

INTRODUCTION

Les infections respiratoires basses aiguës chez l'adulte se définissent comme une atteinte unique ou mixte des structures de l'appareil respiratoire : parenchyme pulmonaire, trachée, bronches.

Si cette notion semble le plus souvent sous-tendue par l'étiologie virale (72), dans les pneumopathies communautaires, l'origine bactérienne prédomine et représente 60 à 80% des cas (70).

La prise en charge le plus souvent clinique, basée sur une antibiothérapie probabiliste, vise en première intention le pneumocoque, le pathogène le plus fréquemment rencontré (55), ce qui relègue au dernier plan, les agents atypiques : *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* pourtant reconnus comme responsables par une étude canadienne de 40% des pneumonies (68).

Au reste, 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 les échecs thérapeutiques qu'il se résigne à imputer aux agents atypiques ou alors les arguments dont il dispose sont sérologiques et donc davantage rétrospectifs que diagnostiques.

Dans le contexte africain où aucune étude microbiologique n'a été faite permettant de donner aux bactéries atypiques leur juste place, le groupe OBSAIRV(Observatoire Sénégalais en Antibiothérapie au cours des Infections Respiratoires de Ville) a initié cette étude par la mise en œuvre d'une méthode d'investigation bactériologique simple, non invasive et non contraignante pour le malade, en l'occurrence l'examen cyto-bactériologique des expectorations.

Notre exposé s'articulera autour de trois points :

- Les généralités concernant les pneumopathies atypiques ainsi que les bactéries incriminées
- Le détail de la démarche méthodologique adoptée
- Puis nous exposerons et discuterons les résultats observés.

GENERALITES

I - LES PNEUMOPATHIES DITES ATYPIQUES

Le terme de pneumopathies atypiques désigne une entité nosologique définie par un syndrome infectieux aux contours clinico-radiologiques flous (signes cliniques discrets, images radiologiques non systématisées) mais se singularisant par le caractère en général bénin et l'évolution le plus souvent favorable mais surtout par l'échec de l'antibiothérapie de première intention constituée par une amino-pénicilline (80, 86).

I.1 - LES GERMES EN CAUSE

En dehors des étiologies virales, de *Coxiella burnetti* et de *C. psittaci* (19) (dont le contexte épidémiologique particulier est constitué par un contact avec des animaux) qui ne sont pas l'objet de notre étude, on individualise d'autres agents bactériens intracellulaires ou adhérant aux cellules et désignés depuis peu sous le nom de "pathogènes privilégiés" (83), il s'agit de :

- *Legionella pneumophila*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*

I.2 - EPIDEMIOLOGIE

Dans une étude italienne effectuée en 1993, *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae* ont été ensemble à l'origine de 31% des infections respiratoires basses (IRB) (83).

Tandis que *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae* ont pour cible l'enfant et l'adulte jeune et sont impliqués dans les infections respiratoires chroniques (18, 56, 69),

L. pneumophila atteint le sujet d'âge mûr et l'évolution de l'infection est potentiellement plus grave dans la forme typique (49).

L'incidence des *Legionella* dans les pneumopathies communautaires est inférieure à 5% en France (63). *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* sont ensemble à l'origine de 15 à 40% des pneumopathies traitées en ville (69).

La gravité des pneumopathies atypiques est en rapport avec les facteurs de risque associés et les affections sous-jacentes (hospitalisation, immunodépression, maladies pulmonaires chroniques.)

I.3 - THERAPEUTIQUE

Des traitements symptomatiques sont utilisés comme adjuvants d'une antibiothérapie, en relation avec les signes associés.

L. pneumophila, *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae* ne sont pas sensibles aux bêtalactamines utilisées comme traitement en première intention. Le traitement prend en compte la sensibilité in vitro de l'agent pathogène aux diverses molécules (qui n'est pas toujours réalisée en pratique courante) mais aussi l'état d'immunocompétence de l'hôte et surtout les paramètres pharmacocinétiques de l'antibiotique (diffusion pulmonaire, activité intracellulaire).

Trois familles d'antibiotiques sont actives. Ce sont : les macrolides et apparentés, les cyclines, les fluoroquinolones ainsi que les nouvelles quinolones.

II - LEGIONELLA PNEUMOPHILA

II.1 - HISTORIQUE

En Juillet 1976 lors du 58^e congrès de l'"American Legion" à Philadelphie, une épidémie d'étiologie inconnue décima près de 40 personnes.

L'enquête menée a permis au Dr Mc Dade et ses collaborateurs d'isoler un an plus tard au CDC (Center for Deasee Control and Prevention) le germe responsable : *Legionella pneumophila* (66).

II.2 - ECOLOGIE

II.2.1 - Habitat

Legionella pneumophila et d'autres espèces de *Legionella* sont des bactéries aquatiques des eaux douces. La température de ces eaux varie entre +20° et +60°C (34).

Les réservoirs naturels sont constitués par les lacs, les rivières, les sols humides, les boues des ruisseaux, les eaux thermales sulfatées où les *Legionella* parasitent des amibes non pathogènes pour l'homme et certains protozoaires ciliés (40).

Les réservoirs artificiels sont constitués par les systèmes de climatisation défectueux, les chauffe-eau électriques, rarement les piscines et les bains bouillants (34).

II.2.2 – Résistance (35)

Legionella pneumophila peut être conservé vivant au laboratoire un an dans l'eau de robinet.

En bouillon, il est viable 112 jours à 25°C et 15 jours à +4°C.

In vitro, les antiseptiques halogénés, les ammoniums quaternaires et les alcools sont actifs contre les *Legionella*. Un mélange de 20% d'ammonium quaternaire et d'alcool 70° constitue un bon désinfectant pour les systèmes de climatisation.

II.3 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

II.3.1 - Taxinomie

L. pneumophila constitue l'espèce-type de la famille des *Legionellaceae* qui regroupe 39 espèces appartenant à un genre unique, *Legionella*. Ce sont des bacilles à Gram négatif aérobies, non sporulés, non acido-alcool résistants, non capsulés ayant des exigences culturelles en fer et en L-cystéine (sauf pour *L. oakridgensis*) et dont la paroi présente une proportion élevée en acide gras ramifiés (70%).

Chaque espèce est subdivisée en sérogroupes. L'espèce *L. pneumophila* comprend 15 sérogroupes (34).

II.3.2 - Morphologie

L. pneumophila est un coccobacille à Gram négatif de 0,2 à 0,9µ avec parfois des formes longues (20µ).

La coloration au noir Soudan montre l'existence de vacuoles lipidiques.

Il est flagellé, doué d'une mobilité polaire.

II.3.3 - Caractères cultureux

La croissance de *L. pneumophila* sur milieux solides est favorisée par le CO₂ (2,5%), le pH acide < 6,5 avec un optimum à 6,9 ± 0,05 ; la température optimale est de +35°C mais il peut cultiver à +42°C voire à +50°C

(58). Sur ces milieux , il donne des formes bacillaires et des formes filamenteuses. Plusieurs milieux ont été utilisés (29, 35) :

- La gélose Müller-Hinton (MH) +1% hémoglobine +1% Isovitalex
- Milieu de Feeley-Gorman (FG)
- Milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) qui constitue le milieu de choix

L. pneumophila donne en 3 - 7 jours, des colonies convexes bords nets présentant une fluorescence jaune pâle à la lumière de Wood et qui en vieillissant, deviennent confluentes luisantes, grisâtres et collantes.

L'addition de sels de sélénium favorise la croissance et donne les colonies rouges en 36 h. Sur milieux contenant la L-tyrosine, un pigment mélanique diffusible apparaît. L'addition de bleu de bromothymol et de bromocrésol donne des colonies blanches ou vert- pâles (29, 34, 47).

En milieux liquides, obtenus en supprimant l'agar des milieux BCYE et FG, *L. pneumophila* a un temps de génération long de 4h. Après une phase de latence de 3 à 5h, la croissance optimale est atteinte après 40 h.

II.3.4 - Caractères biochimiques

Legionella pneumophila produit :

Une tyrosinase

Une gélatinase

Une phosphatase alcaline (PAL)

Une arylsulfatase

Il hydrolyse l'amidon et l'hippurate. Il possède une oxydase et catalase faibles.

Il est asaccharolytique ne possède ni d'uréase ni du nitrate réductase.

Tableau I: Caractères différentiels de quelques espèces de *Legionella* (29)

| | Oxydase | Bêtalactamase | Fluorescence à 366 nm | Hydrolyse de l'hippurate | Gélatinase | Exigence en L-cystéine |
|------------------------|---------|---------------|-----------------------|--------------------------|------------|------------------------|
| <i>L. pneumophila</i> | + | + | Jaune - vert | + | + | + |
| <i>L. longbeachae</i> | + | + | Jaune - vert | - | + | + |
| <i>L. micdadei</i> | ± | - | Jaune - vert | - | - | + |
| <i>L. dumoffii</i> | - | + | Bleue | - | + | + |
| <i>L. jordanis</i> | + | + | Jaune - vert | - | + | + |
| <i>L. gormanii</i> | - | + | Bleue | - | + | + |
| <i>L. wadsworthii</i> | - | + | Jaune - vert | - | + | + |
| <i>L. oakridgensis</i> | - | ± | Jaune - vert | - | + | - |
| <i>L. bozemanii</i> | - | + | Bleue | - | + | + |

II.3.5 - Caractères antigéniques

Les spécificités antigéniques sont portées par la membrane externe et sont mis en évidence par précipitation en gel (PAGE-SDS) ou par immunoelectrophorèse

(30, 47).

On distingue :

- Des antigènes protéiques dont une protéine de 57- 62 kDa retrouvée chez toute les espèces de *Legionella* ainsi que chez d'autres bacilles Gram négatif.
- La MOMP, protéine majeure de la membrane externe de PM 24 - 29 kDa, présente chez tous les sérogroupes ; elle induit une réaction d'hypersensibilité de type retardée chez le cobaye (47).
- Le LPS, semblable à celui des autres bacilles à Gram négatif, à activité endotoxinique.

La chaîne polysaccharidique support de l'antigénicité O est caractéristique de chaque séro groupe.

II.4 - PHYSIOPATHOLOGIE

II.4.1 - Pouvoir pathogène naturel (34)

II.4.1.1 - La forme typique : la maladie des légionnaires

L'incubation est de 2 à 10 jours, le début brutal avec une triade pathognomonique (35, 91) :

- atteinte respiratoire à type de pneumonie fébrile progressive.
- des signes digestifs avec diarrhée aqueuse, nausées, vomissements.

- des signes neurologiques

L'évolution est émaillée de complications mettant en jeu le pronostic vital du malade : insuffisance rénale aiguë, coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), insuffisance respiratoire avec état de choc. Elle est mortelle dans 15 - 20% des cas sans traitement (35).

Ce tableau est typique chez les sujets à risque : fumeurs, alcooliques, immuno-déprimés.

L'infection est plus souvent asymptomatique, les signes frustrés ou alors analogues à ceux des autres pneumopathies ; dans ce cas, la résistance au traitement initial par une bêtalactamine oriente le diagnostic.

II.4.1.2-Les formes cliniques (34, 35, 86)

Il existe :

- des formes inapparentes de découverte sérologique.
- des formes bénignes paucisymptomatiques d'allure pseudo-grippale : c'est le cas de la fièvre de Pontiac.
- la forme de l'immuno-déprimé et la légionellose nosocomiale : elles associent un tableau typique de la maladie des légionnaires avec abcédation et surinfection par des bactéries opportunistes (*Klebsiella*, *Pseudomonas*). La mortalité est très élevée malgré une antibiothérapie adaptée (jusqu'à 80%) (35, 47).
- des formes compliquées avec détresse respiratoire et insuffisance rénale aiguë.

