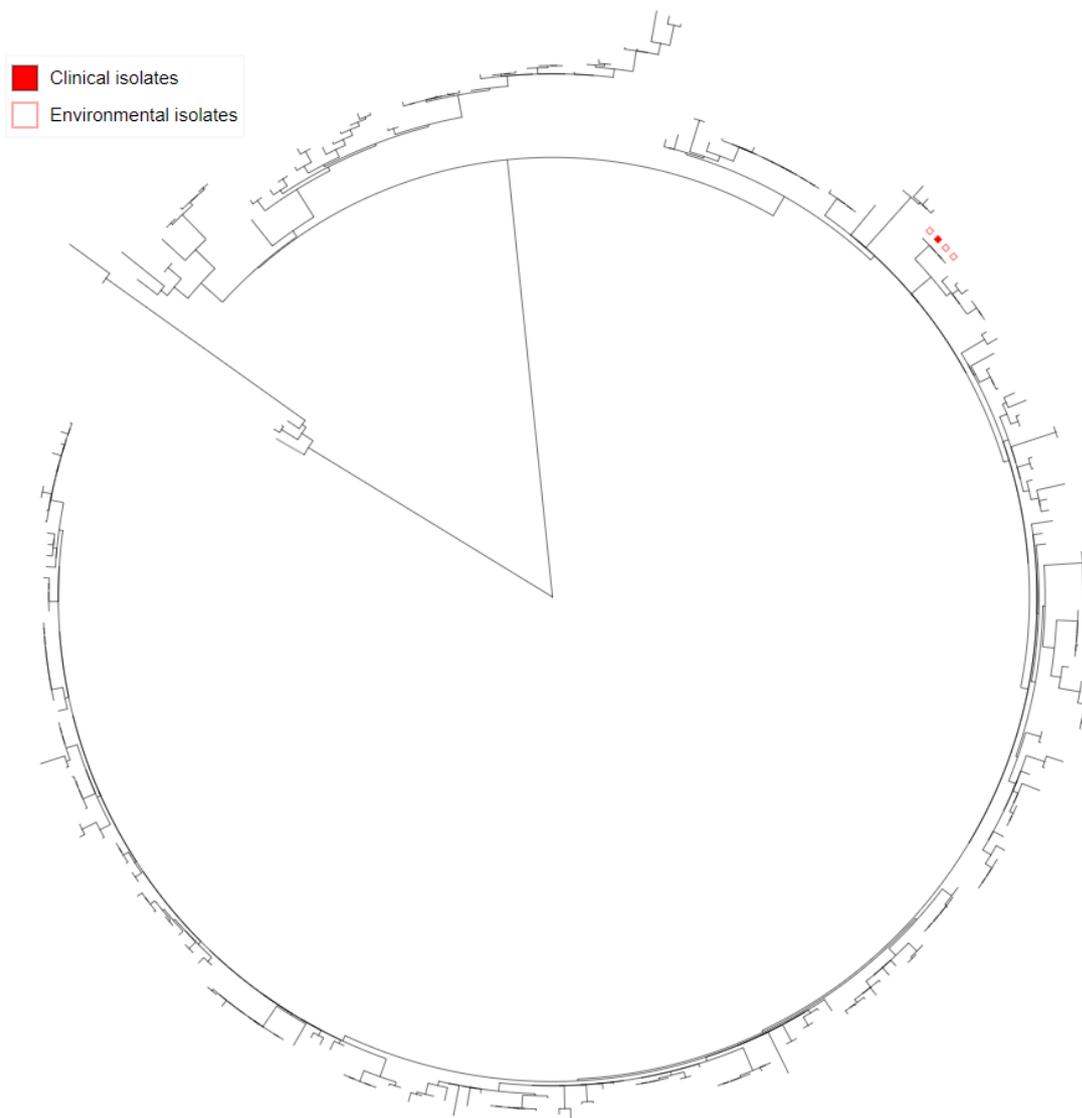


Figure 13. Exemple d'analyse phylogénétique de souches de ST1.

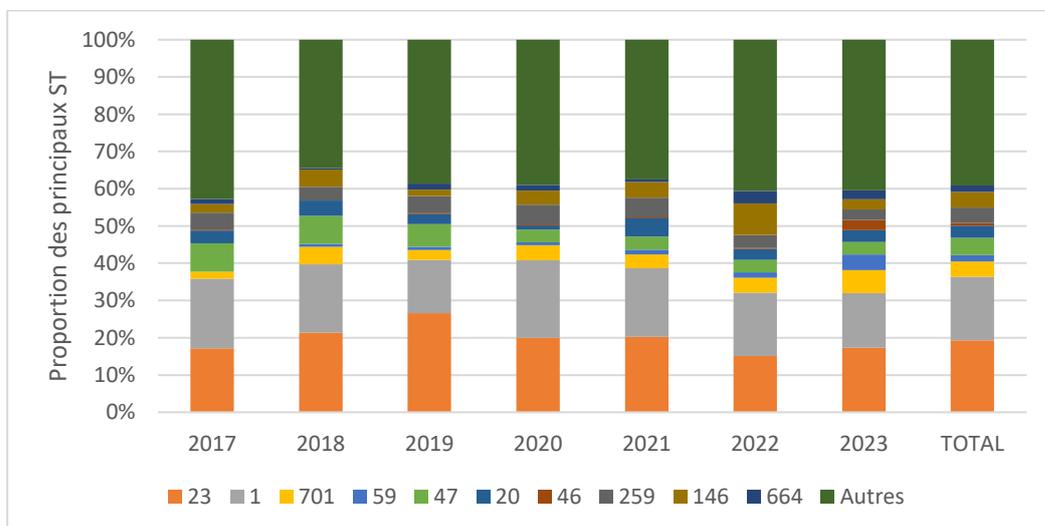


Figure 14. Evolution de la distribution des principaux STs associés à l'infection en France de 2017 à 2023.

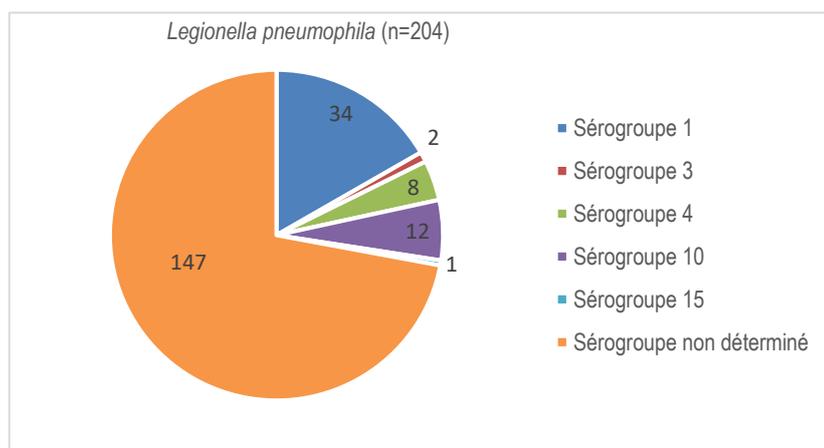
- **Typage en cas de culture négative.** En l'absence de souche clinique isolée, la technique de SBT nichée ou nested-SBT peut être réalisée directement sur le prélèvement. Cette technique, qui présente de faibles performances, n'est à présent réalisée que de façon ciblée, à la demande des ARS lors d'investigations épidémiologiques et uniquement sur les prélèvements montrant une PCR positive. En 2023, 31 prélèvements ont été analysés par cette technique dont 7 CQE. Un ST complet a été obtenu directement sur prélèvement respiratoire pour 5 patients ; pour 19 prélèvements, au moins 1 gène sur les 7 gènes analysés a été amplifié.

3.2.3 Caractéristiques des souches environnementales analysées au CNR

En 2023, 669 souches environnementales nous ont été adressées par des laboratoires extérieurs (+43% par rapport à 2022). Parmi elles, 293 étaient adressées au CNR dans le cadre d'une comparaison avec un cas, et 2 pour recherche de résistance (2 souches Lp1 adressées dans le cadre du suivi de la colonisation du réseau d'eau d'un hôtel par des souches résistantes aux macrolides en lien avec un cas). L'augmentation du nombre de souches reçues était principalement lié à l'envoi de 374 souches pour identification précise de séro groupe ou d'espèce (+203% par rapport à 2022) dont 246 par un seul laboratoire. Parmi ces 374 souches, 170 étaient des *Legionella non pneumophila* et 204 des Lp dont 34 Lp1, 23 Lp non 1 et 147 Lp de séro groupe indéterminé (présence de réactions croisées entre les séro groupe ou identification du séro groupe non réalisée à la demande du laboratoire expéditeur).

La répartition des séro groupes de *L. pneumophila* des souches environnementales analysées au CNR est présentée en Figure 15A. L'identification des souches d'origine environnementale de *Legionella non pneumophila* a été réalisée par technique de MALDI-TOF. La répartition des espèces identifiées est présentée en Figure 15B.

