

PNEUMOPATHIES ET HIV A DAKAR

Performances des techniques d'identification des germes intracellulaires :

Chlamydia (Chlamydia) pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae et Legionella pneumophila

Sommaire

Introduction

Première partie : Généralités

I-Généralités

1-Les pneumopathies atypiques et VIH

2-Pathogénicité des germes atypiques

2-1-*Legionella pneumophila*

2-1-1Morphologie

2-1-2-Diagnostic bactériologique

2-2-*Chlamydomphila pneumoniae*

2-2-1-Généralités sur les chlamydiae

2-2-2-Classification

2-2-3-Diagnostic bactériologique

2-2-4-Sensibilité

2-3-*Mycoplasma pneumoniae*

2-3-1-Généralités

2-3-2-Diagnostic bactériologique

3-Rappel

3-1Définition du SIDA

3-2-Diagnostic bactériologique

4-Définition des paramètres de qualité d'un examen diagnostique

Deuxième partie : Méthodologie résultats commentaires et discussion

1-Cadre d'étude

2-Population cible

3-Matériel et méthodes

3-1-Matériels de laboratoire

3-1-1-Equipement de laboratoire

- 3-1-2-Réactifs de coloration des lames
- 4-Matériel de sérodiagnostic *Chlamydophila pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* IgG
 - 4-1-Composition de la trousse Platélia® *Chlamydophila pneumoniae*
 - 4-2-Composition de la trousse Platelia® *Mycoplasma pneumoniae*
- 5-Matériel de culture de *Chlamydophila pneumoniae*
 - 5-1-Réactifs utilisés pour l'entretien des cellules SP
 - 5-2-Matériel utilisés pour l'entretien des cellules SP
- 6-Méthodes
 - 6-1-*Legionella pneumophila* : Immunofluorescence directe (IFD)
 - 6-1-1-Principe
 - 6-1-2-Préparation des échantillons avant coloration
 - 6-1-3-Préparation d'un frottis pour le témoin positif
 - 6-1-4-Préparation d'un frottis pour confirmation de culture
 - 6-1-5-Procédure de coloration
 - 6-1-6-Examen des lames colorées
 - 6-1-7-Coloration de la qualité
 - 6-1-8-Evaluation des résultats du test
 - 6-2-*Legionella pneumophila* : Culture
 - 6-2-1-Composition des milieux utilisés
 - 6-2-2-Préparation des milieux de culture
 - 6-2-3-Contrôle de qualité des milieux de culture
 - 6-3-*Legionella pneumophila* : Recherche d'antigènes urinaires
 - 6-3-1-Principe
 - 6-3-2-Prélevements
 - 6-3-3-Technique et Réactifs utilisés
 - 6-3-4-Détection par la méthode ELISA spécifique sérotype 1

6-3-4-1-Principe

6-3-4-2-Procédure

6-3-4-3-Cinétique

6-4-Etapes de l'analyse bactériologique des prélèvements

6-4-1-Réalisation des prélèvements

6-4-2-Examen macroscopique

6-4-3-Traitement des prélèvements

6-4-4-Examen microscopique

6-4-5-Isolement

6-4-6-Identification

6-4-7-Sensibilité

6-5-*Mycoplasma pneumoniae* : Culture

6-5-1-Prélevement

6-5-2-Milieus de culture

6-5-3-Préparation des milieux pour l'isolement et l'identification

6-5-4-Principe de la culture sur milieux liquides et solides

6-5-5-Principe de la culture sur milieux diphasiques

6-6-*Mycoplasma pneumoniae* : Sérodiagnostic

6-6-1-Introduction

6-6-2-Principe

6-6-3-Prélèvement

6-6-4-Procédure

6-6-5-Interpretation des résultats

6-7-*Chlamydia pneumoniae* : Isolement

6-7-1-Culture cellulaire

6-7-2-Prélevement

6-7-3-Support

6-7-4-Milieus utilisés

6-7-5-Cellules utilisées

6-7-6-Entretien des cellules SP

6-7-7-Trypsination des cellules SP

6-7-8-Technique d'isolement de *Chlamydomphila pneumoniae*

6-7-9-Sensibilité aux antibactériens

6-8-*Chlamydomphila pneumoniae* : Sérodiagnostic

6-8-1-Prélevement

6-8-2-Techniques utilisées

Méthode ELISA : Détection des IgG sériques antichlamydiens

6-8-2-1-Principe

6-8-2-2-Procédure de la manipulation

6-8-2-3-Calculs et Interprétation des résultats

Recommandations

Discussion

Conclusion

Bibliographie

Annexe

Liste des abréviations

- VIH : virus de l'immunodéficience humaine
- SVF : sérum de veau fœtal
- ATB : antibiotiques
- MEM : milieu d'entretien
- M.p : *Mycoplasma pneumoniae*
- C.p : *Chlamydomphila pneumoniae*
- L.p : *Legionella pneumophila*
- SIDA: syndrome d'immuno- déficience acquise
- PCR: polymerase chain reaction
- ELISA: enzyme linked immuno-sorbent assay
- BG: bouillon glucosé
- BA :bouillon arginine
- PPLO : pleuro pneumonia like organism
- BCYE: buffer charcoal yeast extract
- IgG : immunoglobuline G
- IgA : immunoglobuline A
- Ig M : immunoglobuline M
- CDC : Center of Disease Control
- HALD : Hôpital Aristide Le Dantec.
- IFD : immunofluorescence directe
- UFC : unité formant de colonies

INTRODUCTION

L'une des caractéristiques majeures de l'infection à VIH est la survenue des infections opportunistes, au fur et à mesure que les défenses immunitaires de l'individu s'affaiblissent. Parmi ces infections, les pneumopathies atypiques dues à *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* et *Legionella pneumophila*, apparaissent avec une fréquence de 10 à 20% comme des affections en progression et en particulier dans le milieu hospitalier.

Les pneumopathies atypiques en association avec le SIDA, sévissent à plus de 95% dans les pays en développement et sont considérées comme un facteur de gravité et de risque de mortalité. Malheureusement, les recherches menées sur les bactéries atypiques donnent des résultats insuffisants (le plus souvent culture négative). Et dans la majorité des cas, elles sont présentes comme des pathogènes co-existants avec les germes fréquents à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*.

Une étude réalisée en Italy a montré que *Chlamydomphila pneumoniae* est une cause possible d'infections respiratoires sévères chez les immunodéprimés VIH+ et sa présence est suspectée lorsque les patients ne répondent pas au traitement à base de Bêta-lactamines ou bien au traitement anti-*pneumocystis carinii*. Par contre des études réalisées en Italy [19] ont montrés la rareté de *Mycoplasma pneumoniae* dans les prélèvements de sujets infectés par le VIH. De même, de nombreuses études faites aux USA[22], France[21], Italy[23] rapportent également la faible prévalence de *Legionella pneumophila* spécialement chez les séropositifs

L'incidence des pneumopathies est variable selon le pays et l'âge. Sous sa forme typique, le diagnostic est aisé et le pneumocoque reste le principal agent responsable chez les patients hospitalisés, dépassant généralement 50% des cas où l'étiologie a pu être identifiée [34-35].

En fait tout le problème vient des cas où l'étiologie n'a pu être identifiée, soit que les patients ont déjà reçu une antibiothérapie avant l'hospitalisation (les séropositifs), soit qu'aucune étiologie n'a pu être mise en évidence avec les explorations usuelles.

Ainsi, un diagnostic étiologique ne peut habituellement être obtenu que dans environ 50 à 70% des cas de pneumopathies communautaires. Une partie de ces infections non confirmées est attribuée souvent à une origine virale.

Notons que ces infections sont la 1^{ère} cause de mortalité d'origine infectieuse en l'absence de toute autre pathologie associée, avec une prévalence de 15/1000 habitants aux Etats-Unis[...]. Soulignant ainsi l'importance d'une prise en charge thérapeutique adaptée aussi précoce que possible. Il apparaît que l'antibiothérapie sera empirique dans environ la moitié des cas et le restera pour une bonne partie du traitement dans un autre quart.

Selon une étude américaine, cette situation n'a guère été modifiée dans les 10 dernières années, malgré l'affinement des techniques de diagnostic notamment la sérologie, la Biologie moléculaire. Cette dernière pourrait permettre un diagnostic rapide et fiable malheureusement non praticable en routine, surtout dans les pays à ressources limitées.

De plus, si sur le plan clinique, rien ne distingue une pneumopathie atypique d'une pneumopathie à pneumocoque, le clinicien manque en général d'arguments microbiologiques devant des échecs thérapeutiques qu'il se résigne à imputer aux germes atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*) ou alors les

arguments dont il dispose sont sérologiques et donc d'avantage rétrospectifs que diagnostiques.

La recherche des bactéries atypiques, demandée le plus souvent en cas d'échec thérapeutique ou de diagnostic inconnu se fait directement par culture après appréciation de la qualité du prélèvement à l'examen direct. Les investigations directes sont accompagnées de recherche d'anticorps de *Mycoplasma pneumoniae* et de *Chlamydomphila pneumoniae* dans le sérum. Les malades retenus selon les critères d'inclusion feront systématiquement un prélèvement d'urines, de 2 sérums (espacés de 15 jours) et de LBA/Aspiration bronchique si l'évolution du patient est défavorable.

L'utilisation des tests de laboratoire pour l'isolement et l'identification des bactéries intracellulaires apparaît difficilement praticable en routine compte tenu des difficultés d'obtention des prélèvements de bonne qualité et aussi en raison de longs délais de réponse. Par ailleurs, il n'est pas démontré qu'une documentation microbiologique influence d'une façon quelconque la prise en charge diagnostique et thérapeutique individuelle du patient. Il est dès lors raisonnable de penser que l'utilisation des tests de laboratoire pourrait probablement être limitée à quelques situations particulières telles que l'échec thérapeutique, la suspicion de rechute, une infection causée par un pathogène rare.

Au Sénégal, on ne dispose pas de statistiques fiables sur la mortalité due bactéries atypiques dans les centres hospitaliers et en particulier chez les séropositifs VIH. Toutefois une étude réalisée en 2002 sur des patients (enfants et adultes) souffrants d'infections respiratoires, a relaté une faible prévalence des *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydomphila pneumoniae* [...]. L'on ne dispose pas non plus de données sur la co-infection pneumopathies bactériennes-HIV.

Dans cette présente étude, nous nous proposons d'une part de comparer les techniques utilisées (la culture, Immunofluorescence directe, la sérologie) et dire celle qui permettra de donner aux bactéries atypiques leur juste place dans les pneumopathies communautaires au cours d'infection HIV(+) et d'autre part, d'étudier la performance des milieux de culture utilisés.

Pour atteindre notre objectif, nous allons dans un premier temps faire un rappel sur la pathogenèse des bactéries atypiques et sur l'infection à VIH puis nous exposerons les résultats obtenus avec les différents techniques.

GENERALITES

1-Pathogénicité des germes atypiques

* La légionellose due à *Legionella pneumophila*, est responsable chez l'adulte sain, d'une pneumopathie alvéolaire en foyer, semblable à celle due au pneumocoque, et de début brutal. Elle s'en distingue cliniquement par l'apparition d'une encéphalopathie, des signes digestifs et sa résistance aux pénicillines. On décrit chez les immunodéprimés, des formes nodulaires alvéolaires, des foyers multiples, mais surtout une évolution nécrosante avec une excavation du foyer de condensation pneumonique chez 30% d'entre eux..

* Le mycoplasme ou *Mycoplasma pneumoniae* peut entraîner une pneumopathie interstitielle de type virale mais également une broncho-pneumonie typique qui peut régresser en 48 heures sous traitement adapté (cyclines ou macrolides). La pneumopathie est rarement grave et survient souvent par petites épidémies.

* Chlamydie due à *Chlamydia pneumoniae*, est traitée comme les pneumopathies à Mycoplasme. Ces derniers se présentent essentiellement comme des pneumopathies en foyer, très semblable à la Légionellose à la fois sur le plan clinique et radiologique.

Leur gravité potentielle avec forte létalité pour les chlamydioses joint à leur sensibilité aux antibiotiques nous invitent à porter une attention particulière sur elles pour qu'elles fassent partie intégrante du diagnostic d'une pneumopathie en foyer aussi bien chez l'adulte sain que chez le malade atteint du Sida.

Notons que la fréquence de co-infections par les malades atteints de pneumopathies communautaires a été récemment soulignée [24].

Les co-infections à pneumocoque et *Legionella*; *Haemophilus* et *Staphylococcus aureus* sont connues depuis la réalisation des ponctions trans-trachéales et brossages télescopiques protégés [25] mais leur fréquence ne dépasse pas habituellement 10% à 15% des cas.

Récemment, Lierberman [24] et coll ont trouvé qu'un tiers des 346 patients consécutifs avaient une co-infection, dont la majorité était une association entre un pyogène classique et un germe atypique (*Legionella*, *Chlamydiae*, *Mycoplasma*).

Toutefois, les résultats négatifs des études bactériologiques des germes atypiques pour la plupart du temps ne plaident pas en faveur d'un rôle important des Légionelloses ou Chlamydie dans les pneumopathies communautaires. Les techniques nécessaires à leur isolement ne sont pas utilisées en routine dans les laboratoires d'analyses en raison :

- de la lourdeur de la prise en charge (réactifs sont très coûteux)
- les cultures sont difficiles car les germes atypiques sont très fragiles et exigeants.
- la lenteur des cultures : 21 jours *M. pneumoniae*

10 jours *L. pneumophila*

LEGIONELLA PNEUMOPHILA

1-Morphologie

Les legionelles sont des bactéries exigeantes, nécessitant l'utilisation de milieux spécialisés. Le milieu de base est le milieu BCYE contenant de la cystéine, du fer et du charbon. Les legionelles sont des bacilles à Gram négatif faiblement colorés, aérobies stricts dont la croissance est favorisée par la présence de CO₂ (25%).

2- Diagnostic bactériologique

Devant toute pneumonie accompagnée d'un des critères suivants la recherche des légionelles doit être demandée :

- Absence d'amélioration sous traitement par les antibiotiques de la famille des Bêta-lactamines
- Patient présentant un terrain favorisant
- En présence d'une pneumonie nosocomiale
- Voyageurs
- Exposition professionnelle à l'eau

Le diagnostic peut être réalisé par :

- Immunofluorescence directe (IFD) :

Avantages : Permet un diagnostic rapide (moins de 4 heures)

Inconvénients :

Sensibilité faible : 25 à 40 % avec un seuil de détection de 10⁴ UFC/ml

Spécificité faible : 60 à 70 %, les inconvénients sont liés à des réactions immunologiques croisées avec certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bordetella pertussis*, *Bacteroides fragilis*.

IFD réalisé à partir du prélèvement microbiologique (lavage broncho-alvéolaire, aspiration bronchique) ou de la culture en cas de confirmation.

- Recherche des antigènes solubles dans les urines :

Cette recherche est primordiale car elle permet un dépistage rapide et précoce des cas de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1. Antigènes détectés 1 à 3 jours après le début des troubles. Cet antigène est un lipopolysaccharide (LPS).

Spécificité : 99%

Sensibilité : 80%.

La concentration des urines avant analyse permet d'augmenter la sensibilité sans affecter la spécificité.

Seules les légionelloses à *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 sont diagnostiquées (plus de 80% des cas).

- Isolement :

Devant toute recherche d'antigène urinaire positive et en présence d'une pneumonie, la légionellose est confirmée par l'isolement de la souche par culture. Le prélèvement le mieux adapté et donnant le plus fort taux de positivité est le lavage broncho-alvéolaire. En cas de suspicion de légionellose, tout prélèvement broncho-pulmonaire doit être ensemencé même en l'absence de polynucléaires.

Legionella ne se cultive pas sur gélose au sang.

On utilise des milieux très spécialisés :

Milieux sélectifs *Legionella* : BCYE + VC

Milieux non sélectif *Legionella* : BCYE

Milieux sans L- cysteine

BCYE (Buffer, Charcoal, Yeast, Extract)

Délai de réponse : 10 jours.

Cf : Matériel & méthodes

- Sérologie :

La technique d'immunofluorescence indirecte reste la méthode de référence, mais des techniques d'ELISA sont proposées.

Avantages :

Cette méthode permet le diagnostic de légionelloses dues à des espèces ou des sérogroupes de *legionella* non diagnostiqués par une recherche d'antigène urinaire ou difficilement isolés par culture.

Inconvénients :

- Ne permet qu'un diagnostic tardif voire rétrospectif.
- De nombreuses réactions croisées en IFI ont été décrites : avec mycobactéries, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Citrobacter*

Quelques cellules où la culture des *Legionella* est possible :

- cellules de mammifères : Hela ; Mc Coy ; Hep-2
- cellules de protozoaires : *Acanthamoeba* (5 espèces)

Echinamoeba

Hartmanella (2 espèces).

CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE

1-Taxonomie et caractéristiques bactériologiques [3,5,7,14]

Ce sont des eubactéries à développement intracellulaire obligatoire rencontrées chez l'homme et l'animal.

Chez l'homme deux espèces, spécifiquement humaines sont responsables d'infections génitales et respiratoires : *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia pneumoniae*

La famille des Chlamydiaceae comprend 2 genres et 9 espèces

-Le genre *Chlamydia* comprend 3 espèces dont une seule rencontrée chez l'homme , *C. trachomatis*.

-Le genre *Chlamydophila* regroupe 6 espèces. Deux sont rencontrées chez l'homme ,*C.pneumoniae* et *C. psittaci*.

*L'espèce, *C. pneumoniae* est divisée en biovars, le biovar TWAR étant spécifiquement humain.

*L'espèce, *C. psittaci* comprend des souches variées isolées chez les oiseaux sauvages (perroquets) ou domestiques (perruches) et les volailles (canards , poulets).

Les *Chlamydia* existent sous 2 formes caractéristiques :

*Le corps élémentaire (CE), forme infectieuse, extracellulaire, incapable de se multiplier

*Le corps réticulé (CR), intracellulaire, non infectieux.

Le cycle de développement comprend plusieurs étapes (schéma) :

- 1.Attachement et entrée du CE dans la cellule hôte
- 2.Différenciation du CE en CR
- 3.Multiplication du CR dans l'inclusion cytoplasmique
- 4 .Différenciation des CR en CE
- 5.Sortie des CE par éclatement de la cellule

Remarque : Dans certaines conditions , en particulier en présence de cytokines comme l'interféron , le cycle de développement est altéré. La bactérie persiste au sein de la cellule dans un état anormal. La bactérie ne peut plus se multiplier mais sa persistance contribuerait à l'installation d'une infection chronique responsable de séquelles caractéristiques, de diagnostic et de traitement difficiles.

2-Classification

	<i>C trachomatis</i>	<i>C pneumoniae</i>	<i>C psittaci</i>	<i>C pecorum</i>
GC %	42-45	40	39-43	36,3
Pouvoir pathogène chez l'homme	Trachome Infections oculogénitales et LGV (MST)	Pneumopathies	Pneumopathies	Pneumopathies
Hôte naturel	Homme	Homme	Oiseaux et Mammifères	Bovins Ovins
Cibles cellulaires	Epithélium conjonctival et génital	Epithélium respiratoire	Epithélium respiratoire	Epithélium respiratoire
Mode de transmission	Contact	Aérosol	Aérosol	Aérosol
Caractéristiques de l'inclusion Morphologie	Arrondie unique	arrondie	Variable multiple	Variable dense
Glycogène	+	-	-	-
Synthèse folates	+	-	-	-

3- Diagnostic bactériologique

Le diagnostic direct :

- Coloration de Giemsa sur frottis montrant des inclusions en cas de positivité .

- Recherche d'antigènes par la méthode ELISA : méthode efficace mais peu sensible et nécessitant une confirmation par une autre technique
- La mise en culture sur les cellules : technique très lourde, de référence mais difficile à standardiser .

Le diagnostic sérologique est possible surtout par immunofluorescence indirect. Son intérêt est limité en raison de communautés antigéniques et de la fréquence des infections particulièrement respiratoires.

4- Sensibilités aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques ou antibiogramme ne se fait pas en routine. Les *Chlamydia* présentent une résistance naturelle aux antibiotiques actifs sur la paroi (car dépourvues de peptidoglycane) tels que les bêta-lactamines, les glycopeptides. Les antibiotiques actifs sont ceux qui ont une bonne pénétration cellulaire tels les tétracyclines, les macrolides, les fluoroquinolones de dernière génération et la rifampicine. Les résistances acquises sont exceptionnelles.

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

1-Taxonomie et caractéristiques bactériologiques [35, 36, 37]

Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi, ce qui leur confère une grande plasticité et une extrême fragilité dans le milieu extérieur, ainsi qu'une résistance essentielle aux Bêta-lactamines. Elles sont très fines (0,3µm) et donc traversent les filtres de porosité 0,22µm.

Ils se multiplient in vitro sur des milieux acellulaires, ce qui les distingue des virus. Lorsqu'ils se multiplient in vitro dans des milieux contenant des cellules, ils restent extracellulaires. Il semblerait cependant qu'un parasitisme intracellulaire dans certaines conditions in vivo ait été observé.

Différentes espèces

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des Mollucites, terme faisant référence à l'absence de paroi. Le type respiratoire est micro-aérophilie, voire anaérobie, pour la majorité des espèces. Cependant, certaines tel que *M. pneumoniae*, tolèrent l'anaérobiose.

Classification de la Classe des Mollucites (Mycoplasmes)

Ordre des *Mycoplasmataceae*

Famille *Mycoplasmataceae*

Genre *Mycoplasma* avec 85 espèces

Genre *Ureaplasma* avec 5 espèces

Ordre des *Entomoplasmataceae*

Famille *Entomoplasmataceae*

Famille *Spiroplasmataceae*

Ordre des *Acholeplasmataceae*

Ordre des *Anaeroplasmataceae*

Remarque : On distingue encore de ces micro-organismes qu'ils ont une aptitude à coloniser les muqueuses ou les tissus pendant des périodes prolongées : plusieurs mois, voire plusieurs années, même après traitement par un antibiotique.

2- Principales propriétés des mycoplasmes respiratoires isolées chez l'homme

Sites/Especies	Pouvoir pathogène	Fréquence d'isolement par culture	Glucose	Métabolisme Arginine	Urée
<i>M.pneumoniae</i>	+	Rare	+	-	-
<i>M.salivarius</i>	-	Fréquent	-	+	-
<i>M. orale</i>	-	Fréquent	-	+	-
<i>M.buccale</i>	-	Rare	-	+	-
<i>M.faucium</i>	-	Rare	-	+	-
<i>M.lipophilum</i>	-	Rare	-	+	-
<i>M.laidlawii</i>	-	Très rare	+	-	-

3-Diagnostic bactériologique

Ce diagnostic sera évoqué devant une pneumopathie, quel que soit l'âge du patient ou la gravité de l'atteinte .

Plusieurs techniques sont mises en œuvre :

- Culture sur Milieux liquides (bouillon glucosé)

Bouillon PPLO

- Milieux solides : PPLO agar
- Milieux diphasiques : H. agar diphasique

La détection de *M. pneumoniae* dans les produits pathologiques est un argument de grande valeur parce que ce germe n'appartient pas à la flore commensale. Malheureusement, l'isolement n'est pas souvent réalisé pour diverses raisons :

- peu de laboratoires pratiquent la culture
 - la réponse est longue à obtenir (2 à 3 semaines)
 - Le praticien pense peu à *M. pneumoniae*, la suspicion d'une legionellose ou d'une pneumococcie prévalent très largement sur celle d'une Mycoplasmosé
- la sérologie est la méthode diagnostique de loin la plus employée.

On distingue parmi les différentes méthodes :

- réactions de fixation du complément
- réactions d'immunofluorescence
- réactions d'hémagglutination conditionnée
- réactions d'ELISA (réalisée dans cette étude)

D'exécution aisée, ces techniques peuvent pécher par défaut de spécificité. Cependant l'ELISA théoriquement plus sensible n'ayant pas encore fait totalement ses preuves au plan de la spécificité.

4-Sensibilité des antibiotiques (14).

La sensibilité aux antibiotiques de *M.pneumoniae* est exceptionnellement recherchée. De très rares cas de résistance aux macrolides ont été décrits. Les mycoplasmes ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques (bêta-lactamines, rifampicine, polymyxine).

Rappel sur l'infection à VIH

1-Définition du SIDA

Immunodéficiéncé cellulaire acquise, associée à l'infection par le virus de l'immunodéficiéncé humaine (VIH). Elle correspond à :

- Un nombre de lymphocytes T CD4⁺ < 200 cellules/ microlitre ou < 14% des lymphocytes totaux
- Une augmentation de la susceptibilité aux infections opportunistes
- L'apparition de néoplasies

Les manifestations cliniques incluent des pertes de poids (diarrhées) et une démence. Ces éléments correspondent à la classification SIDA du CDC.

2-Classification

Les VIH appartiennent à la famille des RETROVIRIDAE, c'est à dire des virus à ARN présentant une transcriptase inverse leur permettant de produire des ADN bicaténares dans la cellule hôte et à la sous-famille des LENTIVIRINAE.

Ce sont des rétrovirus exogènes qui ont été subdivisés en 7 genres regroupant les 3 sous-familles selon l'ancienne classification. Une nouvelle classification permet, en considérant la pathogénicité, d'obtenir 2 sous-famille dont les ORTHRETROVIRINAE regroupant les 6 genres (α rétrovirus, β rétrovirus, γ rétrovirus, δ rétrovirus, ϵ rétrovirus, lentivirus) et les SPUMARETROVIRINAE avec le genre spumavirus non pathogène [54]

3-Transmission

La transmission suit trois voies principales :

- les contaminations néonatales ou post natales par l'allaitement
- les administrations de sang ou de dérivés de sang contaminés : transfusion, partage de drogue injectable, administration de facteurs plasmatique non traités.
- les rapports sexuels vaginaux ou anaux, pour les deux partenaires, hétérosexuels et homosexuels masculins.

Les rapports homosexuels féminins sont considérés comme peu ou pas dangereux en l'absence d'éléments traumatisants.

Les rapports buccaux sont considérés comme pratiquement sans risque au moins en l'absence de lésions muqueuses.

4-Diagnostic et suivi biologique

La contribution de la biologie au diagnostic et au suivi de l'infection par le VIH est essentielle. Les différents outils utilisés ont récemment évolué et un point sur leur actualisation permet d'en faire le meilleur usage possible.

La sérologie VIH utilise 2 techniques :

- dépistage ELISA et / ou transcriptase reverse
- confirmation Western-Blot

-la sérologie ELISA de dépistage : elle repose toujours sur l'utilisation de 2 techniques (réactifs) différents. Aujourd'hui ne sont pratiquement plus utilisés que des réactifs de 3^{ème} et 4^{ème} génération.

-Antigénémie P24 : elle permet une détection de cet antigène avec une sensibilité plus importante que les tests de 4^{ème} génération. Son utilisation exclusive est la confirmation ou l'exclusion rapide d'une primo-infection.

-Wester-Blot VIH 1+2 : c'est la technique classique du dépistage sérologique .

La charge virale VIH 1 : mesurée par différentes techniques de biologie moléculaire, elle est toujours utilisée dans le suivi des patients séropositifs tous les 3 mois chez les patients traités et tous les 6 mois chez les sujets asymptomatiques non traités.

-Génotypes de résistance : utilisant des techniques de biologie moléculaire (séquençage ou recherche des mutations ciblées). Il permet de préciser l'efficacité des différents antirétroviraux disponibles sur l'espèce virale concernée.

Ces examens ne prennent bien entendu leur vraie valeur qu'intégrés à un suivi clinique et biologique (CD4/ CD8) large, prenant en compte tous les aspects de la problématique.

Principaux micro-organismes pouvant induire une infection pulmonaire chez un patient atteint de SIDA

Pneumopathie alvéolaire interstitielle	- <i>pneumocystis carinii</i> - <i>nocardia, legionella</i> - <i>aspergillus</i>
Pneumopathie interstitielle	-cytomégalovirus -mycobactéries

Deuxième partie : Méthodologie résultats commentaires discussion

1-Cadre d'étude

L'unité de Recherche et de Biotechnologie microbienne du laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec a servi de cadre à la réalisation de cette étude qui s'est déroulée sur une période de 1 an et 6 mois (Juin 2003 à Décembre 2004)

2-La population cible

Il s'agit de patients adultes ayant consenti librement à participer à l'étude et recrutés au niveau des hôpitaux de Dakar (Fann et Principal). Les critères d'inclusions sont les suivants :

- Hommes/Femmes âgés de + 18 ans
- Sérologie HIV positive
- BAAR positif et/ou négatif
- Hospitalisés
- Radiographie pulmonaire évoquant une pneumopathie alvéolaire, interstitielle ou une bronchopneumonie.

3- Matériel de laboratoire

a-Equipement de laboratoire

- Etuve à 37 °C et Etuve à CO₂
- Réfrigérateur à 4°C
- Congélateur à -20° et -80° C
- Microscope optique et à fluorescence
- Microscope à contraste de phase
- Lames porte-objet
- Lamelles couvre-objet
- Lames IF à 2 puits
- Flacons de culture cellulaire

b- Réactifs de colorations des lames

*Colorant pour le Gram

.Violet de Gentiane

. Lugol

. Fuchsine de Ziehl

*Réactifs pour la coloration de May Grunwald Giemsa

.Flacon 1 : fixateur RAL

.Flacon 2 : fixateur Eosine

.Flacon 3 : bleu RAL

4-Matériel : Sérodiagnostic *Chlamydomphila pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* IgG

a-Composition de la trousse Platelia ® *Chlamydomphila pneumoniae*

b-Composition de la trousse Platelia ® *Mycoplasma pneumoniae*

Le matériel utilisé varie en fonction de la nature du kit.

5- Culture de *Chlamydia pneumoniae*

a- Réactifs utilisés pour l'entretien des cellules SP

*Solution de Trypsine –EDTA

*Solution de Bleu Trypan

b-Matériel pour l'entretien des cellules SP

- Gants
- Etuve à 37°C
- Microscope à contraste de phase
- Flacon de culture cellulaire stérile à 50ml
- Pipettes graduées à 5ml et 10ml stériles
- Plaques de cultures cellulaire
- Bacs à déchets
- Hotte à flux lumineaire

II- Méthodes

Techniques utilisées : Cas du *Legionella pneumophila*

Immunofluorescence directe

1-Principe de la méthode :

Le réactif de coloration anti –*Legionella pneumophila* de Monofluo contient un seul anticorps monoclonal marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Cet anticorps réagit avec une protéine présente dans la membrane externe de tous les groupes sérologiques connus de *L. pneumophila*.

Des frottis sont préparés sur lames microscopiques conformément aux instructions du fabricant, soit directement à partir d'échantillons de patients, soit à partir d'organismes isolés en culture. Les frottis sont alors colorés avec le réactif de coloration anti- *legionella pneumophila* de Monofluo. L'anticorps monoclonal marqué se fixe immunologiquement à tout *L. pneumophila* présente dans le frottis. Le rinçage qui suit permet d'éliminer les anticorps non liés à l'échantillon.

Sous microscope à fluorescence, *L. pneumophila* apparaît sous forme de bacille ou coccobacille de couleur vert- pomme brillant. En raison de la contre-coloration, d'autres organismes sont rendus visibles par une teinte rouge foncé ou or mat. Le milieu de montage fourni avec le kit Mono fluo contient un stabilisateur qui prolonge la durée d'examen des lames avant que la fluorescence ne s'estompe.

2- Préparation des échantillons avant coloration

*Préparation des frottis pour test direct

a-Nettoyer et étiqueter une lame Mono fluo à 2 puits pour microscopie en fluorescence. Les échantillons provenant de plusieurs patients ne doivent pas être combinés sur une même lame. Pendant les étapes de fixation et de lavage, chaque lame doit être traitée séparément afin d'éviter les contaminations (entre 2 échantillons). Un frottis de contrôle positif doit être préparé à part sur une autre lame et traité séparément.

b-Préparer 2 frottis pour chaque échantillon, conformément aux instructions ci-dessous. De nombreux échantillons ne contiennent que très peu de *Legionella* intracellulaires et les cellules sont quelque fois éparpillées de façon inégale dans l'échantillon. Par conséquent, faire 2 frottis pour chaque patient peut augmenter la sensibilité du test direct.

-Les exsudats pulmonaires : échantillons d'expectorations frais ou congelés, aspirations trans-trachéales, lavages bronchiques.

Sélectionner, une partie visqueuse de l'échantillon qui soit laiteux ou hémorragique. A l'aide d'un bâtonnet applicateur stérile, préparer 2 frottis minces.

c-Laisser sécher les frottis à l'air, puis fixer les échantillons à la chaleur en passant rapidement la lame dans une flamme .

d-Placer la lame dans une chambre humidifiée et recouvrir chaque frottis avec du formol à 10% en solution saline. Fixer pendant 10 mns à la température ambiante.

e-Tremper la lame en eau déminéralisée fraîche pendant 2mns afin de la débarrasser de tout le formol

f-Laisser sécher à l'air puis passer à la procédure de marquage fluorescent.