- des formes inhabituelles avec atteinte extra-pulmonaire ; elles peuvent être isolées ou prédominantes au cours des pneumonies ce sont :
 - l'atteinte neurologique avec obnubilation et confusion, le LCR est normal le plus souvent.
 - l'atteinte cardiaque le plus souvent à type de péricardite et isolement du germe dans les liquides de ponction ; des cas de myocardites chez l'enfant; des endocardites.
 - l'atteinte digestive le plus souvent de nature toxique (hépatite) ou par atteinte directe réalisant une péritonite ou une colite nécrosante avec perforation.
 - l'atteinte rénale avec des signes d 'insuffisance rénale aiguë dans 13% des cas, sans bactériurie (86) ; cependant l'antigénurie est fréquente lorsque l'atteinte rénale complique la pneumonie.
 - l'atteinte musculaire soit à type de myalgies banales soit une rhabdomyolyse (parfois associée à une myocardite asymptomatique) qui débouche sur une insuffisance rénale aiguë.

- Les atteintes diverses :
 - atteinte cutanée : avec rash diffus et rarement des abcès avec mise en évidence directe du germe.
 - atteinte oculaire et ORL (hémorragies rétinienes, sinusites).
 - septicémies exceptionnelles dues à une dissémination par voie hématogène (50).

- atteinte hématologique : hyperleucocytose avec polynucléose neutrophile; anémies hémolytiques ; thrombopénie ; CIVD (41).
- troubles hydro-électrolytiques avec hyponatrémie et fréquemment hypophosphorémie.

II.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental

Plusieurs animaux sont sensibles à l'infection par *L. pneumophila* ; il s'agit du singe macaque, de la souris AKR/J et du cobaye (47).

Les lésions sont plus intenses chez le cobaye :

- en inoculation par voie intrapéritonéale (VIP), on note des foyers d'inflammation et de nécrose au niveau du parenchyme splénique, des poumons, du foie, des ganglions lymphatiques, du pancréas, du cœur ; l'infection évolue vers la mort.
- on peut également provoquer une alvéolite pulmonaire en faisant inhaler au cobaye un aérosol contenant environ 10^5 *Legionella* (35).
- L'inoculation par voie intradermique (ID) a révélé une réaction d'hypersensibilité de type retardée (HSR) chez les mêmes animaux préalablement sensibilisés soit lors de l'infection soit par injection de *Legionella* tués par la chaleur.

II.4.3 - Pathogénie

II.4.3.1 - Mécanisme de la maladie (7)

Legionella pneumophila, introduit dans le parenchyme pulmonaire sous forme d'aérosol inspirés, rarement par inoculation directe, envahit les macrophages

alvéolaires réalisant une alvéolite purulente avec infiltration de polynucléaires et de macrophages enserrés dans un réseau fibrineux.

L'inflammation peut s'accompagner d'une hémorragie intra-alvéolaire, d'une extension aux bronchioles terminales et aux ganglions loco-régionaux.

On note parfois une atteinte pleurale mais les bronches et les bronchioles de plus gros calibre sont épargnées, ce qui explique que les germes soient peu nombreux dans les crachats, d'où une faible contagiosité interhumaine (7). Les formes bénignes seraient dues à l'inhalation de formes peu virulentes ou incapables de se multiplier dans les macrophages (40).

On pense que les formes extra-pulmonaires, où l'on retrouve rarement une implication directe du germe, seraient induites par des phénomènes toxiniques.

II.4.3.2 - Les facteurs de virulence

Legionella pneumophila est une bactérie à multiplication intracellulaire facultative. Il se fixe aux cellules hôtes puis y pénètre par endocytose.

Il se multiplie à l'intérieur des phagosomes, y croît et entraîne la destruction de la cellule -hôte.

Plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés (26) :

- les constituants cellulaires :
 - les adhésives
 - le LPS : il présente une activité biologique, endotoxinique et serait responsable des signes généraux (fièvre, céphalée) et de la CIVD cependant elle est faiblement pyrogène chez le lapin et peu toxique chez la souris.

- la MOMP : elle jouerait le rôle de porine et interviendrait comme cofacteur opsonisant avec le C₃ lors de la phagocytose.
 - la macrophage infectivity protein (MIP) : elle interviendrait pour faciliter l'endocytose et favoriserait la résistance à la fusion phagolysosomiale.
- les facteurs de virulence sécrétés
 - une toxine peptidique thermostable et une phosphatase thermosensible ont été décrites comme bloquant les mécanismes de la phagocytose.
 - diverses enzymes : nucléase, lipase, phosphatase, protéase ainsi qu'une légiolysine participent aux destructions des cellules-hôtes et aux dommages tissulaires.

Il semble que l'infectivité de *L. pneumophila* vis-à-vis des cellules humaines soit liée à une multiplication préalable dans l'environnement à l'intérieur de protozoaires parasites-hôtes (40).

II.5 - IMMUNITE

L'immunité contre *L. pneumophila* est essentiellement de type cellulaire T dépendant : une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) a été mise en évidence chez le cobaye.

La croissance intramacrophagique est inhibée par des lymphokines activant les macrophages.

Il existe également une immunité humorale passive transférable expérimentalement chez le cobaye mais non protectrice vis-à-vis de l'infection par des bactéries virulentes (7, 34, 35).

Les anticorps de type IgG, IgM et IgA apparaissent en 4-6 semaines ils sont probablement opsonisants en synergie avec le complément.

Les taux d'anticorps sont faibles voire nuls chez les immunodéprimés ; cependant ils peuvent rester élevés toute la vie chez certains malades.

II.6 - EPIDEMIOLOGIE

L. pneumophila est transmis par inhalation d'eau contaminée diffusée en aérosol. Il n'existe pas de transmission interhumaine ; la transmission par ingestion a été évoquée.

On distingue trois formes épidémiologiques (35, 47):

- les anadémies (maladies non contagieuses attaquant un grand nombre de personnes en un même lieu) : le cas historique du congrès de l'"American Legion" en est un exemple.
- Les foyers d'endémies : ce sont des lieux hébergeant des gîtes artificiels de légionelles (hôtels, hôpitaux).
- Les formes sporadiques : elles sont peu évaluées car le plus souvent bénignes. On note une séroprévalence chez 1 à 16% des adultes sains.

Les légionelles seraient responsables de 0,5 à 5% des pneumopathies communautaires sont. *L. pneumophila* a été retrouvé dans 80% des cas (49), cependant d'autres espèces sont incriminées ; il s'agit de *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. jordanis*, *L. gormanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. wadsworthii*.

Le pronostic de la maladie est certes lié à la virulence de la souche et à l'exposition fréquente à une source de contamination mais beaucoup plus aux facteurs de risques liés au sujet : l'âge croissant (50 ans et plus), le sexe masculin, le tabagisme, l'alcoolisme, le diabète, les états d'immuno-dépression (17).

II.7 - DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (34)

II.7.1 - Prélèvements

- chez l'homme, les prélèvements sont le plus souvent d'origine pulmonaire ; il s'agit :
 - d'expectorations
 - de liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA)
 - de liquide de ponction ou d'aspiration trachéale
 - de biopsie pulmonaire
 - de liquide pleural

La mise en évidence par hémoculture (sur milieux diphasiques) ou par biopsie d'organes dans les localisations extra-pulmonaires est rare.

- la recherche bactériologique au niveau des gîtes potentiels couplée à la démonstration de l'identité entre les souches isolées de malades et celles de l'environnement permet de localiser l'origine d'une contamination.

II.7.2 - Diagnostic direct

II.7.2.1 - détection dans les prélèvements

La coloration de Gram se révèle insatisfaisante pour visualiser *L. pneumophila* dans les prélèvements.

La coloration de Gimenez ainsi que les techniques d'imprégnation argentique ont cependant donné de bons résultats (29).

- **Immunofluorescence directe (IFD) :**

C'est la méthode la plus rapide pour évoquer le diagnostic d'une légionellose. Elle nécessite de disposer d'un microscope avec filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine et la maîtrise de la technique. Elle est spécifique (99,9%) ; elle est cependant peu sensible (25-80%) (29). Des réactions croisées ont été notées avec *Pseudomonas* ; *Bactéroïdes fragilis* ; *Escherichia coli* ; *Streptococcus pneumoniae* ; *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica* (34).

Il est nécessaire de disposer d'un antisérum couvrant tous les sérogroupes de *L. pneumophila* même si la plus part des souches humaines sont du séro groupe 1. L'utilisation de conjugués monovalents affine le diagnostic.

Les prélèvements doivent être manipulés avec précaution, les lames colorées une à une pour éviter la contamination d'un échantillon sans *Legionella* par un échantillon riche en *Legionella* (29).

Le CDC met à la disposition des laboratoires des pools d'anti-serums polyvalents. Il existe également dans le commerce des kits en particulier ; Monofluokit® *Legionella pneumophila* Diagnostics Pasteur ; le conjugué est un anticorps monoclonal commun à tous les sérogroupes de *L. pneumophila*.

- **Recherche d'antigènes solubles**

Les antigènes de *L. pneumophila* peuvent être détectés dans les urines et les expectorations.

L'antigénurie en particulier est détectable précocement : 1^{er}, 3^e jour ou plus tard au 7^e-15^e jour après le début de l'affection. La détection se fait par des

techniques d'agglutination, par des méthodes immuno-enzymatiques type ELISA et radio-immunologique ; les deux dernières techniques sont les plus sensibles (80%) et les plus spécifiques (99%).

Il faut noter que le délai d'apparition des antigènes urinaires ainsi que leur fréquence d'élimination demeurent les inconvénients de cette méthode de diagnostic (34).

- **Détection par des sondes nucléiques**

L'utilisation de sondes d'ADN ou d'ARN après marquage radioactif permet la détection en culture et dans les prélèvements quoique la sensibilité soit insuffisante pour la détection directe dans les prélèvements.

Des fragments de restriction d'ADN chromosomiques de plusieurs souches de *L. pneumophila* ont été utilisées par Grimont et coll. en 1985 (48) qui détectent environ 10^5 bactéries. Une sonde détectant l'ARNr 5S des *Legionella* est commercialisée par Gen Probe.

- **Amplification génique**

L'amplification génétique par PCR (Polymerase Chain Reaction) : elle consiste à amplifier une séquence de nucléotides d'un gène donné sur l'ADN monobrin à l'aide d'une amorce de bases complémentaires.

Plusieurs amorces sont utilisées : une amorce du gène MIP qui reconnaît trois espèces : *L. pneumophila* sérogroupes 1 à 14 ; *L. micdadei* et *L. bozemanii*.

Sont également utilisées, une amorce du gène de l'ARNr 5S spécifique des *Legionella* et une amorce de l'ARNr 16S de *L. pneumophila*. la détection du produit d'amplification se fait par diverses techniques : enzyme immuno-assay (EIA) , polarisation en fluorescence (37, 57).

Ces méthodes ont l'avantage d'être rapides et spécifiques ; les sensibilités sont variables suivant les kits.

II.7.2.2 - Culture

La difficulté dans l'isolement par culture de *L. pneumophila* réside dans sa lenteur de croissance et ses exigences nutritionnelles.

Le succès est fonction de la qualité du prélèvement (34).

La culture sur milieux spécifiques demeure la méthode de certitude diagnostique la spécificité est de 100% elle est sensible à 50-80% ; le délai minimum de réponse est de 2-3 jours (34).