(A)



(B)

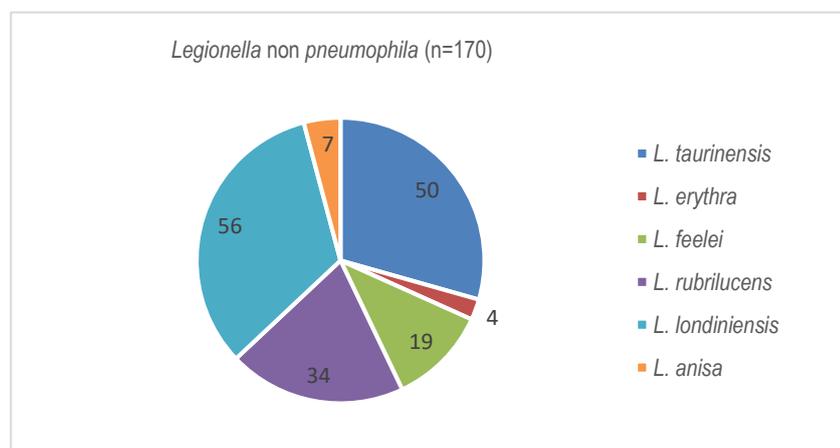


Figure 15. Distribution des souches d'origine environnementale adressées au CNR en 2023 en termes de séro groupe des souches de *L. pneumophila* (A) et d'espèce des souches de *Legionella non pneumophila* (B).

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

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

- **Techniques phénotypiques**

Dans des contextes de légionellose persistante, 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).

Il dispose d'une technique de microdilution « maison » et a validé en 2022 la technique Sensititre (plaques fabriquées à façon).

- **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 (cf paragraphe 2.6).

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 2023, la technique Sensititre a été réalisée sur 8 souches. Parmi elles, 2 étaient des souches cliniques isolées à 3 semaines d'intervalle chez un patient sous antibiothérapie.

Les 6 autres souches étaient des souches environnementales testées pour l'évaluation des plaques sur des *Legionella non pneumophila*.

Aucune résistance n'a été mise en évidence.

Enfin, 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. Dans le cadre du suivi de la colonisation du réseau d'eau d'un hôtel par des souches résistantes aux macrolides en lien avec un cas, nous avons réceptionné deux souches Lp1 environnementales. La persistance des mutations associées à un haut niveau de résistance aux macrolides (mutations dans les gènes *rrl* A2058G) a été retrouvée par WGS ; nous n'avons pas réalisé d'antibiogramme sur ces souches du fait des antériorités connues sur ce réseau (cf paragraphe 3.5).

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, 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'initier de nouvelles études ou analyses communes.

Données échangées : notification hebdomadaire du CNR à SpF des souches d'origine clinique reçues ou cultivées au CNR. Chaque fin d'année, les données de ces fichiers 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 2023, des **courriers personnalisés** ont été envoyés aux ARS, aux laboratoires et à SpF pour **1036 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 3.5).

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

- **Contribution au réseau de surveillance**

* 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 et a participé à la réunion annuelle ELDSNet organisé en distanciel les 29 et 30 Nov. 2023. Les membres du réseau se sont, pour une part, rencontrés lors du 7th ESGLI meeting (Octobre 2023, Chania, Crete). Le CNR était représenté par S. Jarraud, G. Descours, L. Beraud et C. Ginevra.

* La plupart des membres du CNR sont membres du **groupe d'étude européen groupe d'étude ESCMID (European Study Group for Legionella Infection) pour les infections à Legionella (ESGLI)** (S Jarraud, trésorière en 2023) comprenant près de 100 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.

- **Nomination comme premier Laboratoire de Référence Européen pour Legionella**

Suite à l'appel à candidature pour la nomination des premiers laboratoires de référence européens (EURLs) publié par la Commission Européenne à l'automne 2023, nous avons sollicité différents partenaires européens **pour répondre à l'appel à candidature du futur Laboratoire de référence Européen (EURL) pour Legionella** avec la constitution d'un consortium pour se porter candidat pour l'EURL Legionella. Ce consortium composé du CNR Français comme coordinateur, les CNR Italien, Portuguais et Allemand a répondu en Janvier 2024 et a été désigné EURL pour Legionella en février 2024. Ce consortium répond actuellement à l'EU4Health programme pour le financement de cet EURL. Ce laboratoire européen devrait être opérationnel en Janvier 2025.

- **Échanges de données**

* Le CNR a participé à la campagne d'évaluation externe de la qualité proposé par l'ECDC (1 campagne par an). Cet EEQ auquel 34 laboratoires européens ont participé permettait l'analyse de 10 échantillons cliniques (prélèvements respiratoires et urines) et 7 échantillons environnementaux.

* Les **données de typage par SBT** de toutes les souches d'origine clinique et des souches environnementales en lien avec une investigation sont systématiquement envoyées afin de renseigner la base de données EWGLI (www.ewgli.org). 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 par la création d'un pipeline spécifique en 2019. Pour les STs nouveaux, un mail est fait en systématique au PHE afin d'avoir une réponse spécifique.

- **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). En décembre 2023, l'équipe de Cardiff a accueilli G. Descours dans l'objectif d'uniformiser les pratiques au niveau européen pour la réalisation des antibiogrammes de *Legionella*. Un panel de 4 souches de référence sera testé par chaque laboratoire participant pour évaluer la variabilité inter-opérateurs de la technique.

* Dans le cadre d'une investigation d'un cas étranger (Italien) ayant séjourné en Franc, des analyses phylogénétiques de souches ST1 ont été réalisés en collaboration à la demande du CNR Italien (ML Ricci et M Scaturro) par C. Ginevra

* Demande par le CNR Belge d'une sélection de souches Lp variées permettant de tester leur workflow NGS : 12 souches ont été envoyés

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 Evaluation de la diversité génotypique intra-patient

L'évaluation de la diversité des génotypes intra-patient est une question récurrente et sa complexité pourrait avoir un impact sur les conclusions des études épidémiologiques. Le CNR conserve depuis 2011 de 2 à 5 colonies isolées d'un même prélèvement clinique. Dans le but d'évaluer la diversité des génotypes intra-patient, nous avons séquencé 728 de ces colonies isolées de 178 patients. Deux co-infections par des souches de génotypes différents ont été identifiées. Une microdiversité intra-patient de 1 à 10 SNPs est observée dans 8.2% des souches testées ; ces données suggèrent l'utilisation d'un seuil de 10 SNPs nécessaire avant d'exclure un possible lien lors des investigations. Ces données seront complétées par l'étude LEGIODOM (ci-dessous) dont l'un des objectifs secondaires est d'étudier cette diversité intra-patient et intra-environnement.

3.5.2 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 Plan national de santé environnement (PNSE 4) lancé en 2021, par son action n°12 qui 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 Langolf-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 du CAT ont eu lieu en 2022 et 2023 pour mettre en place cette étude, ainsi qu'avec les ARS. Le protocole final de l'étude a été validé par le CAT, et l'autorisation CNIL obtenue fin 2023. Le financement de l'étude par le Ministère de la Santé et de la Prévention, Direction générale de la santé, le Ministère de la transition écologique et de la cohésion des territoires, Direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, Direction de l'habitat, de l'urbanisme

et des paysages et par Santé Publique France a été validé en décembre 2023 (1,3 M€). Camille Jacqueline, qui a bénéficié d'un EPIET/EUPHEM Fellowship, a rejoint l'équipe du CNR en 2024 pour la mise en place et la gestion de l'étude. L'appel d'offre pour les laboratoires environnementaux prestataires est en cours. Les premières inclusions sont programmées en Septembre 2024.

3.5.3 Enquête sur la diffusion environnementale d'une souche hautement résistante aux macrolides identifiée en 2021 dans un hôtel 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 2022 puis en 2023 sur le réseau d'eau de l'hôtel nous ont été transmises. Elles possèdent elles-aussi les mutations de résistance, témoignant d'une persistance de la souche dans le réseau de l'hôtel. En 2022, un plan d'action visant à cartographier le réseau d'eau de la ville concernée en collectant les résultats d'analyses Légionelles des ERP, ESMS, hôtels/gîtes... avait été acté. Néanmoins, nous n'avons pas pu collecter de souche sur le réseau desservant l'hôtel en question en 2023. Par ailleurs, nous nous sommes rapprochés d'Eurofins (site Hydrologie Est, Maxeville) qui collabore avec le laboratoire Omegam à Amsterdam pour le dosage de macrolides par technique de SPE/LC/MS/MS permettant des dosages avec des limites de quantification de l'ordre du ng/L.

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

Parmi les 2193 cas de légionellose diagnostiqués en 2023 (patients ayant présenté les premiers signes cliniques en 2023), des investigations environnementales à la recherche de la source de contamination ont été réalisées pour 74 cas de légionellose (dont 15 en lien avec l'épidémie de Creil, cf. paragraphe 4.2), soit 3,4 % de l'ensemble des cas et 12,5% des cas avec souche disponible. Pour 4 cas, 2 sources potentielles d'infection ont été investiguées, montant le nombre de comparaisons réalisées à 78. Parmi ces 78 comparaisons, les profils génomiques des souches cliniques et environnementales se sont révélés identiques pour 43 investigations (soit 55%). Si l'on exclut les 15 cas rattachés à Creil pour lesquels aucune source de contamination n'a été identifiée, le taux de comparaison permettant l'identification de la source atteint 68% (43/63), valeur stable par rapport à 2022 (Figure 16).