3- Préparation d'un frottis pour le témoin positif

a- Nettoyer et étiqueter une lame Mono fluo pour microscopie en fluorescence

Remarque: Le frottis du témoin positif ne doit pas être traité avec les frottis des échantillons de patient .

b- Secouer le flacon contenant la suspension de l'antigène témoin positif afin de remettre en suspensions les cellules . Ajouter une à deux gouttes de la suspension à un puits de la lame, puis retirer ce liquide du puits à l'aide d'une pipette pasteur et le jeter .

c-laisser sécher à l'air puis fixer l'échantillon à la chaleur en passant rapidement la lame dans une flamme. Passer ensuite à la procédure de marquage fluorescent .

4-Préparation d'un frottis pour confirmation de culture

a-Nettoyer et étiqueter une lame Mono fluo pour microscopie en fluorescence.

b-A l'aide d'une anse bactériologique, prélever sur la boîte de culture une colonie suspectée de *L.pneumophila*. Suspender les bactéries dans un tube à essai contenant une petite quantité de formol à 1% en solution saline correspondant à la turbidité du point n°1 de l'échelle Mc Farland.

c-Avec une pipette Pasteur, appliquer 2-3 gouttes de la suspension dans un puits de la lame, puis retirer avec la même pipette Pasteur. Une fine pellicule des germes va subsister dans le puits. Répéter les étapes a-c afin d'obtenir, sur des lames individuelles, un frottis séparé de chaque colonie suspecte.

d-Laisser sécher les frottis à l'air, puis fixer à la chaleur en passant rapidement la lame dans une flamme. Passer ensuite à la procédure de marquage fluorescent.

5- Procédure de coloration

a- déposer suffisamment de réactif de coloration anti *Legionella pneumophila* pour recouvrir l'échantillon (1à 2 gouttes en fonction du type d'échantillon) en respectant les limites de contenance du puits .

b- placer la lame dans une chambre humidifiée et incubé pendant 30mns à 35-37°C. Remarque : la lame du témoin positif et les lames d'échantillons doivent être incubé en chambres humidifiées séparées .

c- éliminer tout excès de réactif de coloration, en procédant, par exemple en 1 aspiration. Plonger brièvement la lame dans l'eau déminéralisée pour la rincer, pour ensuite lui faire subir deux trempages de 2 à 10 mns.

d- laisser sécher les lames à l'air

- e- déposer une à deux gouttes de milieu de montage sur la lame et appliquer une lamelle.

5-Examen des lames colorées

Examen direct :

Examiner chaque frottis au grossissement x20 à 25. Si on observe des signes de fluorescence, utiliser alors un grossissement x60 – 100 pour confirmer les morphologies cellulaires

Pour une confirmation de culture :

L'examen se fera au grossissement x 60 – 100.

Examiner les lames au bout de quelques heures. Après lecture, les lames peuvent être conservé jusqu'au lendemain dans l'obscurité entre 2 et 8°C et pendant plus longtemps dans l'obscurité à -20°C. Les lames conservées au frais doivent être laissées à la température ambiante avant de pouvoir être lues, pour éviter que la condensation n'obscurcisse l'échantillon

6- Contrôle de la qualité :

A chaque test, utiliser la suspension de l'antigène témoin positif pour vérifier la réactivité du réactif de coloration. Pour le témoin négatif, utiliser une culture avec une bactérie à gram négatif connu tel que *E.coli*. Préparer une suspension conforme à celle décrite dans la section relative à la confirmation de culture.

7- Evaluation des résultats du test :

Les *legionella pneumohila* colorés se présentent sous forme de bâtonnets ou de coccobacilles intra ou extra cellulaires vert fluorescents. Les échantillons négatifs contiennent des germes de couleur rouge foncé. Les *Legionella pneumophila* sont des germes polymorphes qui peuvent se présenter sous forme de coccobacilles très courts ou de bâtonnets filamenteux longs. Un traitement antibiotique peut donner des organismes de morphologie atypique.

Interprétation des résultats :

Résultats d'un test direct	Compte rendu suggéré
>5 bactéries fluorescentes /lame à 2 puits	IF positive
1-5 bactéries fluorescentes /lame à 2 puits	Indiquer le nombre de cellules colorées, demander un second échantillon en cas de besoin clinique. Confirmer par une culture .
Aucune bactérie fluorescente visible	IF négative

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection, soit à *Legionella pneumophila* ou soit à une autre espèce de Legionella chez le patient.

Le prélèvement et la préparation des échantillons constituent des étapes importantes dans la procédure du test .

Avec certains germes tels que (*S. aureus* et certains lactobacillus), on observe quelque fois la fluorescence en raison d'une liaison immunitaire.

CULTURE DES LEGIONELLA PNEUMOPHILA

Divers milieux ont été utilisés

- Milieu non sélectif Legionella (sans antibiotique)
- BCYE Milieu sélectif Legionella =BCYE + VC
- Milieu Legionella sans cystéine :BCYE sans L-cysteine

Préparation des milieux de culture

1- Milieu non sélectif Legionella (sans antibiotiques)

- 18.5g de la poudre de Legionella Agar Base est mélangé avec 500 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Puis ajuster le pH à 7.1-7.2 avec du KOH 1N
- Autoclaver à la température de 122°C pendant 15 mns
- Refroidir jusqu'à la température de 40°C à 50°C .
- Puis additionner aseptique ment au milieu précédent 5ml de supplément d'enrichissement réhydraté.
- Puis homogénéiser le mélange
- Vérifier le pH qui doit être à 6.85 à 7. Sinon ajuster le avec du HCL 1N ou KOH 1N

Distribuer le mélange final dans des boites à Pétrie (90-120mm) en raison de 20 ml par boite ou 30 ml par boite de 90 mm afin d'éviter une dessiccation trop importante du milieu pendant la période d'incubation pouvant atteindre 10 jours. .

2- Milieu sélectif Legionella = BCYE + VC

Le milieu a été préparé en incorporant aseptiquement au milieu BCYE le mélange inhibiteur régénéré avec 2 ml d'eau distillée stérile. Les boites sont ensuite conservées à 2-8°C.

Contrôle de qualité des milieux de culture

Protocole :

La fertilité du milieu peut être testée vis à vis des souches suivantes

Milieu de base avec mélange d'enrichissement = BCYE

- *Legionella pneumophila* ATCC 33152

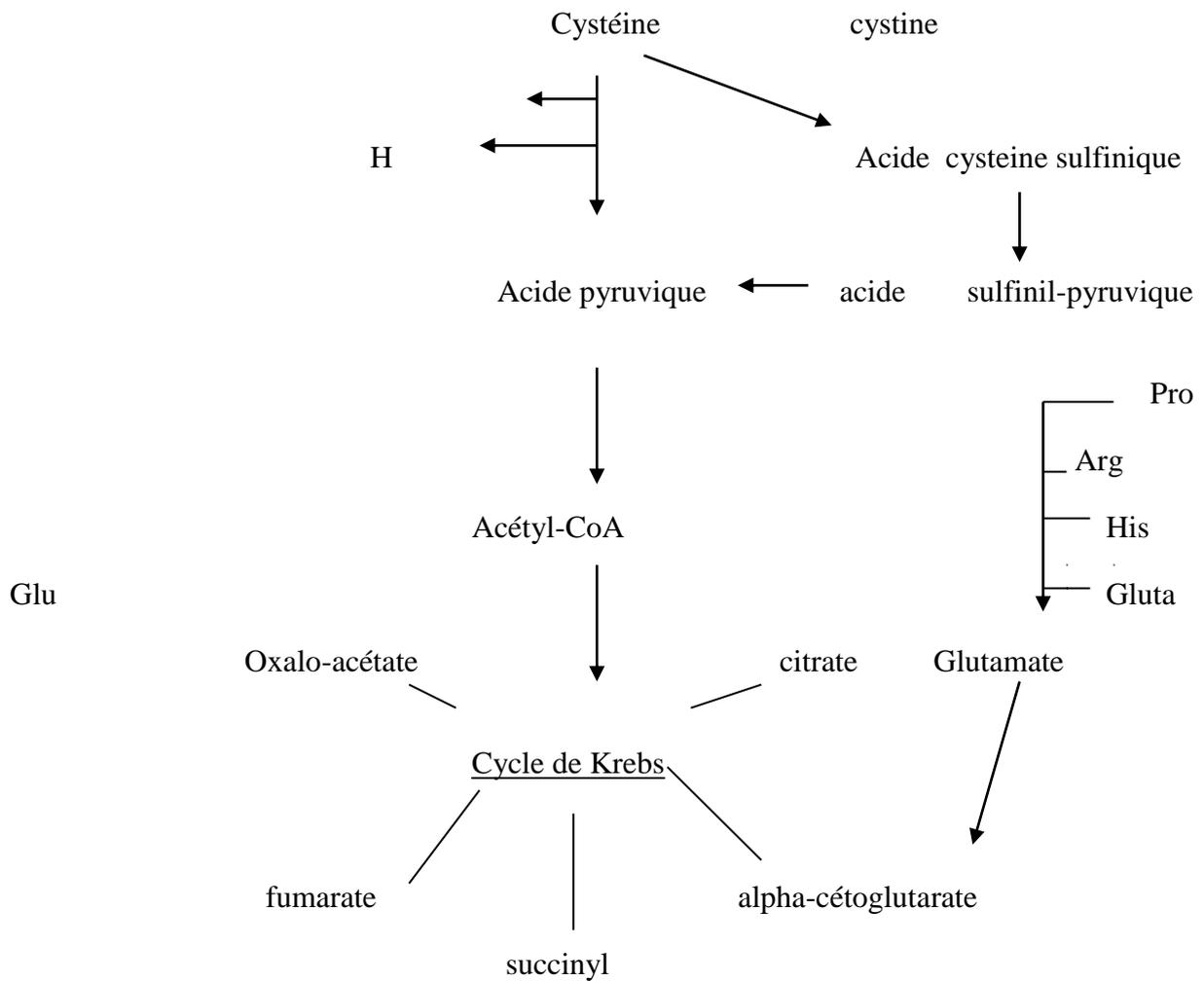
Milieu sélectif Legionella =BCYE +VC

- *Legionella pneumophila* ATCC 33152
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Résultats attendus :

Souches	BCYE	BCYE+VC
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152	Croissance en 7 jours	Croissance en 7 jours
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619		Inhibition en 3 jours

Métabolisme de la L-cystéine figure n°1



ETAPES DE L'ANALYSE CYTOBACTERIOLOGIQUE

1- Réalisation des prélèvements

Dans cette étude 2 techniques de recueil de sécrétions ont été réalisées :

- Aspiration bronchique

C'est un geste médical réalisé lors d'une fibroscopie ou bronchoscopie ou à l'aveugle à l'aide d'un tube piège chez les malades intubés ou trachéomisés. Le prélèvement est ainsi réalisé au niveau ou à proximité de la lésion .

L'expectoration ou l'aspiration bronchique sont généralement contaminées par la flore de l'oropharynx et de la salive .

Il existe une autre technique qui permet d'avoir des prélèvements peu ou pas contaminés telles que :

- Lavage broncho-alvéolaire

La technique consiste à instiller après blocage du broncho-fibroscope dans une bronche segmentaire ou sous segmentaire des échantillons de 50 ml de sérum physiologique 4 à 6 fois et on ramène entre 20 et 60% de la quantité injectée.

Ce lavage a plusieurs avantages parmi lesquelles : possibilités d'examen microscopique du culot de centrifugation du liquide, exploration d'un territoire pulmonaire plus important que le brossage bronchique protégé, recueil d'une grande quantité de salive.

Cette méthode de prélèvement est particulièrement utile pour le diagnostic des pneumopathies observées chez les immunodéprimés et permet de rechercher des bactéries telles que *Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae* .

- Un 3^e type de prélèvement (Examen Cytobactériologique des Crachats : ECBC) pourrait rapporter un maximum de germes, malheureusement non réalisé dans cette étude.

Résumé des performances de chaque prélèvement broncho-pulmonaire

Examen	Seuil de pathogénicité	Performances
crachat	10 000 000/ml	Mauvaise (sensibilité 50%)
Aspiration bronchique	10 000/ml	Médiocre
Lavage broncho-alvéolaire	10 000/ml	Bonne
Brossage bronchique protégé	10 000/ml	Bonne (spécificité et sensibilité 90%)

2-Examen macroscopique

Le prélèvement doit être décrit avec précision. Certains aspects sont en effet caractéristiques.

Afin de décrire l'aspect du prélèvement, on choisira généralement entre :

- Muqueux : donnant un aspect en gelée avec de rares parcelles purulentes
- Mucopurulent : muqueux avec des parcelles de pus plus nombreux
- Salivaire

- Fluide et purulent
- Visqueux, adhérent,

Préciser aussi la couleur éventuellement : rouille, verdâtre, hémoptoïque(sang). Noter , s'il ya lieu, l'odeur fétide, témoin de la présence d'anaérobies.

Les prélèvements muqueux, purulents ou muco-purulents ne sont pas adaptés à l'analyse bactériologique.

Par contre les prélèvements spumeux ou salivaires sont impropres à l'analyse bactériologique et doivent être refaits.

3-Traitement des prélèvements

Le traitement des échantillons consiste à procéder à une décontamination avec une solution de HCl / KCl pH =2.2 dans le cas de recherche de Legionella .

Etant donné que les prélèvements de lavage broncho-alvéolaire sont trop dilués, une étape de centrifugation à 5000 tours/mns a été réalisée puis à partir du culot, des frottis ont été confectionnés puis colorés au Gram et au bleu de méthylène. Il est préférable d'encemenser directement le prélèvement sur les milieux usuels.

4-Examen microscopique

-Examen direct :

Les souches de Legionella se présentent sous la forme de bacilles mobiles grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles polaires subpolaires ou latéraux mais la mobilité est parfois difficile à mettre en évidence et son expression est fonction des facteurs d'environnementaux notamment :

-Coloration de Gram et au Giemsa

A partir du prélèvement préalablement traité si nécessaire, on réalise 2 frottis : un coloré au Gram et un autre au Giemsa.

Après coloration de Gram, les *Legionella* sont faiblement colorées par la safarine et il convient soit de laisser agir le colorant plus longtemps soit de le remplacer par la fuschine à 0.05% ou par un mélange safranine et fuschine.

La technique suivie, décrite par Barlett et adaptée par Murray et Washington permet d'apprécier le degré de contamination par la salive. Elle consiste à examiner soit à l'état frais soit un frottis coloré par la méthode de Gram ou de Giemsa au microscope au grossissement *100 et à dénombrer en faisant une moyenne sur 10 champs les cellules épithéliales et les leucocytes par champs.

Les résultats de l'examen microscopique permettent de distinguer plusieurs situations :

Cellules épithéliales/champs	Leucocytes/champs	CLASSE
>25	<10	1
>25	10-25	2
>25	>25	3
10-25	>25	4
<10	>25	5

Interprétations

Classe 1 et 2 : prélèvements fortement contaminés par la salive. Ils ne sont pas utilisables pour la culture .Un autre prélèvement devra être demandé.

Classe 3 et 4 : prélèvements ayant un nombre de leucocytes, témoin d'une réaction inflammatoire mais contaminés par la salive.

Classe 5 : prélèvements appropriés pour la recherche de Legionella .Ceux de classe 4 sont parfois acceptables.

5-Isolement

-Laisser les boîtes revenir à la température ambiante

-Ensemencer le prélèvement préalablement traité. Ensemencer en parallèle le milieu Legionella sélectif et non sélectif.

Les milieux ci-dessous ont été ensemencés

- Milieu non sélectif Legionella = BCYE
- Milieu sélectif Legionella = BCYE +VC
- Milieu Legionella sans cystéine
- Gélose au sang de mouton à 5%

-Placer les boîtes en atmosphère enrichie en CO₂

-Incuber à l'étuve à 37°C pendant 3 à 10 jours. Ainsi les boîtes sont observées à J₃, J₅, J₁₀ et en cas de contamination importante il est conseillé de traiter le prélèvement à l'acide puis de réaliser de nouveaux isolements .

Après ensemencement tous les prélèvements sont aliquotés et conservés à -80°C

Lecture et Interprétation des résultats

Après incubation, observer la présence de colonies caractéristiques .

Aspect macroscopique : colonies gris-bleu à blanchâtres en vieillissant; au bord net et rosé et en verre fritté à la loupe binoculaire .

Avec ces colonies suspectes, réaliser les tests de pré-identification :

- coloration de Gram: bacilles ou coccobacilles Gram (-)
- catalase (+)
- oxydase (+)
- mobilité : polaire

Un résultat négatif ne peut être considéré comme négatif qu'après une incubation maximale de 10 jours .

L'identification des colonies caractéristiques doit être poursuivie par des tests biochimiques, parallèlement un repiquage des colonies a été effectué sur :

- gélose au sang de mouton à 5%
- gélose Legionella sans cystéine

Incuber les boites à 37°C pendant 3jours.