Les milieux peuvent être rendus sélectifs par adjonction d'antibiotiques pour les prélèvements contaminés voire d'une décontamination thermique ou en tampon acide à pH 2,2 si les milieux sélectifs restent inefficaces (29).

L'identification des colonies repose sur les caractères cultureux : exigence en L-cystéine par absence de culture sur gélose trypticase-soja au sang ordinaire ; les caractères biochimiques, enzymatiques ; les caractères antigéniques par immunofluorescence directe d'une öse de colonie dans du formol tamponné ou l'agglutination à l'aide d'antisérum spécifique.

L'analyse de la composition en acide gras ramifiés de la paroi par chromatographie liquide haute performance (HPLC) complète l'identification (10).

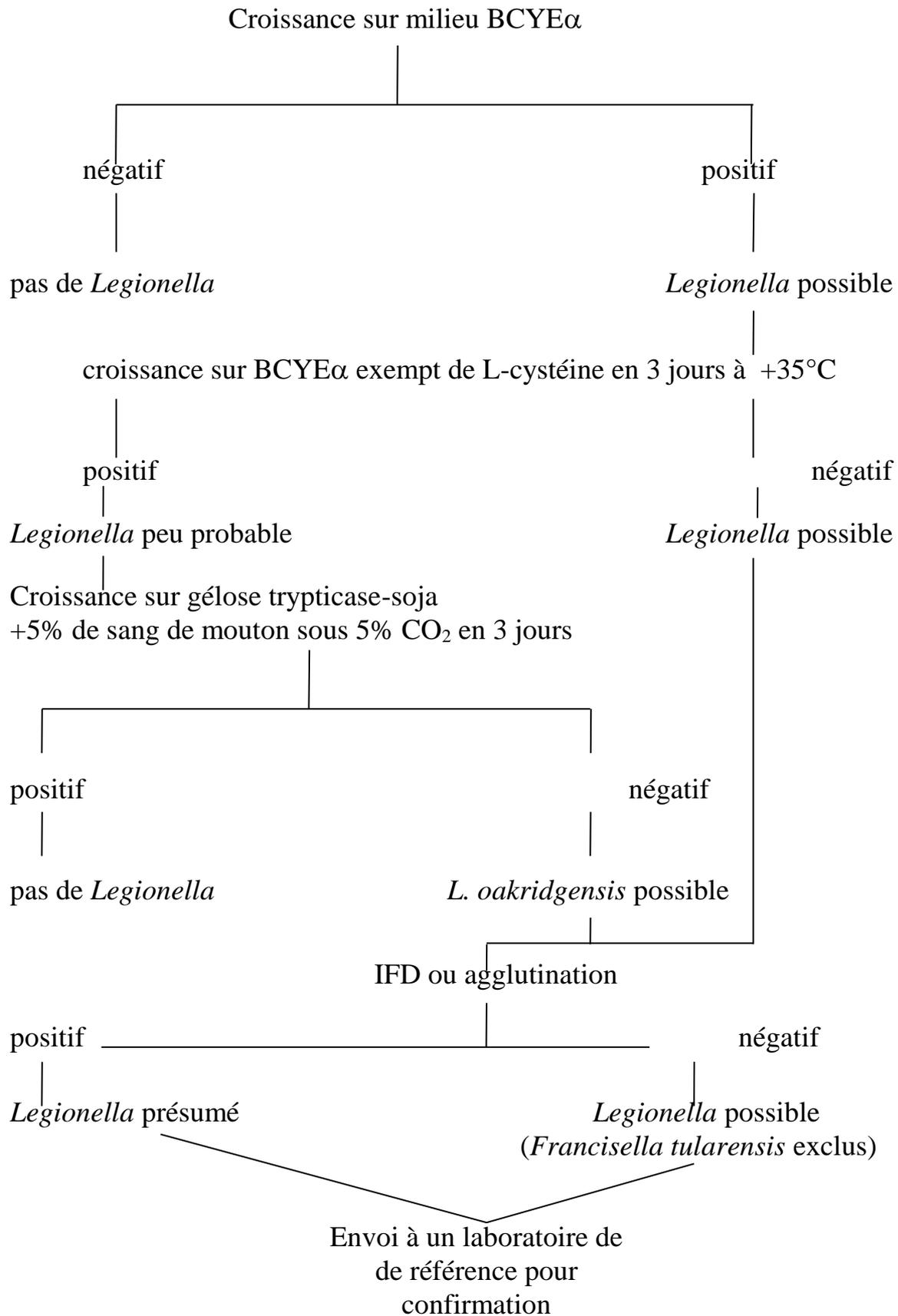


Figure1 : Schéma d'identification des bactéries du genre *Legionella*

II.7.3 - Diagnostic indirect

C'est la plus fréquente des méthodes diagnostiques bien que le plus souvent tardive et rétrospective.

Les anticorps apparaissent en 4 à 8 semaines après le début de la maladie (7).

Une ascension du titre d'anticorps spécifiques anti *L. pneumophila* (x 4 ou plus) entre un sérum précoce et un sérum tardif prélevé quatre semaines plus tard soit un titre unique élevé ≥ 256 en immunofluorescence indirecte (IFI) affirme le diagnostic (7, 71, 49).

Plusieurs méthodes sont utilisées : l'immunoadhérence, l'hémagglutination passive, les méthodes ELISA, la microagglutination (MA), l'IFI, méthode de référence (34).

Deux types de préparations antigéniques sont utilisées :

- des antigènes de culture sur milieu gélosé thermo-inactivés : ce sont les antigènes utilisés dans la MA. Le seuil de positivité est un titre d'anticorps ≥ 32 .
- des antigènes formolés obtenus par inoculation par voie vitelline d'œufs embryonnés : ce sont les antigènes utilisés dans l'IFI. Le seuil de positivité est de 128.

Des réactions croisées non réciproques ont été rapportées avec *M. pneumoniae* et *Chlamydia* (11).

II.8 - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

L. pneumophila possède une bêtalactamase d'où une résistance aux bêtalactamines. Il présente également une résistance naturelle à la vancomycine et à la colistine.

L'étude de la sensibilité *in vitro* des souches par la détermination des CMI pose de nombreux problèmes techniques : certains constituants du milieu BCYE : charbon, L- cystéine, pyrophosphate ferrique, inhibent l'action des antibiotiques (34).

Les CMI sont donc évaluées en bouillon CYE ou sur milieu gélosé BKYE (Buffered Ketoglutarate Yeast Extarct) recommandé par le CNR (Centre national de référence) des légionelles en France (81).

Les macrolides, parmi lesquels l'érythromycine ; la rifampicine ; les fluoroquinolones sont les plus actifs. Le traitement est long 2 - 3 semaines en monothérapie ou bithérapie dans les formes sévères, couplé à un traitement symptomatique s'il y a lieu (34, 35).

Des échecs thérapeutiques ont été notés, beaucoup plus liés au défaut d'immunocompétence de l'hôte qu'à la sélection des mutants résistants. Et il semble que l'efficacité thérapeutique soit un bon critère pour évaluer la susceptibilité de l'infection au traitement.

Tableau II : CMI de quelques antibiotiques actifs sur *L. pneumophila* (35)

| Antibiotique | CMI (µg / ml) |
|---------------------|----------------------|
| Rifampicine | ≤ 0,01 |
| Erythromycine | 0,1-0,2 |
| Céfoxitine | 0,1 |
| Céfuroxime | 0,1-0,2 |
| Aminosides | 0,25-0,5 |
| Chloramphénicol | 0,5 |
| Minocycline | 0,4 |

III - MYCOPLASMA PNEUMONIAE

III.1 - HISTORIQUE

En 1945, Eaton décrit la pneumonie primitive atypique humaine et l'agent responsable cultivé alors sur œuf embryonné fut assimilé à un virus. Ce n'est qu'en 1962 que Chanock et coll. (20) isolent sur milieu acellulaire et caractérisent l'agent de Eaton qui devient alors *Mycoplasma pneumoniae*.

III.2 - HABITAT

Transmis par contagio, *M. pneumoniae* colonise les voies respiratoires basses et provoque des infections respiratoires d'allure endémique du fait de sa persistance. Cependant, il n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires et son rôle pathogène est certain (4).

III.3 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

III.3.1 - Taxonomie

M. pneumoniae appartient à la classe des Mollicutes (regroupant des bactéries dépourvues de paroi), ordre des Mycoplasmatales, famille des Mycoplasmataceae qui comprend 85 espèces de genre *Mycoplasma* et 5 espèces de genre *Ureaplasma* (4).

III.3.2 - Morphologie (5)

M. pneumoniae, du fait de l'absence de paroi, est doué d'une grande plasticité ; sa taille de l'ordre de 0,2 - 0,3 μ . A l'instar des autres mycoplasmes, il n'est pas colorable au Gram et n'est pas visible au microscope photonique. La morphologie peut être par contre appréciée à l'examen en contraste de phase ou

mieux au microscope électronique où on note la présence d'une structure terminale à extrémité effilée : le "tip" qui permet l'adhésion aux différents supports (cellules-cibles, verre) (2). Les colonies peuvent être colorées par le colorant de Dienes.

III.3.3 - Caractères culturels

Bien qu'ayant d'abord été cultivé sur œuf embryonné, *M. pneumoniae* cultive sur milieu acellulaire.

Les milieux de culture requis sont complexes et contiennent des extraits de levures, du sérum qui supplée à l'exigence en stéroïdes, caractère de l'ordre. Ces milieux peuvent être rendus sélectifs par addition d'une bêta-lactamine et/ou d'une polymyxine.

Du fait de la lenteur de la culture, on privilégie les milieux diphasiques mais la culture sur milieu gélosé en parallèle avec une culture en milieu liquide contenant soit du glucose soit de l'arginine et un indicateur coloré, donne également de bons résultats. Le pH requis pour ces milieux est de l'ordre de 7,3 - 7,8. L'incubation se fait à 37°C en atmosphère microaérophile (95% N₂, 5% CO₂) ou sous 5% CO₂. La culture est longue ; en 3 - 21 jours, *M. pneumoniae* donne sur milieu gélosé en observation à la loupe ou au microscope en contraste de phase, des colonies incrustées dans la gélose, en cratère ou en "œuf sur le plat". La croissance en bouillon est appréciée par le virage de l'indicateur coloré (4, 43, 59).

Plusieurs milieux sont proposés :

- milieu de Hayflick
- milieu SP₄
- milieu PPLO

III.3.4 - Caractères métaboliques (4)

M. pneumoniae fermente le glucose, n'hydrolyse pas l'arginine ; il réduit en aérobiose le chlorure de triphényltrérazolium. Il possède les propriétés d'hémolyse et d'hémadsorption vis-à-vis des globules rouges de cobaye.

III.3.5 - Caractères antigéniques

L'antigène immunodominant est un organite de cytoadhérence : l'adhésine P₁, protéine de 165-190 kDa située au niveau du "tip"(52).

Il existe également un glycolipide membranaire que l'on retrouve aussi au niveau du myocarde, du tissu nerveux, chez certains streptocoques et végétaux.(4).

III.4 - PHYSIOPATHOLOGIE

III.4.1 - Pouvoir pathogène naturel

III.4.1.1 - Les infections respiratoires

L'atteinte respiratoire à type de pneumopathie primitive atypique a été la première décrite.

Le début est insidieux et progressif avec à la phase d'état, une hyperthermie avec fièvre à 39 - 40°C, une toux constante et invalidante avec céphalées, myalgies, arthralgies et des signes d'atteintes ORL (25, 39, 60) (rhinopharyngite, pharyngite, otite, myringite). La dyspnée est rare ; l'état général est bien conservé.