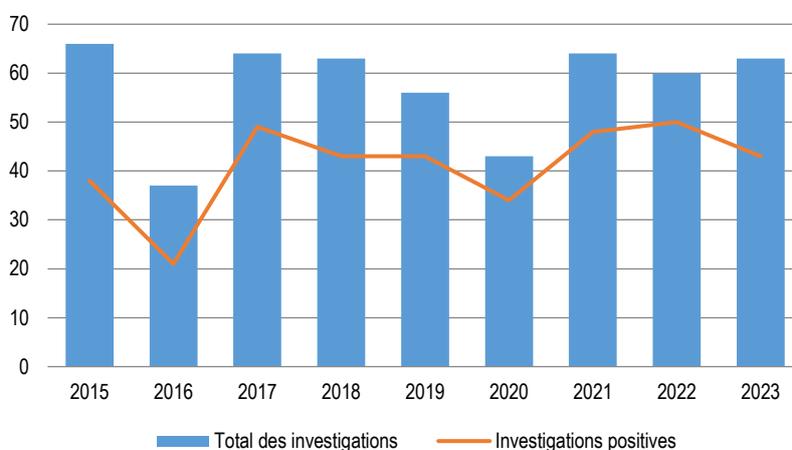


Figure 16. Evolution du nombre d'investigations réalisées depuis 2013.

Si l'on restreint l'analyse aux 63 cas de 2023 (Creil exclu), les investigations environnementales et microbiologiques ont permis de préciser que **les réseaux d'eau sanitaire** étaient la **source la plus probable de contamination** dans 6 établissements de santé, 14 domiciles, 9 établissements de tourisme, 3 établissements de personnes âgées et 11 autres établissements : lieu de travail (n=4), foyer/résidence (n=3), spa (n=2) ou domicile d'un proche du cas (n=2) (Tableau 5).

Comme chaque année, les investigations menées dans les structures non hospitalières montrent des forts taux de conclusion positive quant à la source de contamination (Tableau 5).

Tableau 5. Investigations épidémiologiques réalisées pour les cas de 2023.

Investigations positives		Investigations totales	
N	%	N	%

Hôpitaux	6	46%	13	20,6%
EHPAD/ MR	3	75%	4	6,3%
Domicile	14	67%	21	33,3%
Tourisme	9	90%	10	15,9%
Autres	11	85%	13	20,6%
TAR	0	0%	2	3,2%
TOTAL	43	68%	63	100%

MR : maison de retraite ; cas groupés de Creil (n=15) exclus.

Pour chaque enquête, nous avons comparé la souche clinique isolée d'un prélèvement respiratoire du patient à une et jusqu'à 33 souches environnementales issues de prélèvements d'eau auquel le patient avait potentiellement été directement exposé ou appartenant au même réseau d'eau. La comparaison des souches a été réalisée sur la base du ST (Sequence Type, 7 gènes) et du cgST (core genome Sequence Type, 50 gènes) des souches obtenues par WGS (Whole Genome Sequencing) en cas de ST identique (n=43). Pour 14 investigations, le ST et cgST des souches cliniques et environnementales étaient identiques et les souches présentaient un ST endémique, ST1 ou ST23. Nous avons alors réalisé une analyse phylogénétique du génome qui a permis d'identifier un même ancêtre commun le plus proche.

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).

4.2 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Ne sont exposées ici que quelques investigations les plus « atypiques » de 2023.

Surincidence de cas de légionelloses atypiques sur le secteur de Charleville-Mézières (Ardennes, Grand-Est), février-septembre 2023.

Une surincidence de diagnostics de légionellose a été détectée au CH de Charleville-Mézières entre février et septembre 2023. Cet événement a présenté plusieurs particularités, avec une présentation clinique atypique et peu marquée, amenant les cliniciens à déclasser certains diagnostics. Seuls 28 sur 47 patients (60%) dépistés par une antigénurie positive par le test BinaxNOW® après chauffage des urines ont eu un diagnostic retenu et déclaré de légionellose. Seuls 15 cas ont été inclus par l'ARS dans l'épisode de cas groupés autour de Charleville-Mézières. Sur 37 patients pour lesquels l'urine a été envoyée au CNR, la positivité a été confirmée pour 35 patients avec une faible positivité, le plus souvent la bande étant visible uniquement au lecteur. L'expertise des prélèvements respiratoires reçus pour 29 patients a conforté le diagnostic pour 4 patients positifs en culture conventionnelle (2 Lp1 ST23, 1 Lp1 ST38 et 1 Lp1 ST94) et 3 autres positifs en PCR *Legionella* spp., dont une détectant *Legionella lytica*. Face à ce tableau clinicobiologique atypique, le CNR a réalisé des analyses complémentaires non conventionnelles. Des PCR ont été réalisées sur le sérum et le culot leucocytaire de 22 et 20 patients respectivement, et se sont révélées positives pour 3 sérums et 2 culots. Un seul cas a montré une positivité de la PCR sur le prélèvement respiratoire, le sérum et le culot leucocytaire simultanément. Il s'agissait de *L. pneumophila*, retrouvée également en culture du prélèvement respiratoire. Les autres PCR positives sur sang étaient en faveur d'une *Legionella* non *pneumophila* (n=3 patients), sans que l'espèce n'ait pu être déterminée.

Le pourcentage de souches isolées ou de second examen positif est particulièrement faible, et aucun élément microbiologique ne permet de relier les patients entre eux. Il est reconnu que la sensibilité de la culture et de la PCR pour *Legionella* est largement diminuée pour les légionelloses les moins sévères. L'hypothèse de réaction croisée avec le test de détection de l'antigénurie pour

les 19 patients déclassés ne peut être exclue bien qu'aucun argument microbiologique ne puisse venir le prouver et que ce contexte n'a jamais été rapporté. Enfin, un diagnostic de fièvre de Pontiac a été évoqué sur la symptomatologie clinique mais n'a pas été retenu sur les caractéristiques épidémiologiques de cet épisode. A noter que *Legionella lytica* est une 'Legionella Like amoebal pathogen' (LLAP) anciennement dénommée *Sarcobium lyticum*, décrite initialement comme une espèce intracellulaire stricte, ne cultivant pas sur milieux axéniques. L'hypothèse d'une surincidence de cas de légionellose liée à *Legionella lytica* a été évoquée et pourrait concorder avec l'absence de culture axénique positive pour les patients de l'épidémie et une symptomatologie clinique atypique. Néanmoins, il n'est pas connu actuellement de souche de *Legionella* non *pneumophila* qui pourrait être détectée par les tests urinaires qui sont spécifiques de *Legionella pneumophila* séro groupe 1.

Des pistes environnementales ont été explorées au niveau de la station d'épuration de Charleville-Mézières, la TAR Colin Milas des Hautes-Rivières, aux domiciles des patients dans les villes de Charleville-Mézières, Terron Les Poix, Harcy et au Centre Hospitalier Intercommunal Nord-Ardenne. Ces analyses n'ont pas identifié de lien entre ces souches environnementales et les souches isolées des patients sur le secteur.

Episode de cas groupés de légionelloses sur le secteur de Creil (Oise, Hauts-de-France), février 2023-aujourd'hui.

Depuis février 2023, un épisode de cas groupés de légionellose est survenu dans le département de l'Oise, ayant concerné 50 patients résidant dans le département (données de l'ARS Hauts-de-France). Le typage de la souche ou directement sur prélèvement respiratoire a permis de mettre en évidence un clone génomique commun, Lp1 ST46, très rare (<1% des séquences enregistrées au CNR) : 17 de ces patients ont été infectés de façon certaine ou compatible par ce même clone. Ces patients ont pour point commun de résider ou avoir effectué des déplacements dans une zone d'environ 5 km de rayon, définie sur l'agglomération de Creil, faisant suspecter une source aérienne commune et intermittente de contamination, située sur l'agglomération de Creil. Des investigations environnementales entreprises au niveau des domiciles des patients n'ont pas retrouvé de Lp1 ST46. Toutes les autres recherches, au niveau de la TAR du site Poclair hydrolique – Verberie, de l'eau de refroidissement de la chaufferie Creil Energie, de la chaufferie urbaine Cavée de Senlis, la TAR de la société Arkema, se sont avérées non contributives. A ce jour, la source potentielle de contamination de ces patients n'a pas été mise en évidence et l'enquête est toujours en cours.

Episode de cas groupés sur un bateau de croisière, mai 2023 (Finistère, Bretagne).

Le CNR a été sollicité pour une investigation concernant un paquebot. Cette investigation a été réalisée rétrospectivement suite au diagnostic d'un cas de légionellose par antigénurie, par le moyen de la sérologie, chez 8 patients pour lesquels nous avons reçu un sérum précoce et un sérum tardif à 16 jours d'intervalle. Ces patients présentaient une antigénurie négative et n'avaient pas de symptomatologie pulmonaire. Il a été constaté une séroconversion ou une augmentation du titre d'anticorps x4 (cas confirmés si présence de pneumopathie) pour 3 patients ; un titre élevé significatif mais sans augmentation entre les 2 sérums (cas probables si présence de pneumopathie) pour 3 patients ; un patient présentant des titres non significatifs (douteux) ; et un patient avec des sérologies négatives. Les sérologies positives étaient dirigées contre *Legionella pneumophila* de séro groupe non 1, ce qui est en faveur d'infections à *Legionella pneumophila* de séro groupe non 1 chez ces patients. En l'absence de souches isolées chez ces patients, aucune analyse complémentaire n'a pu être réalisée.