Les germes poussant sur gélose au sang comme sur milieux pour Legionella ne sont pas des legionelles.

6-Identification

	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. micdalei</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. longbeacheae</i>
Croissance sur BCYE	+	+	+	+	+	+
Gélose au sang	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	-	-	+	+
Réduction des NO ₃	-	-	-	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-	-
Acidification du glucose	-	-	-	-	-	-
Gélatinase	+	+	+	+	+	+
Lactamase céphalosporine chromogène	+	+	+/-	+	+	+

7-Sensibilité

La détermination in vitro de la sensibilité des antibiotiques ne peut être réalisée selon les normes standardisées classiques. En effet la présence de charbon et d'extraits de levure dans les milieux de culture ainsi que l'acidité des milieux (pH=6.9) ont un effet inhibiteur pour certains antibiotiques et le temps de génération étant long, la lecture ne peut s'effectuer avant 48 h d'incubation.

De plus il existe des discordances entre les résultats obtenus in vitro et l'efficacité des traitements ce qui s'expliquerait au moins partiellement par la localisation intra cellulaire des

Legionelles dans les macrophages. Pour toutes ces raisons, la réalisation en routine d'un antibiogramme n'est pas conseillée .

Le traitement des formes non sévères fait généralement appel à l'érythromycine ou à d'autres macrolides plus récents comme l'azithromycine ou la clarithromycine .

Lors des légionelloses sévères, on utilise des fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine, péfloxacin, lévofloxacine) ou l'azithromycine ou associations macrolides + rifampicine ou fluoroquinolone + rifampicine .

Techniques utilisées : Cas des *Mycoplasma pneumoniae*

CULTURE DES MYCOPLASMA PNEUMONIAE

1-Prélèvement

Quelque soit la méthode de prélèvement, elle doit ramener un maximum de cellules auxquelles adhère la bactérie.

Le lavage broncho-alvéolaire et le brossage endoscopique sont des techniques de choix .L'isolement peut se faire à partir des expectorations mais avec un résultat moins satisfaisant .

Les prélèvements doivent être recueillis avant toute antibiothérapie. Cependant, ceci ne constitue pas un véritable obstacle en raison de la longue persistance de la bactérie dans les voies respiratoires. Une fois qu'ils sont effectués ces prélèvements sont mis en culture sans délai afin d'obtenir de meilleurs résultats .

Les mycoplasmes sont très sensibles aux conditions extérieures et à la déshydratation.

La conservation doit se faire à 4°C pendant 48heures au delà, les prélèvements doivent être conservés à – 70°C.

2-Milieus de culture

Pour l'isolement de *M. pneumoniae* des milieux complexes sont utilisés .Ces milieux sont obligatoirement isotoniques et renferment divers composants (cf : préparation des milieux de culture)

Exemples de milieux utilisés

- Milieux liquides : bouillon glucosé – bouillon arginine
- Milieux solides : Edward Hayflick – SP 4 Agar
- Milieux diphasiques : SP 4 diphasique – H.agar diphasique

3-Préparation des milieux pour l'isolement et l'identification de *M. pneumoniae*

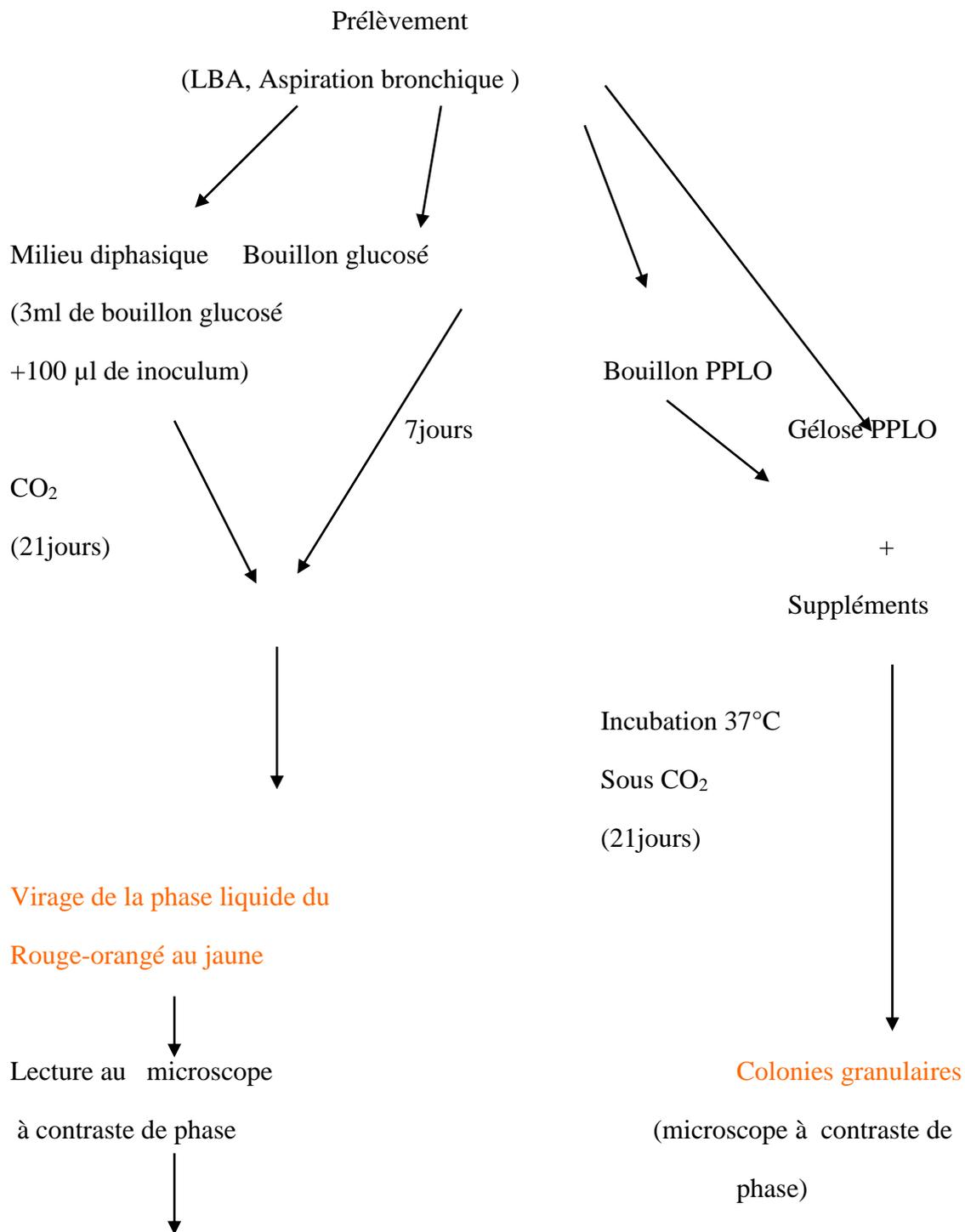
Les milieux de culture pour l'isolement de *M. pneumoniae* sont préparés de façon à respecter les exigences nutritives de la bactérie à savoir :

- La présence de stérols apportés par le sérum de veau fœtal
- La présence d'extraits de levure
- Un pH situé entre 7.4 et 7.5

Divers milieux ont été utilisés

- a) Bouillon glucosé
- b) Bouillon arginine
- c) Milieu diphasique
- d) Bouillon PPLO

Isolement ,Identification et Titrage des *Mycoplasma pneumoniae* figure n°2



Titrage \longrightarrow Antibiogramme.

4-Principe de la culture sur milieux liquides et solides

Les mycoplasmes dépourvus de paroi ne sont pas colorés par la méthode de Gram. La coloration de ADN par un fluorochrome peut être utilisée pour la mise en évidence des mycoplasmes contaminant les cultures cellulaires. La culture est très délicate et il n'y a pas de milieux standard convenant à toutes les espèces différentes en substrat, pH.

a) Prélèvement

Les prélèvements (LBA , Aspiration bronchique) conservés à -80°C , sont ramenés à la température ambiante si l'analyse a été différée.

Fluidification et Ensemencement

Dans un tube à hémolyse stérile, une dilution au 1/10 en eau distillée est réalisée. Puis l'on vortexe le mélange pendant 2 à 4mns.

Avec l'inoculum les milieux suivants sont ensemencés :

- Déposer 3gouttes sur la gélose PPLO
- 100 μl dans le bouillon glucosé, si le résultat de la 1^{ère} gélose est négative.

Puis les milieux sont incubés à :

- Gélose PPLO : à l'étuve sous CO_2 pendant 21jours
- Bouillon glucosé et bouillon PPLO : à l'étuve à 37°C pendant 6 à 20 jours

Détection de la croissance :

*En milieu liquide : elle se fait d'après le virage du rouge de phénol du rouge-orangé au jaune .

*En milieu solide : l'apparition de colonies doit être recherchée au microscope optique et à l'objectif 10. L'aspect des colonies est granulaire.

b) Identification

Elle est basée sur les propriétés métaboliques : fermentation du glucose. *M. pneumoniae* est le seul mycoplasme capable d'hémabsorber ou d'hémagglutiner les hématies de cobaye. En cas de positivité de la culture, un repiquage sera fait sur gélose au sang de mouton pour une meilleure confirmation par le réactif de titrage.

L'identification antigénique est rarement faite.

5-Principe de la culture sur milieu diphasique

Le milieu diphasique est reconstitué en ajoutant 3 ml de bouillon glucosé au milieu gélosé.

a) Procédure

L'inoculum est préparé comme suit :

- Dans un tube à hémolyse stérile, on effectue une dilution au 1/10 du prélèvement dans l'eau distillée du prélèvement .
- Avec la micropipette , on dépose 100 µl de l'inoculum dans le milieu diphasique.
- Puis incuber à 37°C sous CO₂ le flacon en position horizontale de sorte que le bouillon glucosé recouvre la gélose .
- Observer les cultures tous les 5 jours pendant 3 semaines .

1. Détection de la croissance

Milieu diphasique :

- Le virage de la coloration rouge-orangé au jaune témoigne une croissance de la bactérie dans ce milieu
- Apparition de zones d'hémolyse autour des colonies après repiquage du surnageant sur gélose au sang .

Les critères suivants ont été retenus en faveur d'une culture positive de *M. pneumoniae* .

- Virage sans trouble du bouillon glucosé en un délai de + 8jours
- Absence du virage du bouillon arginine
- Présence de colonies granulaires sur milieu gélosé
- Présence de zones d'hémolyse autour des colonies.

Résultat positif	<i>M. pneumoniae</i>
Bouillon : Couleur et caractère biochimique correspondant	Jaune
Gélose : Aspect des colonies	Colonies granulaires mesurant 100 à 400 µm.

Résultat négatif

-Réaliser un 2^{ème} ensemencement sur gélose PPLO à partir du bouillon PPLO.

Déposer 3 gouttes du bouillon PPLO sur la gélose PPLO et incuber à l'étuve sous CO₂ pendant 21 jours

b) Confirmation des cultures de *M. pneumoniae*

M. pneumoniae est capable de produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) responsable de la β hémolyse sur les hématies .

Cette propriété a été utilisée pour confirmer les colonies de *M. pneumoniae* .Les cultures positives sur bouillon glucosé et sur H-Agar sont repiquées sur gélose au sang . Puis les boîtes incubées sous CO₂ dans une jarre pendant 24 heures. Des zones d'hémolyse sont observées autour des colonies de *M. pneumoniae*.

c) Titrage

Le titrage est effectué sur milieu liquide bouillon glucosé pour attribuer aux souches isolées un rôle pathogène .

Il est effectué pour chaque prélèvement positif à la culture et dont la souche a été formellement identifiée comme étant *M. pneumoniae*. Des plaques de culture cellulaire ont été utilisées pour la réalisation de ce titrage .

Procédure

- Distribuer 180 µl de bouillon glucosé dans les cupules
- A partir des boîtes de culture (+) , 20 µl sont prélevés et introduits dans la 1^{ère} cupule, réalisant ainsi une dilution à 10⁻¹
- Puis 20 µl de la 1^{ère} cupule sont introduits dans la 2^{nde} , réalisant une dilution à 10⁻²
- Puis suivre la même procédure, en effectuant une série de dilution allant de 10⁻¹ à 10⁻².
- Les plaques sont ensuite scellées avec du parafilm et incubées sous 5 % CO₂ pendant 4 à 6 jours à la température de 37°C.

d) Interprétation des cultures

L'isolement de *M. pneumoniae* chez un patient est un élément significatif car à priori il n'appartient pas à la flore commensale, à l'exception peut-être des périodes épidémiques.

6-Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est exceptionnellement recherchée. De très rares cas de résistance aux macrolides ont été décrits. Les mycoplasmes ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques (Béta-lactamines; rifampicine, polymyxine)

SERODIAGNOSTIC DE *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

1-Introduction

Le diagnostic d'une infection à *M. pneumoniae* est généralement posé indirectement grâce aux techniques sérologiques. La détection des Ig M qui apparaissent plus précocement et disparaissent avant les Ig G permet de diagnostiquer l'infection aiguë sur le 1^{er} prélèvement. Un titre élevé ou une augmentation significative des IgG entre 2 prélèvements espacés d'environ 2 semaines, permet d'affirmer une infection en cours.

2-Principe du test

Platelia® *M. pneumoniae* IgG est un test permettant la détection et le titrage des Ig G anti-*M. pneumoniae* dans le sérum humain par une technique immuno enzymatique sur phase solide .

Les échantillons à tester et les étalons sont dilués, puis distribués dans les cupules de la micro plaque sensibilisées avec l'antigène *M. pneumoniae* .Durant la 1^{ère} incubation, les anticorps anti-*M. pneumoniae* présents dans les échantillons se lient à l'antigène *M. pneumoniae* .Les anticorps non spécifiques et les autres protéines sériques sont éliminées par les lavages pratiqués à la fin de l'incubation .

Le conjugué, anticorps monoclonal spécifique des chaînes gamma humaines marqué à la peroxydase, est alors ajouté dans toutes les cupules de la micro plaque. Durant la 2^{ème} incubation, l'anticorps marqué vient se lier aux IgG sériques ayant réagi avec l'antigène *M. pneumoniae*. Le conjugué non lié est éliminé par les lavages pratiqués à la fin de l'incubation. La présence du complexe immun est révélée par l'addition d'une solution de révélation enzymatique .La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition d'une solution d'acide.

La densité optique obtenue à 490/620 est proportionnelle à la quantité d'IgG anti-*M. pneumoniae* présente dans l'échantillon testé. La lecture avec utilisation d'une gamme de référence permet d'obtenir le titre du sérum en UA/ml.

3-Prélèvement

Les tests sont effectués sur des échantillons de sérum prélevés sur tube sec uniquement. Les échantillons sont conservés à 2 - 8°C si le test est réalisé dans les 24 heures. Si le test n'est pas effectué pour diverses raisons, les sérums sont conservés à - 80°C.

4-Interprétations des résultats

*Contrôle de qualité

Utiliser les contrôles sur chaque micro plaque pour chaque essai. Pour valider la manipulation, les critères donnés par le fabricant doivent être respectés :

- Valeur de la densité optique = D.O > 1.000

- Rapport
$$\frac{DO R4a}{DO R3} > 2$$

Si les spécifications ne sont pas respectées, reprendre la manipulation.

*Etablissement de la courbe standard.

La présence et la quantité d'anticorps IgG dirigés contre *M. pneumoniae* dans l'échantillon testé sont déterminées en comparant la densité optique de l'échantillon à celle d'une gamme étalon exprimée en Unités Arbitraires /ml.

Résultats attendus et Interprétation

TITRE	Interprétation et Résultats	
>40 UA/ml	Titre élevé	Taux d'Anticorps, compatible avec une infection à <i>M. pneumoniae</i>
<=40 UA/ml >20 UA/ml	Titre modéré	L'interprétation du test ne peut être donnée qu'après réalisation d'un 2 nd prélèvement distant de 8 à 15 jours, les 2 sérums devant être testés dans une même série.
<=20 UA/ml >=10 UA/ml	Titre faible	
<10 UA/ml	Titre non significatif	

Remarque : Il convient de noter que le sérodiagnostic est réalisé en parallèle avec la culture pour une meilleure identification de la bactérie .

ISOLEMENT DE *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE*

1-Culture cellulaire

Chlamydomphila pneumoniae ne se cultive pas sur milieu acellulaire, étant un cytoparasite obligatoire. L'isolement en culture est spécifique mais fastidieuse et peu sensible. Elle est possible sur œuf embryonné en inoculation par voie intra vitelline.

Les lignées cellulaires les plus sensibles à l'infection à *C. pneumoniae* sont les cellules HEP-2 et HL. De multiples passages sont cependant requis. La sensibilité est améliorée par une centrifugation préalable de l'inoculum et l'adjonction de cycloheximide dans le milieu de culture. La cytologie après coloration au May Grunwald Giemsa a été supplantée par l'utilisation d'Ac monoclonaux conjugués à la fluorescéine. Notons que la culture cellulaire a été complétée par le sérodiagnostic pour une meilleure confirmation de l'identification.