L'infection est le plus souvent bénigne voire inapparente cependant on note des formes graves prenant l'allure d'une pneumonie bactérienne nécrosante ; des formes abcédées ; des détresses respiratoires et des épanchements pleuraux. Ces formes sont fréquentes chez les sujets à risque (25, 64):

- immuno-déprimés
- drépanocytaires SS ou SC
- asthmatiques
- fumeurs

III.4.1.2 - Les affections extra-pulmonaires

Elles sont généralement associées à l'atteinte respiratoire mais elles peuvent être au premier plan avec absence possible des signes respiratoires et l'isolement du mycoplasme est difficilement réalisable au niveau de ces sites d'infections (42, 43).

Ainsi ont été décrites :

- les atteintes cutané-muqueuses

Elles sont variées, multiples et très évocatrices. Elles sont décrites chez 25% des malades (36, 61).

Ce sont le plus souvent des éruptions maculo-papuleuses voire vésiculeuses ; dans les cas plus graves, un syndrome de Stevens-Johnson et des érythèmes polymorphes (18).

- Les atteintes nerveuses et psychiatriques

Ce sont des états psychotiques, des méningo-encéphalites, des méningites aseptiques, des myélites (43).

- Les cardiopathies

Elles peuvent être infra-cliniques révélées par l'électro-cardiogramme (ECG) ou à type de péricardites et myocardites aiguës.

- Les atteintes hématologiques

Il s'agit d'une anémie hémolytique le plus souvent infra-clinique avec test de Coombs positif et agglutinines froides positives(6). Des thrombopénies, des coagulopathies à type de CIVD, la maladie de Raynaud.

- Les autres atteintes

Ce sont des atteintes rénales à type de glomérulo-néphrite aiguë ou de néphrite interstitielle ; des atteintes digestives de découverte biologique ; des atteintes articulaires (25).

III.4.1.3 - Les infections chroniques

M. pneumoniae et *C. pneumoniae* ont été récemment impliqués dans l'exacerbation de pathologies respiratoires chroniques telles que l'asthme (18). la persistance du germe dans les voies aériennes basses serait due aux propriétés immuno-modulatrices du germe (79) ainsi qu'à l'antibiothérapie probabiliste dans les IRB qui ne prend pas en compte *M. pneumoniae*.

III.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental

Les modèles d'infections expérimentales sont réalisés sur des animaux avec des souches de mycoplasmes animaux. Une maladie respiratoire est produite par inoculation intranasale de *M. pulmonis* à la souris (18).

Le chimpanzé et le cobaye sont sensibles à l'infection à *M. pneumoniae*. L'inoculation par voie nasale provoque chez le hamster, des lésions histopathologiques à type d'infiltrats périvasculaires et péribronchiques de cellules mononucléées comme celles observées chez l'homme (4).

III.4.3 - Pathogénie

Si les mécanismes des pathologies associées à *M. pneumoniae* demeurent encore inconnus, certains facteurs de virulence ont pu être décrits (4) :

- l'adhésine P₁, principal facteur d'adhésion aux cellules ciliées des épithéliums.

Elle interagit avec les lipopolysaccharides sulfatés et les récepteurs cellulaires riche en acide sialique nombreux au niveau bronchique (3, 4, 78). Il s'ensuit un arrêt de la mobilité des cils.

- Une hémolysine responsable de la nécrose cellulaire locale et probablement de l'anémie hémolytique par hémolyse intravasculaire.
- D'autres mécanismes d'ordre immunologique ont été décrits (4, 8, 79) :
 - Auto-immunité par antigénicité croisée entre la membrane des mycoplasmes et les membranes humaines.
 - Anergie passagère au cours de l'infection aiguë objectivée par une intra-dermo-réaction négative à la tuberculine.
 - *M. pneumoniae* induit également la production de cytokines pro-inflammatoires (IL₆, IL_{1β}, IFN_γ, IFN_β, IFN_α, TNF_α) responsables de l'inflammation bronchique.

III.5 - IMMUNITÉ

Les infections entraînent une immunité protectrice partielle ce qui explique la prépondérance chez l'enfant de plus de six mois et l'adulte jeune (36).

La protection paraît beaucoup plus liée à la présence d'IgA sécrétoires au niveau des sécrétions respiratoires qu'à celle d'anticorps sériques (1, 5).

III.6 - EPIDEMIOLOGIE

La transmission se fait par voie aérienne et nécessite des contacts étroits et prolongés avec le malade.

L'infection touche les enfants à partir de 6 mois. *M. pneumoniae* est responsable de 10 à 20% des pneumopathies de l'enfant de plus de 4 ans, où il occupe le deuxième rang après le pneumocoque (39, 42).

Il atteint l'adulte jeune sain présentant un facteur de risque bronchique (tabac, allergie). Il arrive en deuxième ou troisième position comme cause de pneumopathie communautaire chez l'adulte (39, 55, 70) ; mais les chiffres sont probablement sous-estimés du fait de l'infection le plus souvent inapparente.

Un recrudescence saisonnière automne - printemps a été signalée en France et en Pologne (24, 77).

Des co-infections sont possibles avec des germes à tropisme respiratoire (25).

III.7 - DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE

III.7.1 - Diagnostic bactériologique

III.7.1.1 - Prélèvements (4)

Les prélèvements doivent être riches en cellules auxquelles adhère *M. pneumoniae*.

Les prélèvements de gorge, les aspirations naso-pharyngées postérieures chez l'enfant, le liquide pleural ainsi que les prélèvements obtenus par des méthodes endoscopiques : brossage bronchique, sécrétions trachéales, liquide de LBA sont adaptés. Les expectorations par contre sont peu utilisées. D'autres échantillons en rapport avec des localisations extra-respiratoires peuvent être utilisés mais les résultats sont décevants ; ce sont : le LCR, les produits de lésions cutanées, le liquide articulaire, les pièces de biopsie synoviale, le sang (43).

Les prélèvements sont conservés à +4°C pendant 48h et à -70°C pour une longue période. Un milieu de transport est requis pour les écouvillonnages. Il s'agit des bouillons de culture pour *M. pneumoniae*, du milieu 2SP + 5% SVF ou du bouillon trypticase-soja +0,5% d'albumine +/- 400000 UI pénicilline G.

III.7.1.2 - Recherche d'antigènes

Parmi les antigènes, l'adhésine P₁ est la plus souvent détectée.

Plusieurs méthodes sont disponibles : immunofixation sur nitrocellulose, EIA par fixation directe de l'antigène ou par immunocapture. Elles utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, mais sont peu sensibles.

III.7.1.3. - Détection des acides nucléiques

Ce sont des techniques d'actualité, rapides :

- Les techniques d'hybridation moléculaire par utilisation de sondes moléculaires variées.
- La PCR elle utilise des amorces spécifiques de plusieurs gènes (séquences clonées au hasard , gènes d'ARNr 16S, gène de l'adhésine).

L'utilisation d'amorces spécifiques d'un fragment de l'adhésine P₁ permet la prise en charge rapide de l'infection (44).

III.7.1.4 - Culture

La culture de *M. pneumoniae* est décevante et peu utilisée. Elle se fait sur milieu diphasique ou simultanément en bouillon et sur milieu gélosé.

- Schéma de la culture

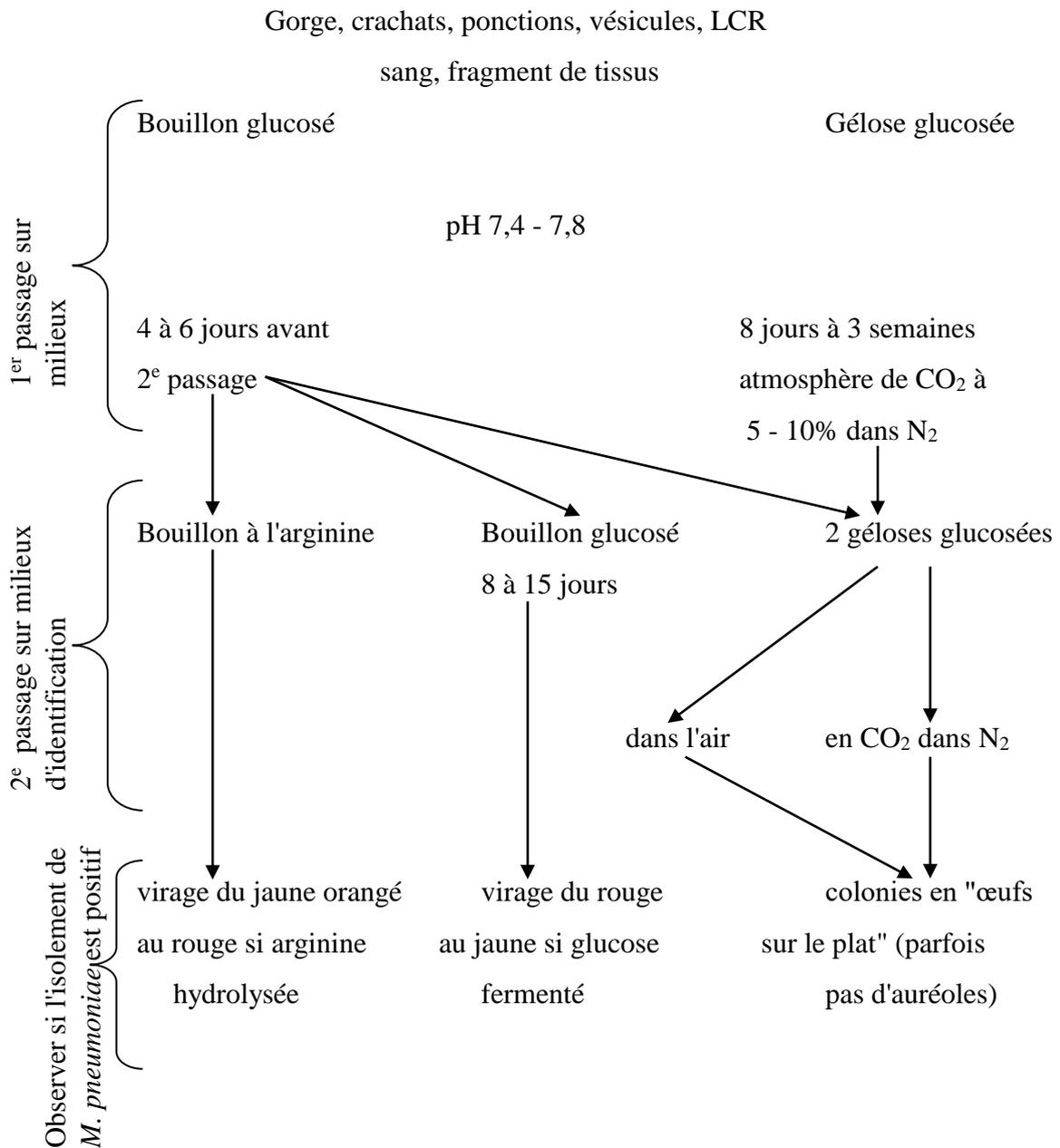


Figure 2 : Schéma d'isolement de *Mycoplasma pneumoniae* (9)

- **L'identification**

Elle se fait sur les caractères cultureux, biochimiques et métaboliques. L'identification antigénique par inhibition de croissance par des disques imprégnés d'anticorps spécifiques ou par épifluorescence constitue la méthode de référence (4).

L'amplification génique par PCR constitue également une alternative pour l'identification en culture.