Cas groupés de légionellose sévère dans un hôtel en Haute-Savoie (Auvergne-Rhône-Alpes), octobre 2023.

Dans le cadre de l'enquête autour d'un cluster de 3 patients atteints de légionellose sévère reliés par un séjour dans un hôtel en Haute-Savoie, le CNR a reçu 3 souches de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 isolées de prélèvements respiratoires de 2 des patients et d'un prélèvement de poumon post-mortem du 3^{ème} patient. Le séquençage du génome complet de ces souches cliniques et de 6 souches de *L. pneumophila* séro groupe 1 isolées de prélèvements d'eau chaude sanitaire à différents points du réseau de l'hôtel, a révélé qu'elles présentaient un ST commun : ST40, et qu'elles étaient phylogénétiquement reliées entre elles. Cela concordait avec cette source de contamination commune.

Cas groupés de légionellose dans des établissements de tourisme à l'île Maurice, janvier 2023.

Un cluster de légionellose a été identifié par Santé Publique France dans des établissements de tourisme à l'île Maurice au début de l'année 2023, concernant 11 touristes (10 français et 1 allemand). L'analyse des prélèvements respiratoires transmis au CNR pour 3 d'entre eux ont permis d'isoler une souche Lp1 de même séro groupe : nouveau ST en cours de numérotation, et de même core genome ST, confortant la suspicion de source de contamination commune. Les analyses réalisées sur le prélèvement de crachat d'un 4^{ème} patient identifié dans ce cluster n'ont pas été contributives.

Episode de cas groupés de fièvre de Pontiac dans la région PACA, août 2023.

En août 2023, un professionnel de santé a déclaré à l'ARS PACA, un cas de légionellose en mentionnant l'existence d'un cas groupé comptabilisant 12 cas. Il s'agissait de 12 jeunes adultes ayant participé à une soirée chez un particulier avec une baignade prolongée dans un jacuzzi, inutilisé depuis 2 semaines. Les 12 participants ont présenté de la fièvre avec syndrome pseudo grippal dans les 24h à 48h suivant l'exposition. Un cas a nécessité une consultation aux urgences. Aucun cas n'a présenté de pneumopathie. Les seules données microbiologiques disponibles ont été une antigénurie positive chez 5 patients. Les cas ont été reclassés en fièvre de Pontiac sur ces éléments clinico- biologiques et épidémiologiques. A ce jour, le bilan épidémiologique est de 6 cas confirmés (antigénurie légionnelle positive en l'absence de pneumopathie) et 6 cas épidémiologiques (signes cliniques

compatibles et exposition commune aux cas confirmés). Le propriétaire a reçu la consigne de faire appel à un prestataire spécialisé, fermer l'accès au jacuzzi, aux douches extérieures et à la piscine, et les recommandations de prévention de nouvelle contamination.

2 cas de légionellose à la suite d'une cure thermale dans le département de la Côte-d'Or (Bourgogne-Franche-Comté), été 2023.

2 cas de légionellose admis en soins intensifs avec une notion d'exposition commune ont été déclaré par un biologiste des Hospices Civils de Beaune. La souche, obtenue chez l'un des 2 patients a permis l'identification d'une Lp1 ST 701. Les 5 souches isolées de prélèvements d'eau de piscine de ces thermes ont été également identifiées Lp1 ST 701, ayant un lien phylogénétique avec celle du patient. Le typage sur prélèvement du 2nd patient a montré une compatibilité avec cette souche, démontrant le lien avec cette source de contamination.

Enquête autour d'un cas de légionellose chez un agriculteur en Haute-Savoie, février 2023.

Dans le cadre de l'enquête autour d'un cas de légionellose à Lp1 chez un agriculteur de Haute-Savoie dont la source suspectée était le réseau d'eau d'arrosage de l'étable, les sérums de 5 vaches laitières de son troupeau présentant une pneumonie aiguë pour 2 d'entre elles et des signes généraux d'infection pour 3 d'entre elles ont été adressés au CNR par la clinique vétérinaire. Les sérums de 10 vaches laitières témoins ne présentant pas de signes cliniques, de même race et de même stade de lactation ont été envoyés en parallèle. La sérologie est revenue négative pour l'ensemble des animaux. Une nouvelle série de prélèvements de sérums a été effectuée un mois après sur les 3 vaches ayant présenté des signes généraux et 5 vaches témoins, mais la sérologie n'a pas mis en évidence de séroconversion.

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 ». S. Jarraud, 1h30, 14 Nov 2023 en distanciel.

* Les méthodes de détection des *Legionella*. Formation ARS Occitanie. S. Jarraud, 1h30, 28 Nov 2023 en distanciel.

* Présentation et discussion sur les méthodes de diagnostic et de typage aux personnels de l'ARS Nouvelle Aquitaine, L. Beraud Réunion en visio le 01/06/2023.

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

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

- Valentine Poinot, étudiante en 5^{ème} année hospitalo-universitaire, Faculté de Pharmacie – ISPB, Lyon : finalisation de l'évaluation de la technique Sensititre pour l'antibiogramme de *Legionella*, puis mise au point de la technique REPTIS pour l'identification de persisters chez *Legionella*. Janvier – Septembre 2023.
- Lucile Houseaux, étudiante en 5^{ème} année hospitalo-universitaire, Faculté de Pharmacie – ISPB, Lyon : évaluation de la technique REPTIS pour l'identification de persisters chez *Legionella*. Octobre 2023 – Décembre 2023.
- Inès Amdouni, Alternance Licence pro génomique : développement de méthodes pour le séquençage de *Legionella* directement à partir de prélèvement clinique. Septembre 2022 - août 2023.
- Léa Métra, 1ère année BTS analyses biologiques : recherche de *Legionella* dans les eaux de station d'épuration par coculture ambiante. Juillet 2023
- Camille Pascal, 3ème année IFTML : Evaluation de la diversité intra patient de *Legionella* par NGS et spectrométrie de masse. Septembre 2023 - novembre 2023
- Noëlie Vincent, étudiante en 4^{ème} année de Pharmacie filière Ingénieur, Faculté de Pharmacie – ISPB, Lyon : étude de l'acquisition de résistance à l'activité bactéricide du sérum de différentes souches de *Legionella*. Juin – Août 2023 (3 mois)
- Nolan Da Cunha, étudiant en 5^{ème} année hospitalo-universitaire filière Recherche, Faculté de Pharmacie – ISPB, Lyon : finalisation de l'étude de la présence sanguine de lipopolysaccharide de *Legionella* en lien avec la sévérité des patients atteints de légionellose. Octobre 2023 – Mars 2024 (6 mois)

*Etudiantes étrangères :

- Afaf Soummam, Etudiante en thèse : Typage par NGS d'isolats environnementaux de *Legionella pneumophila* et test de virulence sur amibes. Octobre 2023 (Institut Pasteur Maroc)

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

Aucun guide en 2023.

- **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

*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.

- **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 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 2023).

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).

ESCMID – ESGLI - forte implication au groupe d'étude ESGLI (ESCMID Study group for *Legionella* Infections). Membre du comité exécutif (trésorière, S. Jarraud). Participation aux réunions du comité exécutif (1 fois / mois) en distanciel

DGS/DGPR – et Santé Publique France – coordination de l'étude LEGIODOM (voir chapitre 3.5).

DGAL – ANSES – expertise sur les cas de légionellose à *L. longbeachae* et les modes de contamination *via* les terreaux, composts, terre lors du jardinage.

HAS – participation à l'actualisation des recommandations pour la prise en charge des pneumonies communautaires

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

Pas en 2023

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 (étude 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, et en avril 2024, 235 patients avaient été inclus. Le critère de sévérité choisi est la ventilation mécanique à l'inclusion. Au cours des deux dernières années, nous avons montré pour les 100 premiers patients que les légionelloses sévères sont marquées en phase initiale par (i) des charges bactériennes pulmonaires (évaluée par le taux d'ADN de *Legionella* dans les poumons) et sériques (taux d'ADN de *Legionella* dans le sérum) significativement plus élevées; (ii) une hyperinflammation (augmentation significative de production 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. Les travaux correspondant au (ii) ont été publiés au cours de l'année 2023 (Allam C, Mouton W, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Ibranosyan M, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Albert-Vega C, Richard JC, Argaud L, Friggeri A, Labeye V, Jamilloux Y, Freymond N, Venet F, Lina G, Doublet P, Ader F, Trouillet-Assant S, Jarraud S. Hyper-inflammatory profile and immunoparalysis in patients with severe Legionnaires' disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Oct 27;13:1252515). La publication des travaux correspondant au (i) est prévue courant 2024.