2-Prélèvement

Le prélèvement doit ramener le maximum de cellules infectées. L'aspiration bronchique et le lavage broncho-alvéolaire sont les techniques de prélèvement réalisées. Les prélèvements sont conservés à 4°C pendant 48h et au delà à -80°C. De préférence la culture est immédiatement mise en oeuvre après la collecte des prélèvements (dans les plus brefs délais) pour de meilleurs résultats. L'isolement se fait sur cellules SP issues de rein de porc présentant une infection totale par le virus de la peste porcine .

3-Support

C'est une plaque pour culture cellulaire à 24 puits.

4-Milieus utilisés

ML 15 + 8% SVF + 1% ATB convient à l'entretien des cellules.

5-Cellules utilisées

SP

6-Entretien des cellules SP

Les cellules sont entretenues dans des flacons de culture cellulaires de 200ml contenant le milieu MEM et incubés à 37°C.

Le ML 15 est utilisé pour l'entretien et la croissance des cellules SP

Sa composition est la suivante :

- Sels inorganiques
- Acides aminés essentiels
- Acides aminés non essentiels
- Vitamines et co-facteurs de croissance
- Substrats tel que le glucose

Le milieu ML 15 est supplémenté de 8% de SVF pour favoriser la croissance des cellules . L'incubation des cellules dans le milieu ML 15 se fait à 37°C sans CO₂.

Ces milieux sont additionnés d'un supplément antibiotique-antifongique ce qui permet d'éviter la contamination bactérienne et fongique lors de l'entretien des cellules.

Lorsque les cellules se multiplient, des liens protéiques se forment entre les cellules. Ces liens dépendent de la présence d'ions. Il se forme un tapis confluent au fond de la boîte de culture cellulaire. L'observation de ce tapis se fait au microscope à contraste de phase.

La solution de trypsine – EDTA est utilisée pour disperser les cellules du tapis. La trypsine agit en brisant les liens protéiques intercellulaires alors que l'EDTA agit comme un accepteur des ions.

7-Trypsination des cellules SP

La trypsination permet de décoller les cellules du tapis formé au fond de la boîte de culture :

- Le milieu ML 15 + 8% SVF + 1% antibiotique dans lequel les cellules ont été incubées est rejeté dans le bac à déchets.
- Le tapis cellulaire est lavé avec le ML 15 + 8% SVF deux fois
- 5 ml de solution trypsine sont ajoutés et la boîte est agitée doucement pendant 1mn.
- La solution trypsine est rejetée et une petite quantité est laissée au fond de la boîte.
- La boîte est ensuite incubée à l'étuve pendant 1 à 2mns
- A l'aide du microscope, on observe s'il y a décollement du tapis cellulaire .S'il y a décollement , on tapote sur la boîte pour séparer les cellules.

Puis 5ml du ML15 + 8% SVF + 1% antibiotique sont ajoutés dans la boîte.

Sur la boîte, la date et le numéro de passage sont marqués puis l'incubation est faite à 37°C pendant 48h ou 72h selon le nombre de cellules.

8-Technique d'isolement de *C. pneumoniae*

La culture est effectuée dans les plaques de culture cellulaire .

Les prélèvements conservés à -80°C sont ramenés à la température ambiante. Puis après ensemencement des plaques pour culture cellulaire avec 100 μl du lavage broncho-alvéolaire , 3 étapes très importantes s'en suivent :

- La centrifugation : une vitesse comprise entre 2500 à 3000 tours à 37°C pendant 1heure permet l'absorption des corps bactériens sur les cellules.
- La révélation des inclusions par des anticorps monoclonaux marqués, spécifiques de genre ou d'espèce.

Les cultures observées au microscope à inverse de phase et à contraste de phase montrent des inclusions intra cytoplasmiques correspondant à des corps élémentaires (C.E) de *C. pneumoniae*. La présence d'une seule inclusion permet d'affirmer l'infection à *C. pneumoniae*.

Il est recommandé de réaliser des subcultures pour augmenter les chances de succès (jusqu'à 5).

9-Sensibilité aux antibactériens (14)

Du fait de leur structure particulière et leur multiplication strictement intracellulaire, seules quelques familles d'antibiotiques, telles que les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones et les cyclines sont utilisables dans le traitement des infections chroniques

SERODIAGNOSTIC DE *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

1-Prélèvement

Le titrage se fait sur 2 prélèvements sanguins espacés de 15 jours. A défaut prélever un échantillon de sang selon les pratiques usuelles.

2-Techniques utilisées

Le sérodiagnostic de *C. pneumoniae* consiste en la mise en évidence d'anticorps Ig M ; Ig G ou Ig A dans le sérum du malade seul.

*Les techniques de détection d'antigènes de genre que sont :

- Réaction de fixation du complément
- Méthode ELISA

*les techniques de détection d'antigènes d'espèce.

Parmi ces techniques, seule la méthode ELISA a été utilisée dans cette étude pour réaliser le titrage.

Méthode ELISA : Détection des Ig G sériques anti-chlamydia

a-Principe

Le principe du test pour la détection des Ac IgG est un dosage immunoenzymatique en phase solide dite ELISA indirecte.

Selon le kit Platelia®, la détection des Ac IgG est effectuée sur le sérum dilué au 1/10. Notons que toute hémolyse peut altérer la réalisation du test. Les prélèvements sont conservés à 4°C et au delà à -80°C.

Les antigènes de chlamydia sont fixés sur le fond des cupules. Un anticorps monoclonal, marqué à la peroxydase, spécifique des chaînes gamma humaines (Ig G) est utilisé comme conjugué.

b-Calculs et Interprétations des résultats

La présence ou l'absence d'anticorps de classe Ig G anti-chlamydia dans l'échantillon testé sont déterminées en comparant la densité optique de l'échantillon à une valeur seuil, calculer à partir des densités optiques des échantillons étalons positifs

L'utilisation de sérums étalons calibrés par rapport à l'immunofluorescence permet de proposer un résultat quantitatif dans un intervalle de 16 à 256U/ml .

*Calcul de la valeur seuil

Elle correspond à la moyenne des DO du sérum étalon positif

$$\text{Valeur seuil} = 16\text{U/ml}$$

*Validité de l'essai selon le protocole du fabricant

- Valeurs des densités optiques $DO < 0.125$

$$\overline{DO R4a} > 0.125$$

$$DO R4b > 0.500$$

- Rapports

$$\frac{\overline{DO R4a}}{DO R3} > 1.3 \qquad DO R4b = \frac{\overline{DO R4a}}{\overline{DO R4a}} > 2.5$$

c-Détermination de l'état immunitaire des patients

Obtenue à partir d'un seul échantillon du patient . Le sérum étalon R4a, calibré par rapport à l'immunofluorescence correspond à la dilution 1/16^e ; le sérum étalon R4b à la dilution 1/256^e .

Densité optique de l'échantillon	Expression du résultat sous forme semi-quantitative	Réponse/Recommandation
DO R4a* 0.8	Sérum négatif	Absence d'exposition préalable aux chlamydiae
DO R4a* 0.8 < $\overline{\text{DO}}_{\text{échantillon}}$ < $\overline{\text{DO}}_{\text{R4a}}$	Sérum douteux	Résultat à confirmer par un nouveau test 15-20jours après le 1 ^{er} contrôle.
$\overline{\text{DO}}_{\text{R4a}}$ < $\overline{\text{DO}}_{\text{échantillon}}$ < $\overline{\text{DO}}_{\text{R4a}*1.8}$	Sérum positif faible +	Idem
DO R4a* 1.8 < $\overline{\text{DO}}_{\text{échantillon}}$ < DO R4b* 0.8	Sérum positif moyen ++	Exposition préalable aux Chlamydiae.
DO R4b* 0.8 < $\overline{\text{DO}}_{\text{échantillon}}$ < DO R4b	Sérum positif fort +++	

DO R4b <DO échantillon	Sérum positif très fort ++++	
------------------------	---------------------------------	--

d-Détection d'une infection active

Elle se fait sur 2 sérums ayant été prélevés à 3 semaines d'intervalle et les sérums sont testés au cours d'une même manipulation.

L'interprétation du test utilise le calcul d'un rapport critique comme suit :

- mesurer les densités optiques des sérums précoce et tardif sur une même plaque.
- Le rapport critique est donné par la formule :

$$\text{Rapport critique : } \frac{\text{DO sérum tardif}}{\text{DO sérum précoce}}$$

Interprétation

Rapport critique	Réponse/ Recommandation
> à 1.25	Taux d'Ac stable d'où infection active très improbable
De 1.25 à 1.75	Taux d'Ac en nette évolution ;d'où possibilité d'une infection active dont le sérodiagnostic pourra être confirmé 15-20jours après le 2 ^e contrôle .
< à 1.75	Augmentation significative du taux d'Ac spécifiques de chlamydia, signe d'une infection active

RESULTATS

La recherche des bactéries intracellulaires a été effectuée sur 3 types de prélèvements : lavage broncho-alvéolaire, aspiration bronchique et sérum.

L'isolement et l'identification de *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae* ont été faite grâce à la culture et la sérologie. Quant aux *legionella pneumophila*, la culture, l'immunofluorescence directe ont été les tests de diagnostic utilisés.

La culture est la méthode de référence (gold standard) dont le résultat est considéré comme sûr.

Sur 77 patients retenus suivants les critères inclusions , les résultats obtenus sont les suivants :

Performance des échantillons utilisés en culture : *Mycoplasma pneumoniae*

Nature du prélèvement	Culture		
	Bouillon glucosé	PPLO agar	Milieu diphasique
LBA	3 (37.5 %)	8 (100%)	0
Aspiration bronchique	5 (62.5%)	8 (100%)	2 (25%)

Nombre de LBA positif sur bouillon glucosé: 3 soit un taux de 37,5 %

sur PPLO agar : 8 soit un taux de 100%

sur milieu diphasique : 0

Nombre de aspiration bronchique sur bouillon glucosé: 5 soit un taux de 62,5 %

sur PPLO agar : 8 soit un taux de 100%

sur milieu diphasique : 2 soit un taux de 25 %

Après comparaison des pourcentages obtenus sur les 3 milieux de culture, les résultats montrent que la culture sur milieu PPLO agar donnent les meilleurs pourcentages aussi bien pour LBA que pour Aspiration bronchique. De même l'aspiration bronchique comparée au lavage broncho-alvéolaire donne plus de cas de positivité compte tenu de sa forte concentration cellulaire et bactérienne.

Résultats obtenus en culture/ sérologie :

Agent pathogène	Culture	sérologie
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	8	12

Nombre de prélèvements positif en culture et sérologie : 3

positif en culture et négatif en sérologie : 5

négatif en culture et en sérologie : 60

négatif en culture et en positif en sérologie : 9

Résultats obtenus en culture / sérologie

Agent pathogène	Culture	Sérologie
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	9	12

Nombre de prélèvements positif en culture et en sérologie : 8

positif en culture et négatif en sérologie : 1

négatif en culture et en sérologie : 64

négatif en culture et positif sérologie : 4

Résultat obtenu en culture / Immunofluorescence directe (IFD)

	Culture		IFD	Culture/ IFD
	BCYE	BCYE + VC		
LBA	3	1	3	1

Aspiration bronchique	3	1	5	1
-----------------------	---	---	---	---

Comparaison des résultats obtenus en culture / IFD

	<i>Legionella pneumophila</i> présent	<i>Legionella pneumophila</i> absent	
Test positif	Vrai positif : 1	Faux positif : 3	4
Test négatif	Faux négatif : 1	Vrai négatif : 72	73
	2	75	77

Nombre de prélèvements positif en culture et en IFD : 1

positif en culture et négatif en IFD : 1

négatif en culture et en IFD : 72

négatif en culture et en positif en IFD : 3

Calcul des paramètres de qualité

Sensibilité : $a / a + c = 1 / 1 + 1 = 0,5$

Sensibilité = 50 %

Spécificité : $d / b + d = 72 / 3 + 72 = 0,96$

Spécificité = 96 %

Valeur prédictive positive : $a / a + b = 1 / 1 + 3 = 0,25$

VPP = 25 %

Valeur prédictive négative : $d / c + d = 72 / 1 + 72 = 0,986$

VPN = 98,6 %

Taux de faux positifs : $1 - \text{spécificité} = 1 - 0,96 = 0,04$

Taux de faux négatifs : $1 - \text{sensibilité} = 1 - 0,5 = 0,5$

Encore l'effet dilution aboutit à une VPP de 25 % et une VPN de 98,6 %. Dans ces conditions d'utilisation, il y a autant de faux positifs (3) que de vrai positifs (1). Ainsi un malade ayant un résultat positif a autant de chance d'avoir la légionellose que de ne pas l'avoir.

La VPN (98,6 %) est élevée du fait que, parmi les 77 patients il y a un seul est atteint de la légionellose.

Remarque :

La sensibilité et la spécificité dépendent uniquement des qualités du test (et éventuellement de l'opérateur). Les valeurs prédictives n'informent pas sur le test lui-même mais sur la situation après lui : probabilité que le sujet ait le germe (valeur prédictive positive) ou que le sujet au test négatif soit idemne (valeur prédictive négative). Ces valeurs prédictives dépendent du contexte clinique (probabilité pré-test) et des caractéristiques –sensibilité et spécificité- de l'examen .

La courbe ROC

Le clinicien souhaite disposer d'un test diagnostique à la fois très sensible et spécifique. Cela n'est pas toujours possible. Un compromis doit être trouvé entre sensibilité et spécificité. La courbe de ROC est un moyen d'exprimer la relation entre la sensibilité et la spécificité d'un test diagnostique.

Pour chacune des 3 situations précédemment décrites, nous résumons la situation par un point placé dans l'espace [sensibilité- (1-spécificité)] utilisé pour la courbe ROC.

Plus la courbe ROC s'éloigne de la diagonale pour rejoindre l'angle supérieur gauche, plus le test diagnostique est globalement ' puissant '. Mais un test diagnostique n'est pas obligé d'être le meilleur toutes catégories comprises' pour être retenu.

DISCUSSION

Dans cette étude limitée aux adultes de +18 ans, 77 patients ont été recrutés à partir de l'hôpital Fann et l'hôpital Principal. A chaque patient, on effectue systématiquement un prélèvement de sérum couplé d'un prélèvement de sécrétions pulmonaires (si son état le permet). Les bactéries recherchées sont : *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella pneumophila*. Ces dernières ont été recherchées soit directement par culture et IFD, soit indirectement par sérologie. L'isolement et l'identification de *Mycoplasma pneumoniae* ont été effectués sur Bouillon glucosé, PLOagar et milieu diphasique. Le milieu SP a servi pour l'isolement des *Chlamydia pneumoniae*. Quant aux *Legionella pneumophila*, BCYE, BCYE+VC et Gélose au sang ont été utilisés.

Le choix des échantillons et des méthodes est surtout guidé par le type de prélèvement utilisé mais aussi par la sensibilité et la spécificité des techniques employées, le délai de réponse des résultats, la facilité de réalisation du test.

Prélèvements

- Lavage broncho-alvéolaire et aspiration bronchique

Notre évaluation a montré que tous les échantillons de lavage ont été examinés à la microscopie et classés selon les critères de Murray et Washington. Ainsi sur les 77 échantillons, 60 appartiennent à la classe 5 et 17 à la classe 4. après lecture des lames, de faibles rendements cellulaires ont été notés comparés à celles d'aspiration bronchique. Ceci pourrait s'expliquer par la forte dilution du lavage lors de son recueillement.

Explorant un territoire pulmonaire plus étendu, le lavage broncho-alvéolaire standard offre le recueil une grande quantité de sécrétions, de réaliser un examen direct, une numération des cellules épithéliales squameuses, des différents éléments et la recherche de cellules anormales.

Plusieurs études ont montrées que (anonyme), le lavage broncho-alvéolaire est la seule méthode fiable permettant de recueillir de façon sélective des agents pathogènes situés dans

les voies respiratoires. C'est pourquoi il représente la méthode de choix pour le diagnostic de processus pulmonaire peu clairs, en particulier en présence d'une immuno-suppression.

Les travaux princeps chez le malade en ventilation spontanée ont permis de situer le seuil discriminatoire du LBA à 10 000 ou 100 000 UFC/ml de sécrétions [27]. Similaires à nos résultats, de nombreux travaux ont conclu que le LBA n'était pas suffisamment performant pour porter le diagnostic de broncho-pneumopathies, essentiellement du fait d'un manque de sensibilité [19,21,28]. La meilleure sensibilité a été obtenue au seuil de 1 000 UFC/ml (46%). La meilleure spécificité à 100 000 UFC/ml (79%) [28].