Tableau III: Caractères différentiels entre *M. pneumoniae* et les autres mycoplasmes respiratoires (4).

| | Pouvoir pathogène | Isolement | Fermentation du glucose | Hydrolyse de l'urée | Hydrolyse de l'arginine | Hémolyse β |
|----------------------|-------------------|---|-------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|
| <i>M. pneumoniae</i> | Certain | Rare | + | - | - | + |
| <i>M. salivarium</i> | - | Fréquent | - | - | + | - |
| <i>M. orale</i> | - | Fréquent | - | - | + | - |
| <i>M. buccale</i> | - | Rare | - | - | + | - |
| <i>M. faucium</i> | - | Rare | - | - | + | - |
| <i>M. lipophilum</i> | - | Rare | - | - | + | - |
| <i>M. primatum</i> | - | Rare | - | - | + | - |
| <i>A. laidlawii</i> | - | Très rare | + | - | - | + |
| <i>M. genitalium</i> | probable | Co-isolé avec <i>M. pneumoniae</i> (21, 54) | + | - | - | - |

III.7.2 - Détection d'anticorps

- La détection des anticorps anti-mycoplasmes dans les sécrétions oro-pharyngées est possible (53).
- La sérologie est la méthode diagnostique la plus couramment pratiquée ; différentes techniques sont employées :
 - Des tests recherchant des anticorps capables d'inhiber la croissance in vitro de cultures de mycoplasmes ; elles sont laborieuses mais spécifiques.
 - Des tests détectant des titres élevés d'anticorps sériques ou une augmentation de quatre dilutions entre deux sérums prélevés à quinze jours d'intervalle et utilisant des antigènes inactivés.

On en recense plusieurs :

- **Réaction de fixation du complément (RFC).**

Elle utilise un antigène glycolipidique. Elle est peu spécifique mais très utilisée. Les anticorps sont détectables quatre semaines après le début de l'infection et persistent 6 à 12 mois. Un titre ≥ 256 indique une infection récente.

- **L'immunocapture ELISA et l'immunofluorescence indirecte (IFI).**

Ces techniques présentent l'avantage de détecter des IgM et ceci 9 jours seulement après le début des signes cliniques (89, 90).

La méthode ELISA est la plus sensible ; elle utilise un antigène protéique extrait de l'adhésine P₁ ; sa spécificité est de 80 à 90% (89).

- **L'agglutination passive de particules sensibilisées (hématies, gélatine, latex).**

Elle est peu spécifique mais également très utilisée car détectant des IgM.

Le seuil retenu est de 1280 (64).

- Les agglutinines froides(6).

Ce sont des anticorps irréguliers de type IgM dirigés contre l'antigène érythrocytaire I et présentant un maximum d'activité à +4°C.

Ils apparaissent dans 50% des cas d'infection à *M. pneumoniae* mais ne sont pas spécifiques car détectables également dans les infections à virus Epstein-Barr et dans les pneumopathies à Adénovirus (25, 89).

Ils sont détectables à la fin de la première semaine et atteignent un maximum à la deuxième ou troisième semaine.

Ils sont détestés par le test de Coombs indirect ; la spécificité est déterminée par titrage à +4°C vis-à-vis d'hématies OI+ et Oi+ (6).

III.8 - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Les mycoplasmes présentent une résistance naturelle aux antibiotiques de la paroi (bêtalactamines, bacitracine, vancomycine, fosfomycine) ainsi qu'aux antibiotiques polypeptidiques et à la rifampicine.

Les antibiotiques actifs sont les cyclines, les macrolides et apparentés, les fluoroquinolones (4).

Les profils de sensibilité sont déterminés *in vitro* en bouillons ou sur milieux gélosés (gélose SP₄) en évaluant la croissance par rapport à deux concentrations d'antibiotique, l'une maximale, l'autre minimale. Cependant,

l'étude de la sensibilité *in vitro* de *M. pneumoniae* n'est pas utile pour le traitement .

Tableau IV : CMI de quelques antibiotiques actifs sur *M. pneumoniae* (4)

| Antibiotique | CMI (µg/ml) |
|-------------------------|-------------|
| Doxycycline/Minocycline | 0,02 - 0,1 |
| Erythromycine | 0,03 - 0,06 |
| Roxithromycine | <0,01 |
| Clarithromycine | 0,05 |
| Lincomycine | 4 -8 |
| Josamycine | <0,01 -0,02 |
| Clindamycine | 1 - 2 |
| Pristinamycine | 0,02 - 0,05 |
| Péfloxacine | 2 |
| Ciprofloxacine | 1 |
| Ofloxacine | 0,05 - 1 |
| Sparfloxacine | 0,1 |

IV - *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

IV.1 - HISTORIQUE

Jusqu'alors désigné sous le nom de TWAR (Taiwan acute respiratory disease), du nom de deux souches : la première TW-183 isolée en 1965 d'un prélèvement oculaire chez un enfant de Taïwan participant à une campagne de vaccination contre le trachome ; et AR-39 isolée en 1983 à Seattle chez une étudiante présentant une pharyngite et considéré comme l'ensemble des souches spécifiquement humaines de *C. psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* a été individualisé en tant que troisième espèce du genre *Chlamydia* en 1989 (46).

Une souche dite IOL-207 isolée en 1968 en Iran à partir d'un prélèvement conjonctival est également établie sur des études sérologiques comme étant *Chlamydia pneumoniae* à l'instar de la souche TW-183. Une souche *C. pneumoniae*-like a été isolé d'un cheval bien que le réservoir de virus soit exclusivement humain (23).

IV.2 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

IV.2.1 - Taxonomie

C. pneumoniae appartient à l'ordre des Chlamydiales qui comprend une famille : Chlamydiaceae est un seul genre *Chlamydia*. Au sein de ce genre on décrit sur la base de critères biologiques, des caractéristiques génétiques et du pouvoir pathogène, quatre espèces :

C. trachomatis

C. psittaci

C. pneumoniae

C. pecorum.

Tableau V : Caractéristiques des espèces de *Chlamydia* (23)

| | <i>C. pneumoniae</i> | <i>C. trachomatis</i> | <i>C. psittaci</i> | <i>C. pecorum</i> |
|--------------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| Propriétés Biologiques | | | | |
| - hôte naturel | Homme | Homme | Oiseaux, mammifères | Bovins, moutons |
| - cible cellulaire | Epithélium respiratoire | Epithélium conjonctival et génital | Epithélium respiratoire | Epithélium respiratoire |
| - mode de transmission | Aérosol | Contact | Aérosol | Aérosol |
| - inclusions | | | | |
| • morphologie | Arrondie | Arrondie, unique | Variable, multiple | Variable, dense |
| • glycogène | - | + | - | - |
| • synthèse des folates | - | + | - | - |
| caractéristiques génétiques | | | | |
| - G+C (%) | 40 | 42 - 45 | 39 - 43 | 36,3 |
| - % homologie | | | | |
| • intraspécifique | 94 - 100 | 92 - 100 | 20 - 100 | 88 - 100 |
| • interspécifique | <10 | <10 | <10 | <10 |
| - plasmide | - | + | certaines souches | ? |
| caractéristiques antigéniques | | | | |
| - nombre de sérovars | 1 | - biovar trachoma : 14 - biovar LGV : 4 | nombreux | 3 |
| pouvoir pathogène | pneumopathies | trachome, LGV, infections oculo-génitales | anthropozoonoses | zoonoses |

IV.2.2 - Morphologie et cycle de développement

C. pneumoniae comme les autres *Chlamydiae* se développe au sein du cytoplasme des cellules-hôtes où alternent deux formes principales :

Les corps élémentaires (CE) qui se distinguent des CE des autres *Chlamydiae* par leur forme en poire ($0,44\mu \times 0,31 \mu$) et un espace périplasmique important. Le CE est adapté au transit extracellulaire, c'est la forme infectieuse, incapable de se diviser.

Le corps réticulé (CR) plus gros ($80-100\mu$) adapté au milieu intracellulaire, non infectieux ; c'est la forme métaboliquement active.

Une forme accessoire intermédiaire entre le CE et le CR : le corps intermédiaire (CI).

C. pneumoniae possède une paroi analogue à celle des bactéries à Gram négatif, composée d'une membrane interne et d'une membrane externe séparées par un espace périplasmique, cependant il n'y a pas de peptidoglycane. Paradoxalement on note la présence de protéines de liaison aux pénicillines (PLP) (23) ce qui confère une sensibilité aux antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi.

IV.2.3 - Caractères antigéniques

C. pneumoniae possède des antigènes de genre qu'il partage avec les autres espèces de *Chlamydiae* et des antigènes propres. Ces antigènes ont été caractérisés par immuno-blot avec des antisérums de lapins après fractionnement en PAGE-SDS (14, 27, 62).

- Les antigènes de genre :

- Le lipopolysaccharide (LPS) :

localisé dans la membrane externe, il partage des déterminants antigéniques avec les LPS des bactéries à Gram négatif

- Les protéines associées au complexe de membrane externe (CME) :

Ce sont des protéines de poids moléculaire (PM) variable, riches en cystéine et responsables de la rigidité des CE. Parmi elles, la protéine majeure de membrane externe (MOMP). Celle de *C. pneumoniae* de PM 39,5 kDa est peu immunogène. Les anticorps anti-MOMP de *C. pneumoniae* interagissent avec les MOMP des autres *Chlamydiae*.

- Les antigènes d'espèce

Elles sont associées au CME. On distingue (14) :

- Une protéine de PM 98 kDa unique chez *C. pneumoniae* et qui est responsable de la morphologie en poire du CE.
- Une protéine de 43 kDa et une autre de 53 kDa ont été détectées par microimmunofluorescence (MIF) en post-mortem chez des patients présentant une athérosclérose (76).

IV.3 - EPIDEMIOLOGIE

L'homme est le seul réservoir de *C. pneumoniae*. La transmission se fait par voie aérienne par l'intermédiaire de sujets infectés, malades ou asymptomatiques.

L'infection touche le sujet jeune. La primo-infection a lieu à l'âge scolaire ou rarement à l'adolescence et induit une immunité relativement brève (3 - 5 ans) ; cependant les anticorps ne sont pas protecteurs.

Des études de séroprévalence ont révélé des anticorps chez 40 - 70% des personnes âgées ce qui suggère une réinfection au cours de la vie (23, 28, 75).

Les hommes sont plus atteints que les femmes. L'infection est ubiquitaire avec une prévalence plus forte dans les pays en développement. Il n'y a pas de périodicité saisonnière.

C. pneumoniae est responsable de 6 - 10% des pneumopathies communautaires (45).

IV.4 - PHYSIOPATHOLOGIE

IV.4.1 - Manifestations cliniques

Les infections à *C. pneumoniae* sont dominées par les atteintes respiratoires le plus souvent bénignes. Récemment son implication dans la pathologie cardiovasculaire a été suggérée (15).

IV.4.1.1 - les infections respiratoires

La période d'incubation est longue 7 - 21 jours. La maladie commence généralement par une infection haute à type de pharyngite avec gorge douloureuse accompagnée souvent d'un enrouement.

On note une fièvre avec céphalées et confusion ainsi qu'une toux non productive. Les signes radiologiques sont discrets. L'infection demeure le plus souvent asymptomatique ou paucisymptomatique et l'évolution est habituellement favorable.

Des formes sévères ont été décrites chez les sujets à risque : hospitalisés, immunodéprimés, personnes âgées, malades présentant des pathologies pulmonaires chroniques. Dans ce cas l'évolution se fait vers une bronchite ou une pneumopathie bilatérale extensive avec souvent épanchement pleural dont la gravité est liée au risque de surinfection par *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* ou les virus à tropisme respiratoire (23, 62).