Depuis fin 2022, le CNR mène en parallèle une étude pilote de l'axe intestin/poumon au cours de la légionellose par approche multi-omique (métatranscriptomique / métagénomique / métabolomique). Elle est financée par l'appel à projets jeunes chercheurs des HCL (Marine Ibranosyan) et bénéficie du recrutement des patients lyonnais inclus dans ProgLegio. Ces travaux ont pour ambition d'initier un déchiffrement des interactions complexes entre les compartiments digestif, sanguin et pulmonaire, et d'identifier des biomarqueurs bactériens et/ou de l'hôte associés à la sévérité des légionelloses. Fait marquant, les résultats préliminaires obtenus à partir d'échantillons de selles ont révélé la présence d'ADN de *Legionella* chez 22% des patients (2/9) ; ces 2 patients présentaient des diarrhées au moment du diagnostic.

* Etude de l'acquisition de résistance à la bactéricidie du sérum (encadrement de 2 étudiants de 2^{ème} cycle en Pharmacie : Noëlie VINCENT et Nolan DA CUNHA durant des stages de 6 mois)

On sait depuis les années 80 que l'immunité innée joue un rôle majeur dans la réponse anti-*Legionella*. Le sérum possède une activité bactéricide anti-*Legionella*, et notre équipe a récemment montré un profil de sensibilité variable selon les souches de légionelles, en particulier en lien avec les caractéristiques de leur lipopolysaccharide (LPS).

* **Compréhension des infections persistantes : évaluation de la technique REPTIS chez *Legionella*.** Une étude récente de l'équipe de N. Personnic a montré la capacité de *Legionella pneumophila* à générer des « persisters » (Personnic *et al.*, *Nat Comm*, 2019). L'objectif du CNR est d'investiguer l'hypothèse de persisters chez des patients atteints de légionellose évoluant défavorablement sous antibiothérapie. En collaboration avec notre équipe de recherche LegioPath, nous avons étudié la capacité à persister de 7 couples de souches prélevées à l'étape initiale de la maladie et après plusieurs semaines d'antibiothérapie, en l'absence de résistance aux antibiotiques, par des techniques de marquage fluorescent et courbes de survie. Nous avons identifié des différences de persistance parmi les couples de souches étudiés. Le couple de souche ST1 présentait le plus haut % de persisters (Adams-Ward X. *et al.*, *Front Cell Infect Microbiol.* 2023).

Sur la période 2022-2023 (stages de V. Poinot puis L. Houseaux), nous avons développé un outil simple à mettre en oeuvre qui permettrait (i) de détecter des souches associées à un % élevé de persisters, et (ii) d'investiguer l'hypothèse que les souches ST1 seraient associées à une capacité à persister plus élevée. Dans cet objectif, nous avons adapté la technique REPTIS (Herren *et al.*, *AAC*, 2022) décrite chez *S. aureus* aux légionelles. Elle consiste en la réalisation d'un antibiogramme par diffusion (disque imprégnés d'antibiotique) en milieu gélosé, puis à la réalisation de tampons à partir de l'antibiogramme afin de mettre en évidence des colonies repoussant dans la zone d'inhibition (cf schéma ci-dessous). La technique a été développée pour 4 antibiotiques : lévofloxacine, érythromycine, azithromycine, rifampicine, avec une standardisation de l'inoculum bactérien. Seule la lévofloxacine, antibiotique bactéricide, a permis d'obtenir des résultats satisfaisants à l'étape de mise au point. Nous avons ensuite étudié 10 souches de ST1 versus 10 souches de ST23, sur la base des résultats préliminaires obtenus par notre équipe (Adams-Ward X. *et al.*, 2023). Nous avons observé une variabilité importante au sein de chaque ST. Les résultats n'ont pas montré de différence significative entre les ST1 et ST23. Ces résultats ont été associés à un défaut de reproductibilité inter-essais, suggérant que la

technique REPTIS n'est pas suffisamment robuste pour identifier des *persisters*, et ne permet pas de conclure quant à une adaptabilité supérieure des souches de ST1 à persister.

*Etude de l'impact des biocides sur *Legionella* et conséquences sur 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). Dans ce contexte, en 2023, nous avons initié des travaux afin de caractériser la sensibilité de souches de *Legionella* à divers micro-polluants: triclosan (TCS), glyphosate, pesticides (atrazine-ESA, métolachlore). Seules les CMI du triclosan étaient proches des concentrations retrouvées dans l'environnement; nos travaux se sont ainsi poursuivis sur cette molécule uniquement.

Le triclosan est un biocide utilisé pour ses propriétés anti-bactériennes et antifongiques. En inhibant une enoyl-acyl carrier protein (ACP) NADH-dépendante, FabI, par la formation d'un complexe inactif triclosan / NAD⁺ / FabI, le triclosan perturbe la dernière étape de la synthèse des acides gras et ainsi de la membrane cellulaire bactérienne. Il entre dans la formulation de nombreux produits du quotidien tels que les produits d'hygiène personnelle (savons, shampoings, crèmes, dentifrices, déodorants, cosmétiques...), les produits ménagers (produits de nettoyage, textiles, ustensiles de cuisine, sacs poubelles...), les produits à usage médical (désinfectants, antiseptiques, savons, gants, dispositifs médicaux...) et les articles de loisir (vêtement et articles de sport, jouets...). Il est retrouvé ainsi sans surprise dans l'environnement, à des concentrations de l'ordre du ng/L à plusieurs dizaines de µg/L dans les eaux de surfaces (lacs, rivières, ruisseaux), les eaux souterraines, les affluents et effluents d'usines de traitement des eaux usées, mais aussi l'eau du robinet... et jusqu'à des valeurs de l'ordre du mg/L dans les biosolides. Reflet d'expositions répétées et de bio-accumulation chez l'Homme, le TCS est retrouvé à des concentrations de l'ordre de plusieurs dizaines de µg/L dans les liquides biologiques humains de type lait maternel ou urine.

En 2023, les travaux de notre équipe (Coralie Espinasse, interne en Master 2 et Année de Recherche) ont permis :

- de caractériser la sensibilité d'un panel de 111 souches cliniques et environnementales de Lp de sérogroupes et ST variés ; nous avons montré une distribution des CMI de 0,016 à 0,125 mg/L pour le panel de souches étudiées (médiane : 0,031 mg/L)
- de générer 8 lignées indépendantes par évolution expérimentale sous pression de sélection par du triclosan.

Nous avons observé des mécanismes adaptatifs incluant des mutations of *fabI* (8 lignées / 8), associées à des CMI de triclosan multipliées par un facteur 4 à 64. De façon intéressante, 4 des 8 populations évoluées ont présenté des mutations dans *pmrA/B*, un régulateur transcriptionnel global. Des mutations additionnelles ont été identifiées dans d'autres gènes impliqués dans le système Dot/Icm la transcription, la division cellulaire... Ces résultats sont en cours d'investigation et font fait l'objet d'une communication orale internationale (ESGLI meeting) et d'une communication affichée au congrès SFM en 2023.

L'objectif à plus long terme est d'appréhender l'impact des biocides sur plusieurs paramètres du cycle d'infection par *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, et de caractériser un effet potentiellement aggravant d'un tel micro-polluant dans le processus infectieux chez l'Homme.

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. Participation au Bulletin de Santé Publique (BSP) auvergne Rhône Alpes, mars 2023, Légionellose. Partie Microbiologie Ghislaine Descours, Laetitia Beraud, Camille Allam, Anne-Gaëlle Ranc, Marine Ibranosyan, Christophe Ginevra, Sophie Jarraud.

Publications internationales

1. Hyper-inflammatory profile and immunoparalysis in patients with severe Legionnaires' disease. Allam C, Mouton W, Testaert H, Ginevra C, Fessy N, Ibranosyan M, Descours G, Beraud L, Guillemot J, Chapalain A, Albert-Vega C, Richard JC, Argaud L, Friggeri A, Labeye V, Jamilloux Y, Freymond N, Venet F, Lina G, Doublet P, Ader F, Trouillet-Assant S, Jarraud S. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Oct 27;13:1252515. doi: 10.3389/fcimb.2023.1252515.
2. The respiratory tract microbiome, the pathogen load, and clinical interventions define severity of bacterial pneumonia. Pérez-Cobas AE, Ginevra C, Rusniok C, Jarraud S, Buchrieser C. Cell Rep Med. 2023 Sep 19;4(9):101167. doi:10.1016/j.xcrm.2023.101167.
3. Bacterial persistence in *Legionella pneumophila* clinical isolates from patients with recurring legionellosis. Adams-Ward X, Chapalain A, Ginevra C, Jarraud S, Doublet P, Gilbert C. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Aug 1;13:1219233. doi: 10.3389/fcimb.2023.1219233.
4. Hiding in the yolk: A unique feature of *Legionella pneumophila* infection of zebrafish. Viana F, Boucontet L, Laghi V, Schator D, Ibranosyan M, Jarraud S, Colucci-Guyon E, Buchrieser C. PLoS Pathog. 2023 May 8;19(5):e1011375. doi: 10.1371/journal.ppat.1011375.

5. Intracellular persisters: A stealth agent recalcitrant to antibiotics. Personnic N, Doublet P, Jarraud S. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Mar 31;13:1141868. doi: 10.3389/fcimb.2023.1141868.
6. Rapid adaptations of *Legionella pneumophila* to the human host. Leenheer D, Moreno AB, Paranjape K, Murray S, Jarraud S, Ginevra C, Guy L. *Microb Genom.* 2023 Mar;9(3):mgen000958.