Les travaux de Kahn et Jones [22] qui ont porté sur 75 sujets en majorité immunodéprimés, ont révélés que tous les patients classés comme ayant une pneumopathie bactérienne avaient au moins un micro-organisme présent à 10^5 UFC/ml. Par contre les études de Chastre et al [23] ont montré des résultats divergents voire contradictoires.

Les complications induites par le LBA peuvent aussi limiter son utilisation chez les patients.

Quant à l'aspiration bronchique, la même classification des échantillons a été retenue avec un rendement cellulaire plus important. Ceci pourrait s'expliquer par sa forte densité et aussi le faible volume injecté sur un large territoire pulmonaire

Technique simple, peu onéreuse et peu invasive a été longtemps décriée, essentiellement en raison d'un hypothétique manque de spécificité. Grâce à l'apport des cultures quantitatives et à la lumière certains travaux (32, 33, 34, 35], l'aspiration bronchique a trouvé sa place au sein des méthodes de diagnostic. La comparaison de sa performance avec celle du LBA a ouvert un débat sur son acuité à faire le diagnostic de pneumopathies. La comparaison à l'histologie a permis grâce à deux études, d'affirmer que cette technique offre une sensibilité acceptable (83% à 10^4 UFC/ml , 55% à 10^6 UFC/ml) avec une spécificité de 80 à 85% [7] [15]. La prédominance droite et le fait qu'il s'agisse de broncho-pneumopathies, explique sans doute l'intérêt de cette technique de diagnostic de pneumopathies.

A côté du LBA, cette étude a montré que l'aspiration bronchique donne plus de renseignements sur le plan cytologique avec de bons résultats particulièrement pour la culture des Legionelles. Tout ceci s'explique par sa forte concentration cellulaire et bactérienne. Toutes les cultures positives sur BCYE ont été obtenues à partir de l'aspiration bronchique.

Presque tous les échantillons provenant des voies respiratoires basses peuvent convenir à un test direct et à la culture des Legionelles. En outre les liquides et surtout les tissus pulmonaires sont les échantillons les plus pertinents (Références). Les résultats de la culture et de l'IFD peuvent être améliorés en sélectionnant une partie de l'échantillon laiteuse ou hémorragique. Références

- Sérum

Pour obtenir de bons résultats, facilement interprétables, il est nécessaire que les tests soient effectués sur des échantillons de sérums prélevés sur tube sec uniquement. Cette remarque paraît importante car 18 sérums étaient lysés avant même d'être traités. Et cette hémolyse peut avoir une influence négative sur l'interprétation des densités optiques. Car nous avons remarqué que sur 5 sérums lysés la densité optique était faible

- Examen direct

Cette présente étude a montré que la valeur des lames était peu suffisante mais avait une bonne corrélation avec les résultats de cultures excepté quelques échantillons. Sur une vingtaine de lames pauvres, les cultures correspondantes étaient très contributives.

Plusieurs travaux concluent au faible intérêt de l'examen direct, soit parce qu'il se révèle peu discriminatoire, soit parce qu'il est irréalisable du fait d'une importante lyse cellulaire [32,33]. Il s'agit, en particulier, d'un manque de sensibilité importante. Si l'on observe la performance de la coloration de Gram, la sensibilité est toujours imparfaite : 44% pour LBA et 56% pour l'AB. En revanche la spécificité est : 87% pour LBA et 73% pour l'AB.

Il est raisonnable d'avancer que lorsque la coloration de Gram met en évidence la présence de micro-organismes, le risque de pneumopathies est important. En revanche la négativité de cet examen direct n'écarte pas le diagnostic

Milieux de culture

- BCYE et BCYE+ VC

Sur 77 LBA, seul 1 a donné un résultat positif en culture et en IFD et 2 sont positifs en culture contre 3 positifs en IFD.

De nombreuses études en France [21], aux USA [22], Italy [23] ont montré une faible prévalence de ce germe chez les patients HIV+. Et les rares cas où il est isolé *L.p* séro groupe 1 reste le principal agent étiologique .

La faible prévalence de cette maladie chez les séropositifs [21] pourrait s'expliquer par :

- l'utilisation fréquente de - cotrimoxazole (en prophylaxie contre la Pneumocystose et la Toxoplasmose) - Macrolides - Rifamycines - Fluoroquilonnes dans le traitement préventif et curatif des Mycobacterium. Aux USA, depuis 1986, 8 cas de *Legionella pneumophila* (parmi lesquels 7 séropositifs) ont été déclaré grâce à la sérologie . Aucun cas n'a été observé chez les personnes recevant un traitement prophylactique à base de Trimetoprim-Sulfaméthoxazole [23].
- la conservation relative de la fonction monocyte /macrophage
- Les legionella peuvent rester dans un état viable mais non cultivable et ont un caractère inhabituel des bactéries à Gram-, ils possèdent jusqu'à 90% d'acides gras insaturés dans leur paroi.

D'après la littérature et les résultats obtenus dans cette présente étude , la culture comparait aux autres méthodes de détection des *L.p* s'avère être la plus sensible et la plus spécifique.

Une étude faite en Italy [19] , rapporte aussi que le 1^{er} cas de culture positive de *Legionella pneumophila*, a été obtenu chez un patient VIH+. La 1^{ère} culture permettait le diagnostic de l'infection qui probablement devait être méconnue. Hormis ce cas , la détection de la legionellose chez les séropositifs avec symptômes d'infections respiratoires était devenu rare et surtout difficile à confirmer.

En raison des facteurs limitants de l'IFD, certains auteurs ont suggérés que tous les tests de laboratoire soient disponibles et la culture (méthode de référence) soit plus performante. Une fois isolée, *L.p* a la plus sévère présentation clinique et la plus mauvaise évolution chez les séropositifs.

Immunofluorescence directe(IFD)

En raison de l'âge de la culture qui peut entraîner des variations d'intensité de la fluorescence entre les cellules, des réactions croisées avec de nombreuses bactéries, l'IFD réalisable en moins de 2 heures, manque parfois de sensibilité et de spécificité.

Par conséquent les résultats rendus seront entachés d'erreur. Ces deux points précités **pourraient** expliquer en outre la discordance entre le nombre de souche obtenus en culture (3) et en IFD (1).

Certains auteurs rapportent que dans tous les cas, les cellules colorées positivement vont être fluorescentes d'une manière qui révèle la morphologie cellulaire précise.

Afin d'évaluer la performance des deux techniques, nous avons comparés les résultats en IFD et en culture et reconfirmation IFD. Et nos résultats ont montré que sur 77 échantillons, 1 seul a été positif en culture et IFD puis reconfirmés en culture.

Mycoplasma pneumoniae

Culture

- Bouillon glucosé, Gélose PPLO et milieu diphasique

Cette étude a porté sur 77 patients séropositifs et souffrants d'infections respiratoires et a pour objectif entre autres de comparer deux techniques d'identification des *Mycoplasma pneumoniae*, la culture (test direct) et la sérologie (test indirect). Le kit Platélia a été utilisé pour la détection des Ig G sériques.

Parmi les patients, 4 sont positifs en culture et sérologie, 8 en culture seulement et 12 en sérologie seulement. En culture, sur les prélèvements de LBA, 3 sont positifs sur bouillon glucosé, 8 sur gélose PPLO et 0 sur milieu diphasique. Quant aux prélèvements d'aspiration bronchique, 5 sont positifs sur bouillon glucosé, 8 sur gélose PPLO et 2 sur milieu diphasique.

Les meilleurs résultats enregistrés, sont été obtenus après enrichissement de l'échantillon sur bouillon PPLO puis ensemencement sur gélose PPLO. Sur milieu solide, certains auteurs rapportent que le temps de génération du germe est reflété par la taille d'une colonie. Et ceci permet une évaluation quantitative du nombre de germes qui dans cette étude est estimée à 10^6 UFC/ml.

Malgré l'utilisation de milieux nutritifs sélectifs (liquides ou solides), les résultats obtenus par culture restent fréquemment insuffisants en raison d'une part d'un manque de concordance entre les techniques, et d'autre part par la difficulté de cultiver la bactérie in vitro et par le fait que la culture est souvent gênée par une antibiothérapie antérieure(cas fréquent chez les immunodéprimés).

Les Ac IgM peuvent être détectés 1 à 7 jours après l'apparition des signes mais l'examen est rarement demandé car les signes cliniques sont généralement insuffisants pour poser le diagnostic. Par conséquent le clinicien ne pense au Mycoplasma qu'à un stade avancé de la maladie et surtout s'il y a échec thérapeutique. Dans une telle situation les Ac IgG sont recherchés, indiquant ainsi un contact avec le germe sans pouvoir la dater.

Raison pour laquelle dans cette présente étude, seules les IgG ont été recherchés. Ainsi nos résultats ont montrés que 12 sérums sont positifs dont 3 fortement. Et tous les prélèvements à sérologie fortement positive, avaient une culture positive (sensibilité: 28,57% / spécificité: 86,84%). Par contre quelques échantillons à sérologie négative, avaient une culture positive sur bouillon uniquement. Cette positivité peut être due à la présence de levures car ces derniers libèrent des métabolites dans le milieu.

Des résultats similaires aux nôtres, montraient la rareté de ce micro-organisme dans les prélèvements de sujets infectés par le VIH . Et dans la majorité des cas , il était présent comme un pathogène co-existant avec les germes fréquents à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* . A l'issue d'un article publié , les chercheurs concluaient que M.p ne semblait pas jouer un rôle majeur chez les enfants et même les adultes infectés par le VIH et atteints d'infections respiratoires.[39]

La faible prévalence de ce germe a été relaté par Waring et al.[38] qui obtiennent seulement 22 cultures positives sur 280 échantillons . Quant aux études de Kai et al.[39], 30 échantillons ont été positifs en culture.

Identique à notre protocole d'étude, leur culture est considérée comme positive lorsque le milieu changeait de couleur et en l'absence de toute contamination. Ces chercheurs eux-même soulevaient que leur méthode de culture ne pouvait pas être spécifique pour les *M.p* en raison des nombreux facteurs limitants de la culture sur bouillon .

Mac Farland et al. [41] étudiaient en perspective l'incidence, l'étiologie, les résultats des infections du tractus respiratoire bas par la sérologie, la culture. D'une manière surprenante sur 33 (7.3%) parmi 316 patients, *Mycoplasma pneumoniae* était positif et tous étaient diagnostiqués par sérologie.

Une étude réalisée par Abele-Horn [29] sur 3 groupes de patients, comparait la culture à la sérologie. Dans cette étude, la meilleure corrélation entre les deux techniques a été observée chez les patients souffrants d'infections respiratoires par rapport aux immunodéprimés. Et il en concluait que la sérologie était plus rapide et montrait une bonne sensibilité.

Dans une étude faite par Kessler et al.[42] sur 116 échantillons de LBA, 7 ont donné une culture positive. De même, Menendez [43] a montré la faible prévalence de ce germe chez les patients séropositifs et souffrants d'infections respiratoires. *Mycoplasma pneumoniae* était présent seulement sur 3 des 184 patients. De par ses résultats, ils constatèrent aussi que *M.pneumoniae* semblait être rare chez les patients infectés par le HIV [50].

Les infections à *M.p* sont toujours confirmées avec des méthodes sérologiques, toutefois durant la phase aigüe de l'infection mais les paramètres indicatifs sont fréquemment négatifs.

La culture des *M.p* est longue et laborieuse. Raison pour laquelle Jacobs E. rapporte que la sensibilité de la culture est plus basse que celle des tests sérologiques.

Cependant dans le diagnostic de routine des infections à *M.p*, la culture utilisait comme technique de référence, semble être remplacée par la sérologie. Cette dernière présente malheureusement des inconvénients liés à l'existence de faux négatifs chez les immunodéprimés où la production d'anticorps est souvent perturbée. Malgré les facteurs limitants, la culture demeure la méthode de référence surtout dans nos pays en voie de développement.

De nos jours de nombreuses études proposent la PCR comme une technique de référence pour la détection des *M.p* en raison surtout de sa rapidité d'exécution et sa fiabilité et son coût est relativement abordable.

Chlamydia pneumoniae

Cette étude a porté sur 77 patients séropositifs et a pour objectif de comparer deux techniques d'isolement des *Chlamydia pneumoniae*. Cependant le kit Platélia a servi de test sérologique et les cellules SP de milieu d'isolement. Parmi nos échantillons, 9 sont positifs en culture seulement, 12 sont positifs en sérologie seulement et 4 à la fois en culture-sérologie.

Les facteurs limitants liés à la difficulté de l'entretien des cellules et surtout aux risques de contamination pourraient expliquer la faible prévalence des *Chlamydia pneumoniae* dans nos prélèvements. Différents articles publiés sur la sensibilité des méthodes d'identification de *C.p* montre que la sensibilité de la culture est beaucoup plus basse que celle de la PCR et propose cette dernière comme technique de référence (4 prélèvements positifs en culture contre 15 positifs en PCR).

La mise en évidence d'anticorps IgG dans le sérum lors d'un test isolé indique qu'il y eut infection, sans pouvoir la dater et les IgG peuvent persister tout au long de la vie. Les immunodéprimés, du fait de leur système immunitaire déficitaire, le dosage des IgM est généralement non fait. Ces derniers sont des marqueurs fiables d'une infection récente et en plus presque chaque individu est déjà en contact avec ce germe. Quant aux anticorps IgG, ils peuvent aussi persister pendant des années, raison pour laquelle, dans cette étude, seuls les échantillons à titre élevé ont été rendus et ont donné également des cultures positives. Dans cette étude seul un échantillon à culture positive, s'est révélé négative en sérologie. Ceci peut s'expliquer par le fait que les échantillons collectés trop tôt lors d'une infection primaire peuvent ne pas contenir un taux d'anticorps détectables et compte tenu du fait que la culture est plus sensible, l'infection est ainsi détectée.

Les études de Viscott et al ont rapporté que, la séroprévalence très élevée de *C.p* parmi les patients VIH+, était probablement due à la présence de facteurs de risque et non à l'infection VIH elle-même. Les séropositifs semblaient perdre progressivement leurs Ig G anti-*C.p* au milieu et à un état avancé de la maladie . Cependant, les titres élevés d'Ac Ig G de *C.p* sont rarement trouvé à un état avancé chez les séropositifs . Nos résultats ont montré que sur 77 sérums , 12 sont positifs dont 4 fortement.

De même les travaux de Blasi ont montrés que la prévalence des Ig anti-*C.p* était plus élevée chez les séropositifs que chez les patients VIH-. La présence de ce germe semble surtout aggraver l'état clinique des séropositifs. Ainsi Blasi en conclut que *Chlamydia pneumoniae*

devrait être impliqué dans l'approche diagnostique des infections respiratoires chez les sujets infectés par le VIH.

C.p est aussi reconnu comme une cause fréquente d'infections respiratoires. Par conséquent, les travaux de Augenbraun portant sur 50 échantillons de LBA, rapportent que 5 souches de *C.p* ont été isolé en culture contre 4germes banaux. Ceux de [22] révèle que *C.p* pouvait être présent dans le tractus respiratoire des sujets sains. En conclusion, ces résultats pourraient expliquer la fréquence élevée de ce germe chez les patients VIH+ pour lesquels le système immunitaire est défectueux.

Selon une étude rétrospective[17] portant sur 319 patients, *C.p* était le seul agent détecté dans 8 cas(2.5%) et *C.p* était associé avec aux germes banaux dans 7 cas(2.2%). Cependant, *Chlamydophila pneumoniae* pourrait être une cause possible d'infections respiratoires sévères en Italy [17] chez les immunodéprimés VIH+ et sa présence a été surtout suspectée lorsque les patients ne répondent pas au traitement à base de Bêta-lactamines ou bien au traitement anti-Pneumocystis carinii.

Dans cette présente étude, la culture comparait à la Sérologie , montre que tous les prélèvements positifs en culture, le sont également en sérologie mais la relation n'est pas réciproque. Notons que, en dehors de la culture cellulaire, il n'existe aucune autre technique directe commercialisée et les techniques de Biologie moléculaire restent du domaine de la recherche donc non utilisable en routine. Selon Dalhoff, la sensibilité de la culture a été trouvée plus basse que celle des autres technique de diagnostic et cette sensibilité est variable, estimée à 50-80% en fonction des laboratoires. Par conséquent, la sérologie est plus utilisée mais d'interprétation difficile en raison de la prévalence élevée de *C.p* et des réactions croisées entre espèces de Chlamydia .