IV.4.1.2 - L'athérosclérose

Des arguments sérologiques ont montré l'implication de *C. pneumoniae* dans l'athérosclérose sans manifestations cliniques mais aussi dans l'infarctus du myocarde.

C. pneumoniae a été décelé dans les plaques d'athérome suggérant son implication directe dans la maladie (75, 85).

Une infection préalable à *C. pneumoniae* semble être à l'origine de la maladie coronarienne aiguë mais un mécanisme probablement auto-immun par persistance du germe a été évoqué.

IV.4.1.3 - Autres affections

- Les affections respiratoires hautes : sinusites, otites moyennes ont été rapportées.
- *C. pneumoniae* a été également associé à des affections diverses : une endocardite, une myocardite, une méningoradiculite, une sarcoïdose, un syndrome de Guillain-Barré, une arthrite réactive, un érythème noueux, la bronchite asthmatiforme et le déclenchement de la crise d'asthme (18, 67, 73).

IV.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental (23)

Trois animaux de laboratoire sont sensibles à l'infection par *C. pneumoniae*. Ce sont le singe, la souris, le lapin. La souris est la plus sensible en inoculation par voie intranasale, sous-cutanée, intraveineuse, intracérébrale.

L'inoculation par voie intranasale induit chez la souris, une pneumonie interstitielle avec infiltrats de polynucléaires puis de monocytes. On observe une accumulation périvasculaire et péribronchique de cellules lymphoïdes et l'infection persiste pendant plus de 60 jours à l'opposé de la pneumonie induite par *C. trachomatis* (62).

On note également la présence de la bactérie dans les macrophages de la rate et du péritoine, preuve de la dissémination par voie sanguine.

IV.4.3 - Pathogénie

IV.4.3.1 - Mécanismes immunopathologiques de l'infection

C. pneumoniae pénètre dans l'épithélium respiratoire sous forme d'aérosol. Il se dissémine ensuite par voie sanguine d'où il infecte les autres organes : foie, rate, poumons. Cela explique sans doute la longue incubation (38).

- Les anticorps induits lors de la primo- infection ou d'une infection aiguë récente, protègent contre une forme sévère lors de la réinfection (31, 62).
- Le mécanisme de l'infection chronique à *C. pneumoniae* est probablement comparable à celui de *C. trachomatis* :

La croissance intracellulaire des *Chlamydiae* libère le LPS qui, interagissant avec les cellules immunocompétentes CD₄⁺, induit la production de cytokines dont l'IFN γ . L'IFN γ , facteur de stress, induit la formation de corps aberrants qui

libèrent de grandes quantités d'une protéine de 60 kDa incluse dans le CME : la heat shock protein (hsp-60) (23).

La réaction inflammatoire chronique ainsi que des communautés antigéniques possibles entre la hsp-60 de *C. pneumoniae* et celle de l'hôte font évoquer un mécanisme fort probablement auto- immun.

- Enfin, d'autres mécanismes ont été suggérés et non encore spécifiés :
 - Production d'anticorps anti- *Chlamydiae* de type IgE dans l'asthme (18).
 - Action pro-coagulante et production de complexes immuns dans l'athérosclérose (18, 23, 32, 67).

IV.4.3.2 - Persistance

Les infections à *C. pneumoniae*, le plus souvent asymptomatiques, sont volontiers chroniques (51, 70) Il a été démontré, sur la base de critères cliniques et biologiques, par Hammerschlag et coll. (51) que l'infection à *C. pneumoniae* peut persister jusqu'à un an après l'épisode aigu.

- La persistance de *C. pneumoniae* sous forme de corps aberrants quiescents, pourrait expliquer les maladies chroniques. Cependant, les modalités de réactivation du cycle ne sont pas connues. L'hypothèse d'une co-infection comme agent déclenchant a été évoquée.

Ces formes quiescentes ne répondent pas à l'antibiothérapie ; elles ne sont pas cultivables et l'antigène hsp-60 n'est pas détecté par les méthodes de recherche d'antigènes qui utilisent des anticorps anti -MOMP ou anti -LPS.

Ces corps aberrants seuls n'expliquent pas l'infection persistante dont il semble peu probable que le site soit les cellules épithéliales, du fait de leur temps de renouvellement court. On pense que les macrophages alvéolaires constitueraient les sites de ces infections persistantes (18, 38).

- Dans la pathologie vasculaire, des formes viables de *C. pneumoniae* ont été décelées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et monocytes. Le site de l'infection chronique serait constitué par les macrophages des parois artérielles.

IV.5 – IMMUNITE (38)

L'infection à *C. pneumoniae* induit une immunité humorale : IgA sécrétoires, IgM, IgG, IgA sériques. Ces anticorps peu protecteurs sont dirigés contre les spécificités antigéniques de la MOMP et contre le LPS.

L'immunité comme pour les germes intracellulaires est de type cellulaire médiée par les cellules cytotoxiques et par les lymphocytes T qui produisent cytokines notamment l'IFN γ dont on connaît le rôle dans l'infection persistante.

IV.6 - DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE

IV.6.1 - Diagnostic bactériologique

IV.6.1.1 - Prélèvements

Les prélèvements doivent ramener le maximum de cellules.

Ce sont des écouvillonnages pharyngés utilisant des écouvillons en alginate, en coton, en dacron (23, 28) ; chez l'enfant, des prélèvements nasopharyngés postérieurs. Les prélèvements sous fibroscopie : brossage protégé distal, lavage bronchoalvéolaire (LBA), donnent les meilleurs résultats.

Les expectorations peuvent être également utilisées.

Les prélèvements sont conservés à +4°C 1 à 4 h avant d'être congelés à -70°C si l'analyse est différée.

Un milieu de transport est requis pour la culture cellulaire. Le milieu 2SP (sucrose diphosphate) additionné de 5% de sérum de veau fœtal (SVF) et le milieu SPG (sucrose phosphate glutamate) sont les plus utilisés. Ils peuvent être rendus sélectifs par des inhibiteurs : streptomycine (200 µg/ml), vancomycine (100µg/ml), amphotéricine B (4 µg/ml) (82).

IV.6.1.2 - Détection des antigènes

La détection des antigènes dans les produits pathologiques se fait par plusieurs méthodes :

- les tests immunoenzymatiques type ELISA

L'anticorps est conjugué à une enzyme capable de transformer un substrat en composé coloré. L'intensité de la coloration est évaluée par les mesures de densités optiques (DO) au spectrophotomètre.

- L'immunofluorescence directe (IFD)

Le frottis du prélèvement est coloré à l'aide d'anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine. L'examen au microscope à fluorescence révèle les CE vert-brillant sur fond de cellules épithéliales rouges.

- Il existe également des tests rapides sur membrane plus utilisés pour le diagnostic des infections génitales à *C. trachomatis*.

La sensibilité des tests dépend de la nature monoclonale ou polyclonale des anticorps utilisés mais aussi de l'antigène visé. Pour l'IFD, la sensibilité dépend de l'examineur et du seuil de positivité retenu.

Un test de confirmation est alors nécessaire.

IV.6.1.3 - Isolement

- Culture cellulaire

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

Les lignées cellulaires les plus sensibles à l'infection par *C. pneumoniae* sont les cellules HEP-2 et HL. De multiples passages sont cependant requis. La sensibilité augmente par une centrifugation préalable de l'inoculum et l'adjonction de cycloheximide dans le milieu de culture (28).

- Identification

La cytologie en coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) a été supplantée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à de la fluorescéine (23, 75).

Des méthodes immunoenzymatiques, d'extraction des antigènes et l'utilisation de sondes moléculaires ont été également proposées pour l'identification.

IV.6.1.4 - Détection des acides nucléiques

La détection des acides nucléiques est d'actualité. elle permet la confirmation des résultats des méthodes d'investigation directe ; elle a l'avantage d'être plus sensible que la culture.

Parmi ces techniques :

- L'hybridation en milieu liquide

Elle utilise une sonde marquée par un ester d'acridinium et complémentaire de l'ARNr du genre *Chlamydia*.

- La PCR

Elle amplifie des séquences- cibles de gènes du génome bactérien.

Pour *C. pneumoniae*, on réalise une PCR par étape, par l'amplification de séquence d'ADN spécifiques du genre *Chlamydia* (gène de l'ARNr, gène de la MOMP), puis séquençage de fragments d'ADN spécifique de *C. pneumoniae*.

Il existe des PCR en multiplex qui détectent plusieurs pathogènes respiratoires à la fois (75).

IV.6.2 - Sérologie

Elle consiste en la mise en évidence d'anticorps IgM, IgA ou IgG dans le sérum.

- Les techniques de détection d'antigènes de genre :

- La réaction de fixation du complément (RFC)

Elle utilise comme antigène le LPS préparé à partir de souches de culture cellulaire thermo-inactivées.

- Les méthodes ELISA

Elles utilisent un broyat de bactéries fixées dans les puits d'une microplaque. La réaction antigène - anticorps est révélée par une enzyme qui transforme un substrat en produit coloré.

- Les techniques de détection d'antigènes d'espèces.

La technique utilisée est la microimmunofluorescence

*** Critères de sérodiagnostic de *C. pneumoniae***

Des titres-seuils d'anticorps ont été retenus permettant l'interprétation des résultats du fait du caractère chronique des infections et des taux de séroprévalence élevés.

Tableau VI : Critères d'interprétation du sérodiagnostic de *Chlamydia pneumoniae* (62).

| Test | Résultat positif |
|-----------------------------------|---|
| MIF : ⇒ Infection aiguë | <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du titre d'Ac (x4) sur deux prélèvements obtenus à 3 - 4 semaines d'intervalle. • IgM \geq 16 • IgG \geq 512 |
| ⇒ Infection chronique | IgG f - 256 |
| RFC : | <ul style="list-style-type: none"> • \geq 64 • ascension (x4) du titre d'Ac sur 2 prélèvements |

Aussi bien les méthodes d'investigation directes que la sérologie doivent être corrélées à la clinique pour la certitude du diagnostic du fait du caractère

chronique de l'infection, des formes asymptomatiques et des taux élevés de séroprévalence (74).

IV.7 - SENSIBILITE AUX ANTIBACTERIENS

Les macrolides et les cyclines sont les antibiotiques les plus actifs in vitro. Ils sont recommandés en première intention pendant 14 jours en moyenne pour éviter les risques de persistance.

Les nouveaux macrolides : roxithromycine, clarithromycine, azithromycine, dirithromycine sont efficaces et mieux tolérés.

Les fluoroquinolones, sparfloxacin, ofloxacine sont également actives ainsi que les méthoxyquinolones.

Certaines molécules antiallergiques inhibent également la croissance in vitro des *C. pneumoniae*.

Les études de sensibilités in vitro sont effectuées par déterminations des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur des cultures de *C. pneumoniae* sur cellules HEP-2 prétraitées à la cycloheximide.

Tableau VII : CMI de quelques antibiotiques potentiellement actifs sur les *Chlamydiae*

| Antibiotiques | CMI (µg/ml) |
|--------------------------------|-------------|
| Rifampicine | 0,005 - 0,2 |
| Minocycline | 0,001 - 0,2 |
| Doxycycline | 0,03 - 0,2 |
| Erythromycine et Azithromycine | 0,05 - 0,1 |
| Sparfloxacin | 0,02 - 0,05 |
| Ciprofloxacine et Ofloxacine | 0,5 - 4 |
| Chloramphénicol | 1 - 4 |

| | |
|-------------|--------|
| Péfloxacin | 2 |
| Norfloxacin | 8 - 16 |

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIELS

I.1 - CADRE DE L'ETUDE

L'unité de recherche et de biotechnologie du laboratoire de Bactériologie et de Virologie de l'hôpital ALD a servi de cadre à la réalisation de cette étude .