Communications nationales orales

Communications nationales affichées

1. PCR *Legionella* triplex simplifiée par l'utilisation de barrettes PCR pré-remplies. Beraud L, Chastang J, Ibranosyan M, Ginevra C, Descours G, Jarraud S. 4ème RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie anti-infectieuse), Paris, Décembre 2023.
2. Characterization of the susceptibility and adaptive mechanisms of *L. pneumophila* to triclosan. Espinasse C, Ginevra C, Ibranosyan M, Amdouni I, Jarraud S, Descours G. *Microbes 2023*, SFM Rennes, Sept 2023.

Communications Internationales orales

1. Evaluation of Sensititre 96-well plates for *Legionella* antimicrobial susceptibility testing. Descours G, Poinot V, Clerc M, Marie A, Ibranosyan M, Beraud L, Ginevra C, Jarraud S. 7th ESGLI meeting, 23-24 October 2023, Ghania, Crête.
2. Susceptibility and adaptive mechanisms of *L. pneumophila* to triclosan. Espinasse C, Ginevra C, Ibranosyan M, Amdouni I, Jarraud S, Descours G. 7th ESGLI meeting, 23-24 October 2023, Ghania, Crête.
3. Legionnaires' disease surveillance: comparison of clinical and environmental strains in France, 2008-2022. Campese C, Allemand M, Ibranosyan M, Ginevra C, Allam C, Savitch Y, Jarraud S, Descours G, Beraud L. 7th ESGLI meeting, 23-24 October 2023, Ghania, Crête.
4. European evaluation of 16 assays for the detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples from patients with pneumonia. Jarraud S, Uldum S, Jørgensen C, Allam C, Beraud L, Descours G, Ricci ML, Scaturro M, Girolamo A, Petzold M, Euser S, Michel C, Echahidi F, Kese D, Chalker Vi, Gaia V. 7th ESGLI meeting, 23-24 October 2023, Ghania, Crête.

Communications Internationales affichées

1. In-house *Legionella* PCR as easy as commercial kit. Beraud L, Chastang J, Ibranosyan M, Ginevra C, Descours G, Jarraud S. 7th ESGLI meeting, 23-24 October 2023, Ghania, Crête.

Conférences sur invitation à des congrès nationaux

Conférences sur invitation à des congrès Internationaux

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

Coopération avec les laboratoires environnementaux.

Nous avons travaillé avec 62 laboratoires en 2023.

*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.

* 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. Une étude européenne de l'évaluation des kits PCR est en cours de discussion *via* le réseau ESGLI ou *via* le futur laboratoire européen EURL *Legionella* que nous coordonnerons à partir de 2025.

***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 2024.

* SUR LE PLAN DE LA SURVEILLANCE

* démarrage de l'**étude LEGIODOM** afin d'identifier la part des réseaux d'eau des domiciles dans les légionelloses sporadiques

* **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, voir Chapitre 2.2), 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. Ces travaux seront notamment menés dans le cadre d'un projet LEGIOHOME financé par le Fondation de France et du projet LEGIODOM qui ont pour objectif d'utiliser la capture spécifique de *Legionella* pour le typage des prélèvements négatifs en culture mais PCR positif notamment pour mieux identifier la part de l'exposition au domicile des cas de légionellose

* sur le plan de la **résistance aux antibiotiques**. En 2023, très peu d'antibiogrammes ont été réalisés par technique phénotypique alors même que le Comité des CNR nous avait encouragés à amplifier ces analyses. La surveillance a été poursuivie principalement sur la base des données de WGS. Il était programmé une étude européenne multi-centrique (ESGLI Grant, coordonnateur : Dr B. Spiller, 7 pays participants) afin d'harmoniser nos pratiques d'antibiogrammes; néanmoins, ces travaux n'ont pas été initiés. Devant des résultats satisfaisants obtenus avec la technique Sensititre (plaques réalisées à façon, rapport d'activité

2022), nous avons décidé de poursuivre avec cette technique. En 2024, notre objectif est d'analyser au moins les 2/3 des souches d'origine clinique isolées sur l'année, et de proposer cette technique à nos collègues européens.

* **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.

*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.

* **Etude de l'impact des perturbateurs endocriniens sur *Legionella* et conséquences sur la physiopathologie de l'infection.**

Une des questions actuelle est l'impact de la problématique de la micropollution environnementale par les perturbateurs endocriniens (PE) sur les cas de légionellose. Dans le prolongement des travaux initiés en 2023, nous souhaitons étudier l'impact de trois perturbateurs endocriniens (PE), le triclosan et deux phtalates (le DBP et l'ATBC), seuls et en association, à des concentrations faibles décrites dans l'environnement (ordre du µg/L) sur *Legionella* afin de : (i) déchiffrer les réponses adaptatives de *Legionella* aux PE et (ii) étudier l'impact de ces PE sur les différents paramètres du processus infectieux : prolifération de *Legionella* dans l'environnement au contact des amibes, formation de biofilms, infectiosité pour les cellules humaines, induction d'une réponse inflammatoire, sensibilité aux antibiotiques. Ces études seront menées en collaboration avec les équipes Microorganismes – Hôtes – Environnements, Ecologie et Biologie des Interactions, CNRS UMR7267, Université de Poitiers (Dr Julien Verdon) et ANABIO-MS, Institut des Sciences Analytiques, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5280 (Pr Jérôme Lemoine). A plus long terme, les résultats obtenus, confrontés à des données d'exposome (mode de vie et de consommation des patients, données de micropollution par PE du territoire habité, dosages de PE dans les urines des patients), visent une meilleure compréhension de l'épidémiologie de la légionellose : émergence de clones, répartition géographique sur le territoire, sévérité chez certains patients.

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 6.

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

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

Noms et qualifications	Coordonnées
Sophie Jarraud (directrice) PH - IAI PU - Faculté de Médecine Lyon Est	Tél : 04 72 07 16 38 sophie.jarraud@chu-lyon.fr
Ghislaine Descours (directrice adjointe) PH - IAI MCU - Faculté de Pharmacie Lyon	Tél : 04 72 07 16 50 ghislaine.descours@chu-lyon.fr
Laetitia Beraud (qualité) PH - IAI	Tél : 04 72 07 18 44 laetitia.beraud@chu-lyon.fr
Marine Ibranosyan AHU – IAI Faculté de Médecine Lyon Sud	Tél : 04 72 07 16 71 marine.ibranosyan@chu-lyon.fr
Brune Joannard Assitant Spécialiste - IAI	Tél : 04 72 07 18 59 brune.joannard@chu-lyon.fr

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

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

Cadre	
Laetitia Dubost	laetitia.dubost@chu-lyon.fr

Secrétaires	Tél : 04 72 07 11 45, Fax : 04 72 00 37 54
Manon Robert	manon.robert01@chu-lyon.fr
Blandine Bavotot	blandise.bavitot@chu-lyon.fr

H : hospitalier, U : universitaire

A ces personnes s'ajoutent Florence Ader, Infectiologue au service des Maladies Infectieuses à Lyon et membre de l'équipe Legiopath, qui participe ponctuellement sur sa fonction universitaire à l'activité du CNR des légionelles.

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 m² est occupé par la Microbiologie :

- le R+5 de l'IAI est occupé par les laboratoires L3 (Virologie, Mycobactéries, Biotox), la virologie cellulaire, les CNR de Virologie ; la mise en place d'une plateforme de séquençage a démarré en 2020
- le R+4 est dévolu au plateau de Biologie Moléculaire Infectieuse (manuelle et automatisée, dont une partie génomique) ;
- le R+3 est occupé par le plateau de Bactériologie automatisée 24/24 ;
- le R+2 est occupé à moitié par le plateau de Biochimie – Hématologie 24/24 et par le plateau de Sérologie Infectieuse manuelle et automatisée ;
- le R+1 héberge le **CNR des Staphylocoques**, le **CNR des Légionelles**, l'hygiène environnementale et la Parasitologie – Mycologie non automatisée.

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

Principaux équipements

Sur le plan des équipements, les principaux équipements dont dispose le CNR, qu'ils aient été acquis sur des crédits SpF ou du fait de la mutualisation avec les autres secteurs du laboratoire, sont ceux d'un laboratoire de microbiologie ayant des approches moléculaires et cellulaires. Ainsi, entre les laboratoires hospitaliers et universitaires, le CNR a accès à tout 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'analyse 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.

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 7.

Tableau 7. Modalités de stockage de la collection du CNR.