Bilan [26]

<i>Legionella pneumophila</i>	Sensibilité %	Spécificité %
Culture	80	100

Immunofluorescence directe sur prelevement bronchique	33-70	96-99
Antigène urinaire	70	100
Sérologie	40-60	96-99

Recommandations [32]

La littérature [27] relate le rôle important que jouent les prélèvements endoscopiques dans la clarification de l'infection à HIV associées aux infections pulmonaires. Une étude réalisée montre une indication claire de la performance du Lba parce que l'agent infectieux ne pouvait pas être détecté par les examens de crachats ou bien la production de crachat par les patients étaient insuffisante. A pareille situation, ces prélèvements étaient capables d'établir une co-infection chez les patients avec des échantillons de crachats positifs dans un seul des 50 patients. Tout ceci souligne l'importance toute particulière (bonne réalisation des techniques de prélèvements et bonne manipulation) que l'on doit accorder aux techniques invasives avec tout ce qu'elles peuvent comporter comme risque.

A côté des techniques invasives, l'examen cyto bactériologique des crachats non effectué dans cette présente étude peut-être informatif, s'il est réalisé dans de bonnes conditions. C'est une technique simple, non invasive mais peu spécifique .

Toutefois, traité correctement un échantillon négatif peut renforcer la probabilité d'une pneumopathie à germes atypiques ou raisonnablement écarter la possibilité d'une pneumopathie à *Staphylococcus aureus* ou à Bacilles Gram négatif.

Il est important de rappeler que l'analyse microbiologique de prélèvements de mauvaise qualité rend souvent impossible l'interprétation des résultats et ne fournit généralement pas d'informations utiles sur le plan clinique. Tant pour le médecin que pour le microbiologiste, un résultat décevant signifie une perte de temps et de réactifs. L'importance d'un bon dialogue et d'une concertation entre le médecin et le microbiologiste est primordiale pour le succès de l'analyse. Les renseignements cliniques peuvent souvent s'avérer essentiels tant dans l'interprétation des résultats que pour l'orientation des agents pathogènes recherchés.

Rappelons que la transmission de la Légionellose semble être liée à une exposition à des aérosols tels que ceux produits par les systèmes de climatisation, les humidificateurs atmosphériques. Ainsi des épidémies ont été signalées aussi bien dans les hôpitaux et les hôtels que les bureaux et les usines. Pour limiter cette transmission, il serait utile de vérifier, nettoyer régulièrement les systèmes de ventilation et de plus les risques d'acquisition de la maladie sont toujours augmentées par la consommation de cigarettes, d'alcool et la présence de maladies pré-existantes (VIH) entraînant un affaiblissement des défenses immunitaires.

Notons aussi que certaines conditions particulières prédisposent plus spécifiquement à la survenue de certaines infections :

- L'éthylisme accroît le risque de Légionellose, pneumocoque, *Klebsiella pneumoniae* et anaérobies.
- L'infection par le VIH : pneumocoque, *Haemophilus influenzae*.

Il serait intéressant d'entreprendre une étude sur l'identification des bactéries atypiques par des techniques de Biologie moléculaire pour rendre les résultats dans les plus brefs délais et aidant aussi le clinicien à établir un bon diagnostic. Par conséquent certains chercheurs proposent la PCR et la recherche des IgM, réalisable en 1 ou 2 jours. Toutefois, la recherche des IgM est plus sensible que le test de fixation du complément, mais la réponse IgM pourrait être non spécifique[12] ou absente particulièrement chez les adultes[17].

CONCLUSION

Toutes les pneumonies typiques ou atypiques peuvent se présenter sous différents tableaux cliniques de sévérités variables en fonction du pathogène en cause, du statut immunitaire, des pathologies associées, de l'atteinte pulmonaire sous-jacente. Mais le diagnostic est souvent difficile dans les formes atypiques.

Le suivi biologique occupe une place de choix dans la prise en charge des patients vivants avec le VIH, mais le coût relativement élevé des réactifs, à côté de la difficulté de détection des bactéries intracellulaires, reste encore un frein majeur, d'où la nécessité de trouver une technique alternative, rapide, fiable et à moindre coût. Rarement incriminées dans les pneumopathies, les bactéries intracellulaires pourraient être considérées comme une cause possible et avoir une évolution fatale, en cas d'échec thérapeutique.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude effectuée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHN A. LeDantec avec pour objectif de comparer le rendement cellulaire de deux prélèvements (LBA/Asp) et la performance des différentes méthodes d'identification de 3 germes à savoir *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* et *Legionella pneumophila*. La recherche a été effectuée sur 3 types de prélèvements : Lavage bronchoalvéolaire, Aspiration bronchique, Sérum. Sérologie et Culture ont été les tests de détection des *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. Quant aux *Legionella pneumophila*, la culture, l'immunofluorescence directe ont été les tests de diagnostic.

A cette fin, 77 patients ont été recrutés et ont donné 8 souches de *Mycoplasma pneumoniae* en culture et 12 en sérologie, 9 souches de *Chlamydia pneumoniae* en culture et 12 en sérologie, 1 souche de *Legionella pneumophila* en culture et en IFD. Après validation des résultats, la comparaison des deux prélèvements a permis de noter un faible rendement cellulaire des lames de LBA par rapport à ceux obtenus par l'aspiration bronchique et une bonne corrélation entre la valeur diagnostique de l'examen direct et les résultats de culture. Par contre 10 lames pauvres ont donné des cultures très contributives. Toutefois les résultats obtenus en culture ont été similaires pour les deux types de prélèvements. Notons que les prélèvements endoscopiques ont joué un rôle non négligeable dans l'incrimination des germes atypiques chez les séropositifs. Ce sont les prélèvements les mieux adaptés, malgré leurs facteurs

limitants et sont réalisés en 1^{er} temps si l'état du patient le permet suivi des prélèvements d'expectorations, biopsies pulmonaires et liquide pleural.

La comparaison des techniques d'identification a permis de noter une faible prévalence des bactéries intracellulaires chez nos patients. Cette faible prévalence chez les séropositifs a été également relaté dans les travaux antérieurs faits aux USA(23), en Italie[22], en France[21] et serait très certainement du à l'utilisation fréquente des antibiotiques, à la qualité des prélèvements et aussi à la difficulté de cultiver ces germes.

Le diagnostic de la Legionellose est très complexe car la maladie est atypique, elle n'a rien de spécifique et la culture est longue.

Quant au *Mycoplasma pneumoniae*, ses caractéristiques ainsi que la symptomatologie des pneumopathies induites ont longtemps fait penser que ce micro-organisme était d'origine virale. Pourtant, il s'agit bien d'une bactérie, mais son isolement après culture est long, fastidieux ce qui exclut cette méthode du cadre diagnostic standart. Le diagnostic biologique s'appuie donc sur des moyens indirects et directs. Le diagnostic indirect repose essentiellement sur la sérologie, par méthode ELISA ou IFA et le diagnostic direct est dévouée à la PCR sensible, spécifique d'autant plus que *Mycoplasma pneumoniae* ne fait pas partie de la flore commensale.

Il est vrai cependant que nous sommes de plus en plus souvent confrontés principalement en milieu hospitalier aux infections opportunistes survenant chez les patients immunocompromis pour lesquels l'apport diagnostic d'une expectoration est minime. Les prélèvements endoscopiques (en particulier Lba et Aspiration bronchique) et la mise au point de méthodes microbiologiques basées sur la détection d'un antigène plutôt que sur l'obtention de culture positive permettant désormais dans la majorité des cas, d'établir le diagnostic de ces pneumopathies évitant ainsi au malade d'être soumis à la biopsie pulmonaire à ciel ouvert et aux dangers que comporte cette manœuvre chez un sujet gravement hypoxémique.

Compte tenu du fait que les germes atypiques donnent rarement des résultats positifs en culture et il serait souhaitable de recommander une pratique systématique des tests sérologiques à tout patient suspecté d'autant plus qu'elle ait très rapide. La culture est non seulement longue, fastidieuse et revient pour plus de la moitié des cas négative. A côté de la culture et de la sérologie, la PCR pourrait apporter un progrès substantiel en matière de diagnostic étiologique de routine surtout dans nos pays en voie de développement et

permettre un diagnostic rapide de certaines infections spécifiques. La PCR en temps réel a l'avantage d'être extrêmement sensible , simple d'utilisation et relativement peu onéreuse semble applicable à nos types de prélèvement malheureusement il n'ya pas de kit disponible pour les *Mycoplasma pneumoniae*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-Anonyme. Outbreaks of *Mycoplasma pneumoniae*. Respiratory Infection, Ohio, Texas and New York, 1993. MMWR, 1993, 42 (48) : 931-939
- 2-Anonyme. Ecllosion d'une pneumonie d'origine communautaire due à *Mycoplasma pneumoniae*: Colorado, 2000.MMWR 2001 ,50 (12) : 431- 434
- 3-Abele-Horn M., Busch U., Nitschko H., Jacobs E., Bax R.,Pfaff F., Scaffer B., and Heesemann J. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*.J.Clin.Microbiol. 1998.36:548-551.(Abstract /Free Full Text).
- Aubas S., Aubas P., Capdevila X., Darbas H., Roustan J.P., Du Cailar J. Bronchoalveolar lavage for diagnosing bacterial pneumonia in mechanically ventilated patients. Am J Respir Crit Care Med 149: 860-866.
- 30-Atmar,R.L., and S.B. Greenberg. 1989.Pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* And the TWAR agent .Semin.Respir.Infect.4:19-31(Medline)
- 3-Ayikoe-Gavoh D.A. Chlamydia pneumoniae, *Mycoplasma pneumoniae* et *Legionella pneumophila*.Les infections respiratoires basses communautaires de l'adulte.(Données microbiologiques d'une étude multicentrique à Dakar). Thèse Pharmacie, Dakar , 2000 n°87.
- 34-Barlett J.G. and Mundy L.M. Community-acquired pneumonia. N. Engl. J. Med; 1995; 333 : 1618-1624.
- Baigelman W., Bellin S., Cupples A., Berenberg M.J. Bacteriologic assessment of the lower respiratory tract in intubated patients. Crit Care Med 1986,10:864-8.
- 4-Bebear C. Diagnostic biologique des infections respiratoires à *Mycoplasma pneumoniae*.Rev.Mal.Resp.,1986 , 3 : 67-71.
- 5-Bebear C. De Barbeyrac B., Freney J., Renaud F., Hansen W.,Bollet C. Mycoplasmes.Dans : Manuel de bactériologie clinique .Elsevier, Paris, 1994, 3 : 1443- 1463.
- 31-Bernet,C.,M.Garret;B.de Bayerac, C. Bébéar and J.Bonnet.1989.Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction .J. Clin .Microbiol.27:2492-2496(Medline).

23-Blatt S.P., Dolan M.J., Hendrix C.W., Melcher G.P. Legionnaires' disease in human immunodeficiency virus-infected patients : eight cases and review. Clin Infect Dis. 1995 Sep ;21(3) : 712-3.

18-Boman J., Gaydos C.A., Quinn T.C. Molecular Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* Infection . J.Clin.Microbiol. 37: 3791-3799.

10-Brown P.D., Lerner S.A. Community-acquired pneumonia. Lancet, 1998, 352: 1295-1302.

28-Caberlotto O.J., Cadaria M.E., Garay J.E., Copacastro C.A., Cabot A., Savy V.L. Community-acquired in patients in 2 hospital populations. Medicina (B Aires). 2003; 63(1):1-8

Chastre J., Fagon J.Y., Soler P., Bornet M., Domart Y., Trouillet J.L et al. Diagnosis of nosocomial bacterial pneumonia in intubated patients undergoing ventilation: comparison of the usefulness of bronchoalveolar lavage and the protected specimen brush. Am J Med 1988; 85:499-506.

Chastre J., Viau F., Brun P., Pierre J., Dauge M.C., Bouchama A. et al. Prospective evaluation of protected specimen brush for the diagnosis of pulmonary infections in ventilated patients. Am Rev Respir Dis 1984; 130:924-9.

17-Comandini U.V., Maggi P., Santopadre P., Monno R., Angarano G., Vullo V. *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections among patients infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997 Oct ;16(10):720-6.

7-De Barbeyrac B., Bebear C., Dupon M. Infections à Chlamydia. Encycl. Med. Chir (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8037-A10. Dermatologie, 1997, 126670- B20:15.

54-Denis F. Mycoplasma. CES bactériologie- Virologie clinique Dakar 1978.

6-Duval J., Soussy C.J. Antibiothérapie.Masson, 4^e édition, 1992, 1 : 3-10.

8-Dowell S.F., Peeling R.W., Boman J. et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. Assays : recommendations from the center for disease control and protection (USA) and laboratory center for disease control (Canada). Clin.Infect.Dis.,2001,33 :492-503.

50-Edelstein P.H. Legionnaire's disease. Clin. Infect. Dis. 1993 ; 16 : 741-9.

El -Ebiary M., Torres A., González J., Puig de la Bellacasa J., Garcia C., Jiménez De Anta M.T. et al. Quantitative cultures of endotracheal aspirates for diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Am Rev Respir Dis 1993; 148:1552-7.

27-Ersch J., Speich R., Weber R., Altwegg M., Hauser M. The value of bronchoalveolar lavage in the clarifying of HIV-associated lung disease. Dtsch Med Wochenschr. 2000 Jun 23; 125 (25-26) : 789-93.

25-Eurosurveillance weekly. Volume6. Issue 40. 3 Oct 2002. Outbreak of Legionnaires's disease associated with visits to Belgium.

47-Foy H.M. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. Clin. Infect. Dis. 1993. 17(Suppl. 1) : S37-S46.

19-Franzin L., Dal Conte I., Cabodi D., Sinicco A. Culture proven *Legionella pneumophila* pneumonia in a HIV-infected patient : case report and review. J Infectet. 2002 Oct;45(3):199-201.

12-Gaudin O.G. Infections humaines à Mycoplasmes . Encycl. Méd. Chir., (Elsevier, Paris), Mal. Infect., 1989, 8039- v10 : 29

13-Gleason P.P. The emerging role of atypical pathogens in community- acquired pneumuniae. Pharmacotherapy, 2002, 22: 30-32.

11-Grayston J.T. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain (TWAR). Clin. Infect. Dis., 1993,168 :1231-1235.

49-Gnarpe J., Lundback A., Gnarpe H., Sundelof B. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in subjectively healthy individuals. Scand. J. Infect. Dis. 1993. 24: 161-164.

40-Ieven M., Ursi D., Van Bever H., Quint W., Niesters G.M., Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *Mycoplasma pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. J.Infect. Dis. 173 : 1445-1452.

39-Kai M., Kamiya S., Yabe H., Takakura I., Shiozawa K., Ozawa A. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction . J. Med. Microbiol. 38 : 166-170.

Kahn F.W., Jones J.M. Diagnosing bacterial respiratory infection by broncho-alveolar lavage. J Infect Dis 1987. 155 : 862-869.

42-Kessler H.H., Dodge D.E., Pierer K., Young K.K.Y., Liao Y., Santner B.I., Eber E., Roeger M.G., Stuenzner D., Sixi-Voigt B., Marth E. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridation in a nonradioactive microwell plate format. J.Clin. Microbiol. 1997. 35: 1592-1594.

48-Kleemola S.R.M., Karjalainen J.E., Raty R.K.H. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: clinical evaluation of a common probe test. J.Infect. Dis. 1990. 162 : 70-75.

36-Lesobre V., Azarain R., et al. Pneumopathies à *Mycoplasma pneumoniae* : 10 observations. La presse Médicale,1999, 28(2) : 59-62.

24-Lieberman D., Shaeffer F., Boldur I., Horowitz S., et Friedman M.G. Multiple pathogens in adults admitted with community-acquired pneumonia: a one year prospective study of 346 consecutive patients. Thorax. 1996; 51: 179-184.

16-Loens K., Ursi D., Goossens H., Leven M. Molecular Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Respiratory Tract Infections. Journal of Clinical Microbiology, Nov.2003, p.4915-4923, Vol.41,N°11.

45-Luneberg E., Jensen J.S., Frosch. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. J. Clin. Microbiol. 1993. 31: 1088-1094

41-Mac Farland J., Holmes W., Gard P., Mac Farlane R., Rose D., Weston V., Leinonen M., Saikku P., Myint S. Prospective study of the incidence, aetiology and outcome of adult lower respiratory tract illness in the community. Thorax . 2001.56: 109-114.

37- Macondo E.A. Mise au point de méthode d'identification des Mycoplasmes. DEA de Chimie et Biochimie, Dakar, 1998.

Marquette C.H., et al. Diagnostic tests for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation of diagnostic accuracy using history as a diagnostic gold standard. *Am Rev Respir Dis.* 1995. 151: 1878-1888.

Marquette C.H., Georges H., Wallet F., Ramon P., Saulmier F., Neviere R., et al. Diagnostic efficiency of endotracheal aspirates with quantitative bacterial cultures in intubated patients with suspected pneumonia. Comparison with the protected specimen brush. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:138-44.