I.2 - LA POPULATION -CIBLE

Il s'agit de patients adultes hommes et femmes ayant consenti librement à adhérer à l'étude et recrutés sur la base de critères cliniques d'atteinte respiratoire basse au niveau trois services du CHU de Dakar :

- le service de Médecine interne de l'hôpital A.L.D
- les services de Pneumo-physiologie et des Maladies Infectieuses de l'hôpital FANN

et au niveau de services médicaux d'entreprises et en consultation dans les cabinets médicaux privés.

I.3 - MATERIELS DE PRELEVEMENT

- Pots stériles
- Milieux de transport à +4°C constitué d'une glacière contenant des ice - packs
- Eau physiologique stérile

I.4 - MATERIELS DE LABORATOIRE

I.4.1 - Equipement de laboratoire

- Jarre d'incubation
- Etuve à 37°C
- Plaques de microtitration
- Bec Bunsen
- Réfrigérateur à +4°C
- Congélateur à -20°C et à -70°C
- Microscope optique
- Microscope à fluorescence
- Microscope à contraste de phase
- Vortex
- Autoclave
- Balance de précision
- Etuve à CO₂
- Hotte à flux laminaire
- Lames porte -objet
- Lamelles couvre -objet
- Lames d'immunofluorescence à deux puits
- Anses de platine
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Seringues à usage unique de 10 ml
- Filtres de 0,20 µ de diamètre de pores
- Ecouvillons stériles
- Eau distillée stérile

- Tubes à hémolyse
- Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre
- Flacons de culture cellulaire de 50 ml
- Tubes coniques stériles de 50 ml
- Eau pour préparation injectable stérile
- PH-mètre

I.4.2 - Réactifs de coloration

I.4.2.1 - Colorants pour le Gram

Violet Gentiane

| | |
|------------------------------|-----|
| - Violet Gentiane | 1 g |
| - Acide phénique cristallisé | 2 g |
| - Alcool 95° | 10 |
| ml | |
| - Eau distillée | 100 |
| ml | |

Lugol

| | |
|-----------------------|-----|
| - Iode | 1 g |
| - Iodure de potassium | 2 g |
| - Eau | 200 |
| ml | |

Solution de fuchsine de Ziehl

| | |
|------------------------------|-----|
| - Fuchsine basique | 1 g |
| - Acide phénique cristallisé | 5 g |
| - Alcool | 10 |
| ml | |

- Eau distillée 100 ml

I.4.2.2 - Colorant pour la cytologie quantitative

- Bleu de méthylène hydrosoluble 1 g
- Eau distillée 100 ml

I.4.2.3 - Colorants pour le Ziehl

Fuchsine phéniquée de Ziehl

- Solution alcoolique saturée de fuchsine
 - Fuchsine basique 3 g
 - Alcool méthylique à 95% 100 ml
- Solution de travail
 - Cristaux de phénol 5 g / 90 ml d'eau
 - Solution alcoolique de fuchsine 10 ml

Acide sulfurique à 25%

- Acide sulfurique 100 ml
- Eau distillée 300 ml

Contre colorant au bleu de méthylène

- Bleu de méthylène hydrosoluble 0,3 g
- Eau distillée 100 ml

I.4.3 - Réactifs pour l'IFD de *Legionella pneumophila*

- Formol neutre à 10%
- Antisérums polyvalents anti-*Legionella pneumophila* conjugués à de la fluorescéine sérogroupes 1 à 4 (pool B du CDC)
- Tampon phosphate pH 7,6
- Tampon carbonate glycérol pH 9
- Souches de référence lyophilisées du CDC : *Legionella pneumophila* sérogroupes 1 à 4 :
 - *Legionella pneumophila* séro groupe 1 : souche Philadelphia 1
 - *Legionella pneumophila* séro groupe 2 : souche Togus 1
 - *Legionella pneumophila* séro groupe 3 : souche Bloomington 2
 - *Legionella pneumophila* séro groupe 4 : souche Los Angeles 1

I.4.4 - Kits CHLAMYVIT® optimisés pour la détection d'antigènes de *Chlamydiae pneumoniae*. PBS Organics (référence 61003)

I.4.5 - Milieux de culture

- Milieux BCYE α
- Milieux BCYE α / VC
- Bouillon glucosé à pH 7,8
- Bouillon à l'arginine à pH 7,3
- Milieux diphasiques pour *Mycoplasma pneumoniae*

I.1.4 - Réactif pour la confirmation des colonies de *Mycoplasma pneumoniae*

Il s'agit de cellules HEP-2 en milieu DMEM (Dulbecco Modified eagle medium) +5% SVF

| | |
|------------------|--------------|
| + pénicilline G | 100000 UI/ l |
| +Streptomycine | 100000 UI/ l |
| +Amphotéricine B | 1250 UG/ l |

conservées à 37°C dans l'étuve à CO₂.

II -METHODE

II.1 - PREPARATION ET CONTROLE DES REACTIFS ET MILIEUX DE CULTURE

II.1.1 - Réactifs pour l'IFD de *Legionella pneumophila*

II.1.1.1 - Formol neutre à 10%

- | | |
|---|---------|
| • Formol du commerce titrant entre 37% et 40% | 100 ml |
| • Na ₂ HPO ₄ | 12 g |
| • KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| • Eau distillée QSP | 1000 ml |

Les différents constituants ont été mélangés puis le pH ajusté à 7 par HCL 1N.

La stérilisation a été faite par filtration à l'aide d'un filtre de 0,2 µm dans un flacon stérile avant la conservation au réfrigérateur à +4°C.

I.1.1.2 - Antisérum polyvalent anti *Legionella pneumophila* sérogroupes 1, 2, 3 et 4

Il s'agit l'anticorps lyophilisé du CDC qui a été régénéré avec 0,5 ml d'EPPI stérile.

I.1.1.3 - Tampon phosphate pH 7,6

- | | |
|---|---------|
| • Na ₂ HPO ₄ | 12,4 g |
| • Na ₂ H ₂ PO ₄ , H ₂ O | 1,8 g |
| • NaCl | 85 g |
| • Eau distillée QSP | 1000 ml |

Après mélange des différents constituants, la solution obtenue a été diluée au 1/10^e dans de l'eau distillée puis le pH à 7,6 ajusté par NaOH 1N. La solution a été ensuite stérilisée par filtration puis conservée au réfrigérateur à +4°C

I.1.1.4 - Tampon carbonate glycérol pH 9

- Solution A
 - Na₂CO₃ 5,3 g
 - Eau distillée 100 ml
- Solution B
 - NaHCO₃ 4,2 g
 - Eau distillée 100 ml

- Préparation du tampon carbonate pH 9

A 4,4 ml de solution A ont été ajoutés 100 ml de solution B. Le pH a été ajusté à 9 par la solution A puis la solution ainsi obtenue a été stérilisée par filtration.

- Le tampon carbonate glycérol a été obtenu en mélangeant par retournement dans un tube stérile, une partie de tampon carbonate stérile à 9 parties de glycérol pur, préalablement stérilisé en autoclave à 121°C pendant 30 mn.

Le pH a été ajusté à 9 par NaOH 1N stérile puis le tampon a été conservé au réfrigérateur jusqu'au moment de l'emploi.

II.1.2 - Milieux de culture

II.1.2.1 - Milieux de culture pour *Legionella pneumophila*

Il s'agit des milieux BCYE α et BCYE α /VC.

- Milieu de base

Il s'agit du milieu de base de Bio Mérieux prêt à l'emploi disponible en flacons de 200 ml et dont la composition en g/l est la suivante :

| | |
|--------------------|-----|
| Extrait de levures | 10 |
| Charbon activé | 1,5 |
| Tampon ACES | 10 |
| KOH | 2,8 |
| Agar | 17 |

- Suppléments d'enrichissement

Les suppléments sont incorporés stérilement au milieu de base préalablement régénéré au bain-marie bouillant et refroidi à 50°C.

- SVF 5 ml
- Solution de L-cystéine, HCl à 0,4 g/ml stérilisé par filtration :
2 ml
- Solution d'acétoglurate monopotassique à 1 g/10 ml stérilisé par filtration : 2 ml

Le pH du milieu a été ajusté à 6,9 par HCl 1N stérile avant la répartition en boîtes de Pétri rondes de 90 mm de diamètre à raison de 30 ml par boîte.

La stérilité a été testée en incubant une boîte à l'étuve à +37°C pendant 18 h puis les milieux ont été conservés au réfrigérateur à +4°C en sachets plastiques.

- Le milieu BCYE α /VC a été préparé en incorporant stérilement au milieu BCYE α le supplément sélectif lyophilisé (Bio - Mérieux) régénéré avec 2ml d'eau distillée stérile. La composition du supplément sélectif pour 200 ml de milieu de base est la suivante :

| | |
|---------------|-------------|
| – Vancomycine | 200 μ g |
| – Colistine | 9000 UI |

II.1.2.2 - Milieux de culture pour *Mycoplasma pneumoniae*

Il s'agit de milieux préparés au laboratoire s'inspirant des différents milieux existants (Hayflick, PPLO). Les principes de culture de *Mycoplasma pneumoniae* (exigence en stérols apportés par le SVF; pH de croissance 7,3-7,8) ont été respectés.

La proportion de SVF a été augmentée à 300 ml pour 1000 ml de milieu.

Les milieux ont été rendus sélectifs par des inhibiteurs : la pénicilline G à 1000000 UI /l, la colistine à 500000 UI/l pour les bouillons et le milieu gélosé et l'amphotéricine B à 100 mg/l pour le milieu gélosé.

- **Bouillon glucosé (BG)**

| | |
|--|---------|
| BCC (Oxoid) | 42 g |
| Peptone papainique de soja (Diagnostics Pasteur) | 10 g |
| NaCl | 3 g |
| Glucose anhydre | 10 g |
| Rouge de phénol 1% | 2 ml |
| Eau distillée QSP | 1000 ml |

Les différents constituants ont été mélangés et dissous à la chaleur puis le pH ajusté à 7,8 par NaOH 1N.

Après autoclavage pendant 15 mn à 121°C, le milieu a été laissé à refroidir jusqu'à 50°C puis, à 600 ml de cette solution, ont été ajoutés stérilement sous la hotte, le supplément suivant constitué par :

- | | |
|--|--------|
| - SVF stérile | 300 ml |
| - Extrait de levures, solution à 25% fraîchement préparée et stérilisée par filtration | 100 ml |
| - Pénicilline G 1000000 UI/4 ml | 4 ml |
| - Colistine 1000000 UI/4 ml | 2 ml |

Le pH a été vérifié et ajusté à 7,8 par NaOH 1N stérile puis le milieu a été réparti en aliquots de 50 ml et conservé à -20°C.

• **Bouillon à l'arginine (BA)**

- | | |
|--|---------|
| - BCC (Oxoïd) | 42 g |
| - Peptone papainique de soja (Diagnostics Pasteur) | 10 g |
| - NaCl | 3 g |
| - Arginine chlorhydrate | 10 g |
| - Rouge de phénol 1% | 2 ml |
| - Eau distillée QSP | 1000 ml |

Les constituants ont été dissous à feu doux comme pour le BG ; ici le pH a été ajusté à 7,3 par NaOH 1N.