TYPE D'ECHANTILLON	Conservation	T°	Durée
Tout prélèvement « important »	Tubes NUNC	-20°	Infinie
LBA, LCR, Hémoc, Biopsie, ... si culture et/ou AgU + si culture et/ou AgU -	200 µL pour PCR + tubes NUNC	-20°C / -80°C depuis 2023	Infinie
Urines positives et importantes	Tube stérile à hémolyse	-20°C	Infinie

Sérums positifs et intéressants	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	Infinie
Autre sérums	Tube stérile à hémolyse ou tube d'origine	-20°C	1 an
Souches extérieures	Contenant d'origine	amb.	Jusqu'aux résultats
Terre, Boue,...	Contenant d'origine	+5°	1 mois
SOUCHES			
CLINIQUES : - reçues d'un laboratoire extérieur - 1ère colonie isolée d'un prélèvement clinique	1 émulsion dans sang de mouton 1 émulsion sur billes	-80°C	Infinie
	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
CLINIQUES : - colonie 2 à 5 si disponible	1 émulsion sur billes	-20°C	Infinie
ENVIRONNEMENTALES	2 émulsions sur billes mises chacun dans un congélateur différent	-20°C -80°C	3 ans
REFERENCE	3x5 émulsions sur billes 1 émulsion dans sang de mouton	-80°C -20°C	Infinie
EAUX	1 émulsion sur billes	-20°C	3 ans
ADN			
ADN de souches	Microtubes	-20°C	Infinie
ADN de prélèvements	Microtubes	-20°C	5 ans depuis 2023
ADN des eaux	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 suivis 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 (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).

Lors des évaluations de kits au CNR, l'utilisation d'échantillons de patients doit être précédée de la sollicitation de l'avis scientifique et éthique du Comité d'Éthique 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 séquencées (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 utilisés.
- ✓ 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 8. Collections de souches, sérums et autres prélèvements au CNR des Légionelles.

Collection ou stockage échantillons	Nombre approximatif d'échantillons	conditions de conservation température
Sérums	9919	-20°C
Souches patients	9074	-20°C et -80°C
Souches environnementales	30774	-20°C et -80°C
Souches de référence	206	-20°C et -80°C
Sérums de lapins immunisés	4310	-20°C
Antigènes produits pour le sérodiagnostic	200	4°C et -20°C
Prélèvements pulmonaires (LBA, crachats, aspirations...)	11285	-20°C / -80°C depuis 2023
Urines	1731	-20°C
ADN (prélèvements pulmonaires)	6200	-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 (à partir des données de WGS) ; l'antigénurie *Legionella* par immuno-chromatographie 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 18).

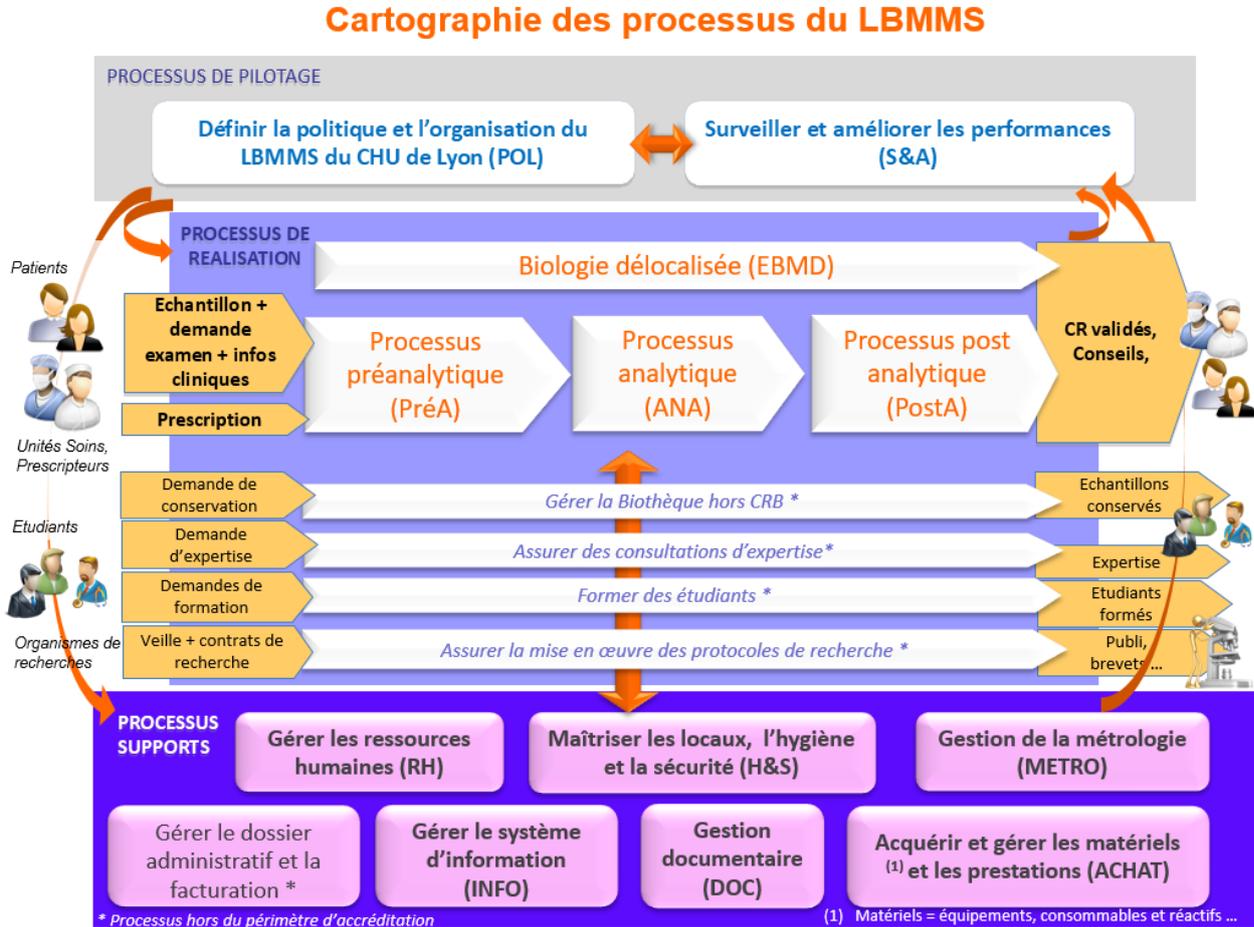


Figure 18. Cartographie des processus (issue du Manuel Qualité MU-POL-MQ-001).

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

La figure 19 représente un extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'Institut des Agents Infectieux (valide au 13 juillet 2023).

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.

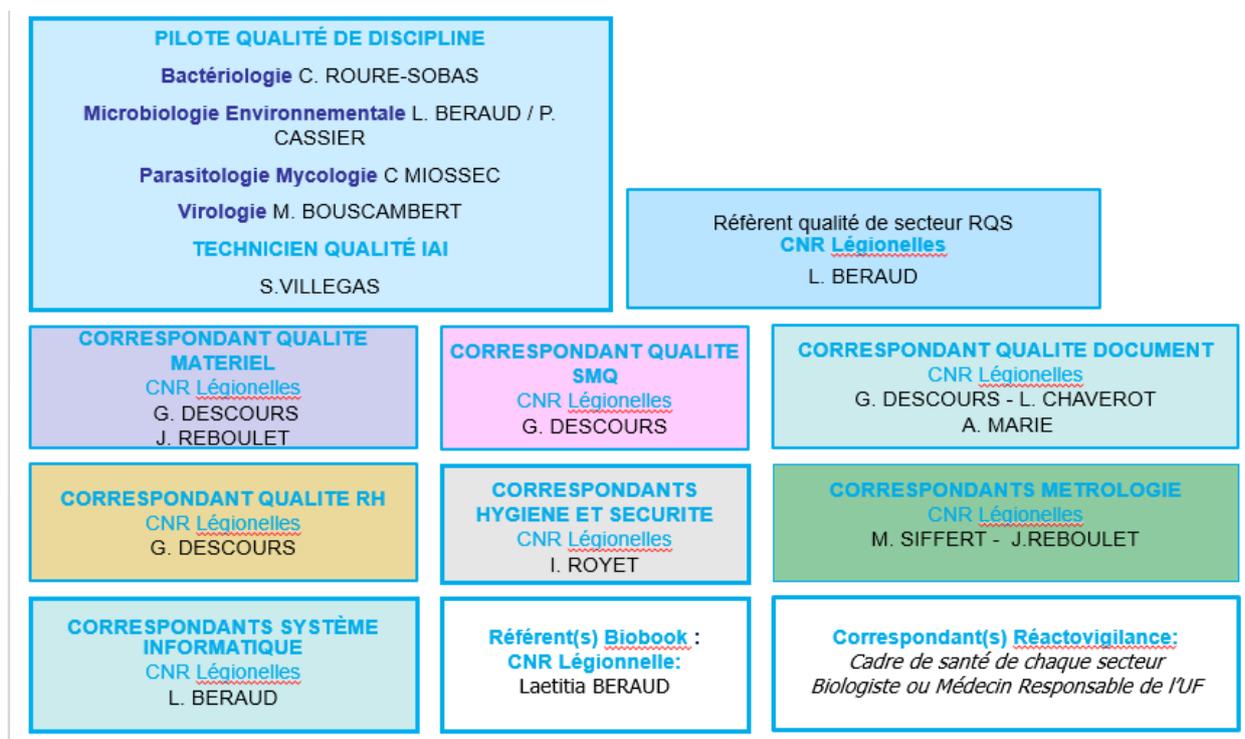


Figure 169. Extrait de l'organigramme qualité du laboratoire de l'institut des Agents Infectieux.