43-Menendez R., Cordoba J., De La Cuadra P., Cremades M.J., Lopez-Hontagas J.L., Salavert M., Gobernado M. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community acquired pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care med.* 1999. 159: 1868-1873.

22-Morley J.N., Smith L.C., Balch A.L., Smith R.P. Recurrent infection due to legionella pneumophila in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1994 Dec; 19(6):1130-2.

32-Mouton Y., Bignolas G; Childiac C.; Decases J.M., Gehanno P. et groupe de travail. Recommandations sur la prise en charge de la pathologie infectieuse respiratoire. *Med.Mat.Infect.*, 1995, 28, 1021-1028.

14-Orfila J., J.Freny., F.Renaud., W.Hansen., C.Bollet. Chlamydiales Manuel de Bactériologie Clinique. (Elsevier, Paris) Volume3, 1731-1738, 1994.

Papazian L., et al. Bronchoscopic or blind bronchial sampling techniques for the diagnosis of ventilator associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995. 152: 1982-1991.

Papazian L., et al. Comparison of two methods of bacteriologic sampling of the lower respiratory tract: a study in ventilated patients with nosocomial bronchopneumonia. *Crit Care Med* 1989;17:461-4.

Papazian L., et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia : an evaluation of direct examination and presence of intracellular organisms. *Anesthesiology* 87 (sous presse).

33-Papierok G., Paulat G., Escorguel C. Mycoplasmes : leur place en microbiologie. *Revue Française des Labo*, 1992, n°244.

35-Pilet C., Bourdon J.L., Loma B., Morchal N., Balbastre C. Famille des Mycoplasmataceae. Dans : Bactériologie médicale et vétérinaire, Doin 1979 : 402-418.

51-Remer L.G.C., Carrol C.K. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of upper respiratory tract infections. Clin. Infect. Dis. 23 : 442-448, 1996.

52-Remer L.G.C., Carrol C.K. Role of the microbiology laboratory in the diagnosis of lower respiratory tract infections. Clin.Infect.Dis.26: 742-748, 1998.

21-Sene D., Bossi P., Thomas L., Ghosn J., Zeller V., Caumes E., Katlama C., Bricaire F.

Legionellosis in HIV-1 infected patients. 4 case reports. Press Med. 2002 Mar 2; 31(8):356-8.

26-Stout J.E., Yu V.L., Engl N. Valeurs opérationnelles des tests diagnostiques .J Med, 1997 ; 337 : 682-87.

46-Tjhie J.H.T., Van Kuppeveld F.J.M., Roosendaal .R., Melchers W.J.G., Gordijn R., Mac Laren D.M., Walboomers J.M.M., Meijer J.L.M., Van den Brule A.J.C. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. J.Clin. Microbiol. 1994. 32: 11-16.

Torres A., et al. Validation of different techniques for the diagnosis of ventilator

44-Trap B., Jensen J.S., Ostergaard L., Andersen P.L. Search for agents causing atypical *pneumoniae* in HIV-positive patients by inhibitor controlled PCR assays. Eur. Respir. J. 1999. 13 : 175-179.

15-Verbooyen.R.P., Willemsse.D., Hiep-van.S.C.A.M.,Verbrugh H.A. Evaluation of PCR, Culture and Serology for Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* Respiratory Infections. Journal of Clinical Microbiology, August 1998, p.2301-2307, Vol.36 N°8.

38-Waring A.L., Halse T.A., Csiza C.K., Carlyn C.J., Arruda Musser K., and Limberger R.J. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. J. Clin. Microbiol. 39 :1385-1390 .

53-Woodhead M. Management of pneumonia in the outpatient setting. Setting. Resp. Infect 13 :8-16, 1998.

RESUME

Le suivi biologique occupe une place de choix dans la prise en charge des patients vivants avec le HIV associés à une pneumopathie. Mais le cout des réactifs relativement élevé, à coté de l'absence de corrélation entre la symptomatologie et le germe reste encore un frein majeur, d'où la nécessité d'utiliser des techniques rapides et fiables, pour la détection des bactéries atypiques. Rarement incriminées, ces bactéries peuvent avoir une évolution fatale surtout chez les séropositifs.

C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude effectuée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHN A.LeDantec (Dakar/Sénégal) avec pour objectif d'évoquer l'intérêt et les limites des tests de laboratoires pour le diagnostic des pneumopathies atypiques chez les patients HIV+. L'accent est mis en particulier sur l'importance du diagnostic correct de *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae* à partir de 3types de prélèvements à savoir l'aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire, sérum. La culture, la sérologie, l'immunofluorescence directe, différents de par leur principe, sont les tests utilisés pour la mise en évidence des germes atypiques. Ces derniers sont le plus souvent évoqués en cas d'échec thérapeutique. A cette fin 77 patients ont été testés et ont donné 8 souches de *Mycoplasma pneumoniae* en culture et 12 en sérologie, 9souches de *Chlamydia pneumoniae* en culture et 12 en sérologie, 1 souche de *Legionella pneumophila* en culture et en IFD. obtenus sont les suivants :

Il est exceptionnel aujourd'hui qu'un diagnostic étiologique spécifique, visant à prouver la responsabilité des germes intracellulaires , soit effectué.

La culture constitue la méthode microbiologique de référence (sensibilité de 99% ou plus) mais celle-ci s'avère difficilement utilisable en pratique essentiellement en raison des délais de réponse du labo. De meme, la sérologie ne permet qu'une confirmation rétrospective tardive du diagnostic et n'influence dès lors pas la prise en charge thérapeutique du patient. Par contre, les tests de diagnostic reposant sur les techniques de Biologie moléculaire sont rapides, peu couteux, faciles. Ces tests applicables à tous les prélèvements montrent une meilleure sensibilité et spécificité. Par conséquent, ils pourraient constituer une technique alternative, permettant de trouver la vraie place des bactéries intracellulaires dans les Pneumopathies associées à une infection HIV.

ANNEXE

Culture des *Legionella pneumophila*

Composition des milieux de culture

1-Milieu non sélectif *Legionella* (sans antibiotique) = BCYE

Il se présente sous 2 formes :

-Milieu de base prêt à l'emploi disponible en flacon de 200ml

-Poudre lyophilisée appelée *Legionella Agar*

Sa composition en g/l est la suivante :

- Extrait de levure 10
- Charbon activé 1.5
- Tampon ACES 6
- Alpha- cétooglutarate 1
- Bacto Agar 17

ACES: (2-[2-amino-oxoéthyl) -amino]éthane sulfonique

Supplément d'enrichissement

Sa composition en g/l :

- L-cysteine HCl 0.2
- Pyrophosphate ferrique 0.125

2-Milieu sélectif *Legionella* =BCYE + VC

Sa composition est la même que celle du milieu BCYE

La sélectivité de ce milieu est obtenue par l'adjonction de

- Vancomycine 200µg
- Colistine 900 UI

3- Milieu *Legionella* sans cystéine :BCYE sans L-cysteine

L'extrait de levure et l'alpha cétooglutarate favorisent le développement de *Legionella*

- Les facteurs de croissance indispensable comme le pyrophosphate ferrique et le chlorhydrate de cystéine sont apportés par le supplément d'enrichissement lyophilisé.
- L-cysteine : acide aminé glucoformateur, est un facteur de croissance. De part sa dégradation totale, elle fournit de l'énergie nécessaire à la bactérie sous forme d'ATP.
- Pyrophosphate de fer : élément indispensable pour la croissance de la bactérie.
- L'extrait de levure : permet une adaptation des cultures des souches de laboratoire à la culture in vivo. Il apporte également du NAD

Ce milieu est rendu aussi sélectif par l'adjonction de :

- Vancomycine : antibiotique à large spectre, qui inhibe tous les bactéries Gram+
- Colistine : antibiotique qui inhibe les entérobactéries.

La croissance est optimale pour un pH : 6.9 maintenu par le tampon ACES et pour une température comprise entre 35-36°C, se rapprochant beaucoup plus des conditions du milieu extérieur (bac d'eau –tuyauteries). Cette croissance est aussi favorisée par la présence de 2,5% de CO₂. Le CO₂ agit comme un gaz ayant un effet tampon. Lors des primocultures, la présence de L-cysteine et de fer est requise, l'exigence en L-cysteine persiste, le plus souvent

même après plusieurs repiquages. La raison est que : *L.p.* ne possède pas de sidérophores. La source de fer peut-être constituée par le sulfate de fer, nitrate de fer, chlorure de fer, l'hémine et l'hématine.

BCYE contient un élément spécifique du charbon qui a été décrit comme détoxifiant .

Corrélation entre le nombre de colonies observées sur les milieux de culture et le nombre de bactéries par ml de LBA / AB

Nombre de colonies sur les boîtes	Nombre de bactéries/ ml de LBA
Moins de 5 colonies	Entre 10^5 et 10^6
De 5 à 50 colonies	Entre 10^6 et 10^7
De 50 à 500 colonies	Entre 10^7 et 10^8
Plus de 500 colonies	De 10^8 et au delà

Interprétation

10^5 bactéries/ml : souche commensale

10^6 bactéries/ml : signification douteuse

10^7 bactéries/ml et au delà : souche potentiellement pathogène et susceptible d'être responsable de l'infection en cours.

La culture étant souvent polymicrobienne l'implication du germe était réalisé grâce à un tableau de scores.

Tableau des scores

Score	CE/champ	PN/champ	% PN infectées	Comptage bactérien
--------------	-----------------	-----------------	-----------------------	---------------------------

				UFC/ml
1	>25	5-0	<25	$10^4 - 10^5$
2	15-25	5-15	25-50	$10^5 - 10^6$
4	5-15	15-25	50-75	$10^6 - 10^7$
8	0-5	>25	75-100	$>10^4 - 10^8$

3-Préparation des milieux pour l'isolement et l'identification de *M. pneumoniae*

a) Bouillon glucosé

Milieu de base

- Bouillon cœur cervelle 42g
- Peptone papa inique de soja 10g
- NaCl 3g
- Glucose anhydre 10g
- Rouge de phénol 2ml
- Eau distillée qsp 1000ml

Le pH est ensuite ajusté à 7.5 par la soude 1N. Le milieu de base est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15mns. Après autoclavage ,le supplément de composition ci-dessous est stérilement ajouté à 600ml du milieu de base, refroidi à 50°C.

Supplément

- SVF stérile 300ml
- Extraits de levure à 25% fraîchement préparé et stérilisé par filtration 100ml
- Pénicilline G 1MUI/4ml 4ml
- VCF qsp 2ml

Le pH a été vérifié et ajusté à 7.8 par le NaOH 1N stérile puis le milieu a été réparti en aliquots de 50 ml et conservés à -20°C .

-glucose : la fermentation du glucose entraîne une libération d'acides organiques et provoque une acidification du milieu. Le rouge de phénol vire ainsi du rouge-orangé au jaune. Le glucose est également une source d'énergie pour la bactérie.

-vitamines et extrait de levure favorisent le développement de la bactérie

-NaCl assure l'isotonicité du milieu et pH: 7.5 est le pH optimal de croissance

L'adjonction d'antibiotiques tel que

-la pénicilline inhibe les cocci à Gram- et +

-la vancomycine possède un large spectre et agit en inhibant les bactéries à Gram +

-la colistine inhibe les entérobactéries et quant à la fungizone, elle inhibe les champignons.

b) Bouillon arginine

Le glucose du milieu précédent est remplacé par l'arginine.

c) Milieu diphasique

Phase solide

- Bouillon cœur cervelle 42g
- Peptone papa inique de soja 10g
- NaCl 3g
- Glucose anhydre 10g
- Rouge de phénol 1% 2ml
- Eau distillée 580ml

A près dissolution des différents constituants ,le pH a été ajusté à 7.5 par le NaOH 1N puis 10g d'Agar ont été incorporés au milieu qui a été porté à l'ébullition pendant 1mn pour dissoudre l'Agar. Ensuite ,le supplément suivant a été ajouté stérilement sous la hotte au milieu préalablement autoclavé à 121°C pendant 15mns et refroidi jusqu'à 50°C.

- SVF stérile 300ml
- Extraits de levure ,solution à 25% fraîchement préparé et stérilisé par filtration 100ml
- Pénicilline G 1MUI/4ml
- VCF qsp 2ml

Le pH a été ajusté à 7.5 par NaOH 1N stérile puis le milieu coulé sous la hotte dans des flacons de culture cellulaire en raison de 8 ml par flacon.

La stérilité a été testée en incubant à l'étuve à 37°C pendant 24h avant la conservation au réfrigérateur à 4°C.

Phase liquide

Il s'agit du bouillon glucosé à raison de 3 ml par milieu gélosé au moment de l'emploi .

d)Bouillon PPLO

Formule du bouillon PPLO /litre

- Peptone de protéase n°3 1g
- Extrait de bœuf 1g
- Digestion de cœur de bœuf 4g
- Peptone 10g
- NaCl 5g

- Mettre 21g de poudre en suspension dans 700ml d'eau purifiée
- Auto claver à 121°C pendant 15mns .Laisser refroidir jusqu'à 60°C
- Ajouter en condition aseptique 300ml de supplément de mycoplasma S
- Ajouter les agents sélectifs (1 : 2000 acétate de thallium –pénicilline).

A partir de 3gouttes de ce bouillon (où l'on a déchargé le prélèvement),on ensemence la gélose PPLO.Le bouillon et la gélose PPLO sont incubés sous 5% de CO₂ pendant respectivement 4 à 6 jours et 8 jours à 3 semaines.

e)Gélose PPLO

Formule approximative /litre

- Infusion de cœur de bœuf 2g
- Digestion pancréatique de caséine 7g
- Extrait de levure 3g
- NaCl 5g
- Gélose 14g

Le pH =7.8 +/- 0.2

-Mettre 34g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée bien mélanger

-Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant 1mn de manière à dissoudre parfaitement la poudre .

-Répartir et stériliser à l'auto clave à 121°C pendant 15mns

-Refroidir jusqu'à 50°C et ajouter l'enrichissement stérile désiré .

Les enrichissements à employer comprennent notamment les différents sérums les fractions de sérum, le liquide d'ascite et l'extrait de levure ou bien l'enrichissement BBL pour mycoplasmes sans pénicillines et la pénicilline G stérile à une concentration de 500 unités /ml.

Culture des *Chlamydia pneumoniae*

Rappelons que la Glutamine résulte de l'amidification de la fonction acide de la chaîne latérale de l'acide glutamique et est la forme de transport de l'ammoniac dans l'organisme. La glutamine est un donneur d'azote (intervient dans la synthèse du noyau purine).

Notons que le niveau rénal et hépatique, il y a une glutaminase qui décompose la glutamine en glutamate et NH₃ selon la réaction



Au milieu rénal, l'ammoniac formé sera éliminé sous forme de NH₄⁺ après fixation d'un proton H⁺ provenant du métabolisme.



Au niveau rénal, l'ammoniac formé sera éliminé sous forme de NH₄⁺ après fixation d'un proton H⁺ provenant du métabolisme.



Cette élimination de protons intervient dans la régulation de l'équilibre acido-basique

Au niveau hépatique : l'ammoniac intervient dans la formation du carbamyl-phosphate, premier intermédiaire dans la synthèse de l'urée.

Ainsi le foie et le rein désamidifient la glutamine, régénèrent l'acide glutamique et forment de l'ammoniac. Cet ammoniac est éliminé directement, pour une faible partie, sous forme d'ions ammoniums urinaire et cette élimination est en rapport avec un autre processus physiologique, la régulation acido-basique du milieu intérieur.

Les antibiotiques additionnés au milieu inhibent la croissance de certains groupes de bactéries et les antifongiques inhibent la croissance des champignons

Glucose : la présence de la bactérie dans le milieu s'accompagne de la fermentation du glucose qui libère des acides organiques. Ces derniers diminuent le pH, entraînant ainsi un changement de coloration du bouillon

Sérum de veau fœtal : apporte des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol.

Cycloheximide : agit en bloquant le métabolisme cellulaire.

Réactifs utilisés pour l'entretien des cellules

*Solution de Trypsine –EDTA

Elle est utilisée pour la trypsination des cellules de composition :

.EDTA sodium	02g
.Glucose	1g
.Rouge de phénol	058g
.NaCl	002g
.Bicarbonate de sodium	058g
.Trypsine	05g
.Eau distillée	1000ml

La solution est conservée à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avant toute utilisation, la température est préalablement ramenée à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

*Solution de Bleu Trypan

.Bleu Trypan : 1g

.PBS : 100g

Cette solution est préparée extemporanément.

Elle est utilisée comme colorant, afin de tester la vitalité des cellules. En effet, le Bleu Trypan est un colorant qui ne pénètre que dans les cellules mortes dont la membrane ne peut plus l'exclure.