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. Les techniques de sérologies sont suivies depuis 2019 grâce à l'EEQ RCPAQAP (2 échantillons, 2 fois par an). Pour le suivi des PCR *Legionella*, l'EEQ fournis par QCMD est utilisé depuis 2017 (10 échantillons, 1 fois par an). Ces échantillons permettent un suivi de nos 2 techniques de PCR accréditées (Diag ciblant L.spp et Lp et ESGLI ciblant Lp et Lp1), 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 1 à 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). En 2023, le CNR a également participé à l'EEQ d'Aglae pour la recherche de *Legionella* dans les eaux propres en culture. Cette participation était souhaitée enfin de comparer nos résultats à un groupe de paire plus représentatif de notre technique (la norme française NFT90-431) mais ne nous a pas apporté, elle n'a donc pas été renouvelée en 2024.

Tous les résultats d'EEQ sont analysés et revus régulièrement.

Audits

Dans le cadre de l'accréditation selon la norme 17025 et 15189, 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 décembre 2023 et dernier audit 15189 effectué en septembre 2023).

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 juin 2023, un audit a été réalisé concernant la mise en culture des eaux pour recherche de *Legionella*.

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 (182 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 2023, le CNR a changé ses techniques de PCR à la fois en clinique et sur les eaux. L'accréditation a été 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 amibien** réalisée en milieu PAS (Page's amoebic saline) ou par la technique *Amoebae Plate Test* (Test APT) nouvellement développée par le CNR et qui est la méthode utilisée depuis 2015.

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

H. 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 :
 - o Depuis 2023, **PCR L.spp et Lp** en temps réel maison ciblant les gènes 16s et mip, adaptée de la publication Templeton *et al.* ; J Clin Microbiol 2003.
 - o **PCR Lp/Lp1** en temps réel, développée par le groupe Européen ESGLI (Mentasti *et al.* ; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015).

Ces deux PCR triplex (2 cibles *Legionella* et un Contrôle interne) sont réalisées sur QuantStudio.

- o **PCR universelle 16S** pour les produits pathologiques provenant de sites habituellement stériles
- o **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.
- o **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. Depuis 2022 est utilisée une **PCR 23S-5S NGS** permettant d'identifier des co-infections (publication en cours)

***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) et par amplification et **séquençage de l'espace intergénique 23S-5S**. L'identification des souches à partir des données de NGS est maintenant privilégié (par comparaison des séquences du génome netier à une base de données locale).
- Identification des *Legionella* par la méthode **MALDI-TOF-MS*****. Le CNR dispose actuellement de MALDI-TOF (VITEK MS base sous la version 3.2)

Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, Etienne J, Fournier PE. *J Med Microbiol.* 2010;59:273-84.
Ginevra C, Dauwalder O, Baida N, Meugnier H, Freydiere AM, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S. Communication affichée, 28^{ème} RICA 2009, Paris.

Dauwalder , Ottaviani, R, Maffre I, Miclot A, De 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 séquençées

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®)***, puis BioRad depuis 2024.

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

- 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 DNAPrep, séquençage paired-end 2x150pb, sur le séquenceur NextSeq (Illumina) de la plateforme GenEPII des HCL.

Interprétation : obtention du Sequence Type (ST)^{***}, 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) ; présence ou non du gène *lag-1* et identification du variant *lag-1*.

- Depuis la réalisation du WGS en systématique sur les souches, l'analyse des données extraites a permis de remplacer les autres méthodes antérieures. Ces méthodes plus utilisées pourraient être réactiver si besoin :
 - o « *Sequence Based Typing* » (SBT), méthode de référence Européenne, correspondant à une amplification et à un séquençage de 7 gènes
 - o Typage phénotypique par ELISA ou immunofluorescence, réalisé à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux (mAbs) de Dresden de 24 mAbs permettant le sous-groupage des *L. pneumophila* séro groupe 1 en 9 sous-groupes (souche Philadelphia, Knoxville, Olda, Oxford, etc.)
 - o Identification des isolats porteurs du gène *lag-1* par PCR
 - o Identification des souches ST1 par PCR spécifique (Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. Clin Microbiol Infect. 2020 Apr;26(4):514.e1-514.e6)

*****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.

- PCR spécifique ST1 et ST47
 - o Ginevra C, Chastang J, David S, Mentasti M, Yakunin E, Chalker VJ, Chalifa-Caspi V, Valinsky L, Jarraud S, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). A real-time PCR for specific detection of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 ST1 complex. Clin Microbiol Infect. 2020 Apr;26(4):514.e1-514.e6)
 - o Mentasti M, Cassier P, David S, Ginevra C, Gomez-Valero L, Underwood A, Afshar B, Etienne J, Parkhill J, Chalker V, Buchrieser C, Harrison TG, Jarraud S; ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI). Rapid detection and evolutionary analysis of Legionella pneumophila serogroup 1 sequence type 47. Clin Microbiol Infect. 2017 Apr;23(4):264.e1-264.e9. doi:10.1016/j.cmi.2016.11.019. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27915212.

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 20.

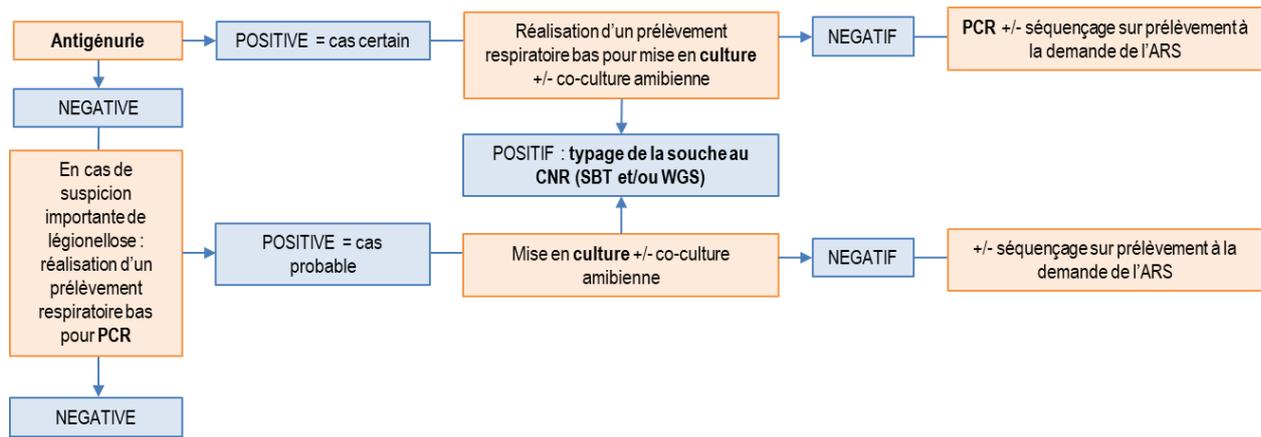


Figure 20. Proposition de conduite à tenir pour le diagnostic des cas de légionellose.

- Détection des antigènes urinaires

- Pour toute urine détectée positive et quel que soit le réactif utilisé, il est recommandé de tester une seconde fois les urines après chauffage (5 minutes à 95°C +/- 5°C, puis centrifugation 15 min à 1000 g et analyse du surnageant).
- Pour certains réactifs, une concentration des urines avant analyse est fortement recommandée pour augmenter la sensibilité ; cette concentration peut être réalisée par ultrafiltration par centrifugation. Pour d'autres réactifs, ce prétraitement est proscrit.
- La présence de lecteur associé à certains tests du marché permet une traçabilité des résultats et des réactifs. Parfois les lecteurs apportent un gain de sensibilité à la technique.

- PCR

Elle fait partie des critères de définition d'un cas de légionellose. Cette méthode sera employée en première intention ou en seconde intention si l'antigénurie est négative et associée à une forte suspicion de légionellose. 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 CO₂ favorise la croissance de certaines espèces de légionelles mais n'est pas obligatoire. Par contre, une atmosphère avec 5% de CO₂ peut inhiber la croissance des légionelles.
- Le CNR souhaite **recevoir les prélèvements pulmonaires** en présence d'un diagnostic de légionellose (Ag urinaire ou PCR positive) :
 - si la culture est positive (envoi avec la souche)
 - si le laboratoire ne réalise pas la culture ou si celle-ci est négative
 - les analyses réalisées par le CNR dans un but épidémiologique ne seront pas facturées.

- Sérologie

Elle présente un intérêt limité depuis l'apparition des tests urinaires et de la PCR sur prélèvement pulmonaire. Le sérodiagnostic doit donc être limité à la présence d'une antigénurie négative associée à une forte suspicion de légionellose et en l'absence de prélèvement pulmonaire disponible.

- 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 séquençage du génome complet ;
- par agglutination de particules de latex pour *L. pneumophila* et les différents sérogroupes notamment le sg1 ;
- par immunofluorescence.

- Typage

- Whole Genome Sequencing et analyse basée sur la cartographie des Single Nucleotide polymorphism (SNP) : pour cette méthode une connaissance des génomes de *Legionella* peut être importante car cette méthode utilise le mapping des reads sur une souche de référence à identifier.
- Méthode standardisée au niveau européen : le *Sequence Based Typing*. La méthode SBT est décrite sur le lien www.ewgli.com et peut être utilisée par tout laboratoire.
- cgST basé sur l'analyse d'au moins 50 gènes choisis par le groupe de travail européen.

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
- Recherche de mutations entraînant la résistance à partir de séquençage de génome complet.

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