Après autoclavage à +121°C pendant 15 mn, le milieu a été refroidi jusqu'à 50°C puis à 600 ml de cette solution a été incorporé, sous la hotte, le même supplément que pour le BG :

- | | |
|--|--------|
| - SVF stérile | 300 ml |
| - Extrait de levures, solution à 25% fraîchement préparée et stérilisée par filtration | 100 ml |
| - Pénicilline 1000000 UI/4 ml | 4 ml |
| - Colistine 1000000 UI/4 ml | 2 ml |

Le pH a été vérifié et réajusté à 7,3 par NaOH 1N stérile avant la répartition en tubes stériles de 50 ml puis les milieux ont été conservés à -20°C.

- **Milieu diphasique**

- Phase solide

| | |
|--|--------|
| - BCC (Oxoïd) | 42g |
| - Peptone papainique de soja (Diagnostics Pasteur) | 10g |
| - NaCl | 3g |
| - Glucose anhydre | 10g |
| - Rouge de phénol 1% | 2 ml |
| - Eau distillée QSP | 580 ml |

Après dissolution des différents constituants, le pH a été ajusté à 7,5 par NaOH 1N puis 10g d'agar ont été incorporés au milieu qui a été porté à ébullition pendant 1 mn pour dissoudre l'agar.

Ensuite, le supplément suivant a été ajouté stérilement sous la hotte au milieu préalablement autoclavé à 121°C pendant 15 mn et refroidi jusqu'à 50°C :

| | |
|--|--------|
| - SVF stérile | 300 ml |
| - Extrait de levures, solution à 25% fraîchement préparé et stérilisé par filtration | 100 ml |
| - Pénicilline 1000000 UI/4 ml | 4 ml |
| - Colistine 1000000 UI/4 ml | 2 ml |
| - Amphotéricine B 50 mg/10ml | 20 ml |

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 de 50 ml à raison de 8 ml par flacon.

Les milieux ont été laissés à solidifier puis la stérilité a été testée en incubation à l'étuve à +37°C pendant 24 h avant la conservation au réfrigérateur à +4°C.

- Phase liquide

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

II.2 – SELECTION DES MALADES

II.2.1 – Critères d'inclusion

Les malades ont été sélectionnés sous couvert d'un examen clinique ayant révélé un ou plusieurs des signes suivants :

- Signes fonctionnels :
 - Toux
 - Expectorations
 - Douleurs thoraciques
 - Dyspnée
- Signes généraux d'une infection ou d'affection respiratoire possible
 - Fièvre
 - Amaigrissement
- Signes physiques :
 - Condensation pulmonaire
 - Epanchement pleural

II.2.2 – Critères d'exclusion

- Tuberculose pulmonaire confirmée
- Pathologies pulmonaires chroniques (DDB, BPCO, Asthme, Mucoviscidose) et immunodépression quel que soit le type
- Antibiothérapie dans les 72 h ayant précédé l'examen clinique.

II.3 – RECUEIL ET TRANSPORT DES PRELEVEMENTS

Après un rinçage de la cavité buccale et de la gorge par une solution stérile d'eau physiologique, les expectorations ont été recueillies après un effort de toux dans un pot stérile.

Le prélèvement ainsi réalisé a été directement acheminé au laboratoire +4°C où l'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) a été rapidement mis en route.

II.4 – TRAITEMENT AU LABORATOIRE DES PRELEVEMENTS

II.4.1 – Critères d'acceptabilité des prélèvements

La qualité des expectorations a été jugée sur la base de critères cytologiques en coloration au bleu de méthylène d'un étalement mince sur lame des parties purulentes.

Un prélèvement a été jugé de qualité, en vue de la poursuite de l'analyse, au regard des critères suivants :

- Polynucléaires (PN) > 25 / champ
- Cellules épithéliales (CE) <10 / champ
- Pour les prélèvements pauci-cellulaires, PN/CE > 2.

La présence de cellules mononucléées a constitué un critère en faveur d'une infection probable à germes intracellulaires (*Legionella*, *Chlamydia*) ; cependant les étiologies virale et parasitaire ne sont pas à écarter mais encore et toujours une tuberculose pulmonaire a été discriminée par la recherche de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) en coloration de Ziehl.

Nous nous sommes également assuré que le prélèvement soit riche en cellules de façon à augmenter les chances de détection des germes intracellulaires (*Legionella*, *Chlamydia*) ou adhérant aux cellules (*Mycoplasma*).

II.4.2 – Recherche directe de *Chlamydia pneumoniae*

L'examen direct en coloration de Gram n'a pas été utile.

La recherche a été effectuée par la détection d'antigènes de *Chlamydiae* par le test CHLAMYVIT®.

II.4.2.1 – Principe du CHLAMYVIT®

C'est un test d'immunochromatographie utilisant une combinaison d'anticorps (Ac) monoclonaux couplés à des particules colorées et des anticorps polyclonaux fixés sur un support solide pour la détection du lipopolysaccharide (LPS) des *Chlamydiae*.

II.4.2.2 – Description du test

Chaque test est constitué d'un support comportant trois fenêtres :

- Une fenêtre de dépôt A,
- Une fenêtre intermédiaire B où sont fixés les anticorps polyclonaux et où l'apparition d'une bande colorée indique la présence de *Chlamydiae*,
- Une fenêtre C de contrôle où l'apparition obligatoire d'une bande colorée valide la migration.

Chaque test est accompagné d'un écouvillon stérile et d'une solution d'extraction d'azide de sodium en flacon compte-goutte.

II.4.2.3 – Mode opératoire

- Sortir le test de son emballage individuel
- Prendre les parties purulentes des expectorations avec l'écouvillon
- Décharger énergiquement l'écouvillon dans la solution d'extraction
- Laisser en contact 15 mn
- Déposer sept gouttes de l'extrait au niveau de la fenêtre A
- Laisser migrer
- Puis lire l'apparition ou non d'une bande colorée au niveau de la fenêtre B
- Vérifier l'apparition de la bande de contrôle au niveau de la fenêtre C

La réaction positive est stable pendant 30 min.

II.4.3 – Culture de *Mycoplasma pneumoniae*

L'examen direct en coloration de Gram là encore n'a pas été utile.

II.4.3.1 – Matériels

- Hotte à flux laminaire
- Etuve à CO₂ à 37°C
- Embouts stériles pour micropipettes
- Micropipettes
- Plaques de microtitration lavées sellées sous emballage individuel et stérilisées sous UV pendant 30 min.
- Bouillon glucosé et bouillon à l'arginine décongelés et préincubés à +37°C
- Milieu gélosé préincubé à +37°C
- Vortex

II.4.3.2 – Principe de la culture

M. pneumoniae cultive sur milieu acellulaire contenant des stérols et des extraits de levures.

- En bouillon on étudie le métabolisme vis-à-vis de substrats tels que le glucose et l'arginine. Ces bouillons contiennent un indicateur de pH, le rouge de phénol qui est responsable du virage du milieu du rouge-orangé au jaune lors d'une acidification et du rouge-orangé au rouge s'il y a alcalinisation.

M. pneumoniae fermente le glucose et acidifie le BG. Il n'hydrolyse pas l'arginine, le BA reste rouge-orangé.

- Sur milieu solide, *M. pneumoniae* donne des colonies "œuf sur le plat" qui ont la propriété d'agglutiner des cellules.

II.4.3.3 – Titrage en série

Des dilutions en série de raison $\frac{1}{2}$ ont été réalisées en bouillon glucosé (BG) et bouillon à l'arginine (BA) afin d'étudier le métabolisme de *M. pneumoniae* vis-à-vis du glucose et de l'arginine.

- 100 μ l de bouillon ont été distribués à la micropipette dans chaque cupule.
- Dans la première cupule, ont été incorporés et mélangés, 100 μ l de prélèvement
- Puis 100 μ l de la première dilution ont été mélangés au bouillon dans la deuxième cupule, ainsi de suite jusqu'à la 30^{ème} dilution.

- Les cupules ont ensuite été recouvertes de para film et incubées dans l'étuve à CO₂ à +37°C
- Les cultures ont été régulièrement observées tous les quatre jours à partir du quatrième jour.

II.4.3.4 – Culture sur milieu diphasique

- Le milieu diphasique a été reconstitué en ajoutant 3 ml de BG décongelé et préincubé à +37°C au milieu gélosé également préincubé à l'étuve à +37°C
- L'inoculum a été préparé comme suit :
 - dans un tube à hémolyse, une dilution au 1/10^e en eau distillée stérile de l'expectoration a été réalisée
 - Le mélange a été homogénéisé au Vortex 2 à 4 mn
- A la micropipette, le milieu diphasique a étéensemencé avec 100 µl de l'inoculum
- L'incubation a été faite à 37°C dans l'étuve à CO₂, le flacon en position horizontale de sorte que le bouillon recouvre la gélose
- Les cultures ont été observées tous les 5 jours pendant 3 semaines.

II.4.3.5 – Lecture des cultures

- Repiquage des bouillons

L'absence de souillures bactériennes dans le bouillon glucosé (+) par un examen direct à l'état frais entre lame et lamelles a été effectué.

Une subculture sur milieu diphasique des dilutions BG (+) et BA (-) a été réalisée

- Lecture du milieu diphasique

A partir des cultures de 21 jours ainsi que celles de moins de 21 jours dont la phase liquide a viré, la quantité de bouillon a été diminuée jusqu'à environ

200 µl sur la gélose puis les colonies caractéristiques de *M. pneumoniae* ont été recherchées au microscope à contraste de phase.

Les critères suivants ont été retenus en faveur d'une culture positive de *M. pneumoniae* : virage du sans trouble BG en un délai relativement long (plus de 8 jours), non virage du BA (BA (-)), colonies "œuf sur la plat" sur milieu solide.

- Confirmation des colonies

Nous avons utilisé les propriétés d'adsorption vis-à-vis des cellules HEP-2

pour confirmer les colonies de *M. pneumoniae* ; nous avons procédé comme suit :

200 µl du milieu DMEM contenant les cellules HEP-2 ont été ajoutés au milieu diphasique. Après incubation à +37°C sous CO₂ pendant 24 h, les amas de cellules sur la gélose ou dans le bouillon ont été recherchés

II.4.4 – Recherche de *L. pneumophila*

II.4.4.1 – Examen des prélèvements en coloration de Gram

Il a permis de rechercher des bacilles et coccobacilles faiblement Gram négatif le plus souvent intracellulaires, parfois extracellulaires cependant cet examen direct s'est révélé décevant.

II.4.4.2 – Immunofluorescence directe (IFD)

Elle a été réalisée selon le protocole du CDC (29) qui est le suivant :

- Etaler les parties purulentes des expectorations sur les lames préalablement rincées à l'alcool éthylique à 95° et séchées.
- Sécher à l'air
- Fixer à la flamme
- Recouvrir de formol neutre à 10%, incuber 10 mn en atmosphère humide constituée par une boîte de Pétri contenant de l'eau dans laquelle on dépose deux baguettes sur lesquelles repose la lame.
- Rincer à l'eau distillée stérile puis sécher à l'air
- Ajouter 50 µl de conjugué.
- Incuber 20 mn à la température ambiante en atmosphère humide
- Laver deux fois 5 mn avec du tampon phosphate pH 7,6 stérile
- Immerger dans du tampon phosphate pH 7,6
- Laver à l'eau distillée stérile, sécher à l'air
- Mettre une goutte de tampon carbonate glycérol à pH 9
- Recouvrir d'une lamelle, ajouter à nouveau une goutte de tampon carbonate glycérol
- Lire au microscope équipé d'un filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine, la présence de spots vert-fluorescents intra ou extracellulaires.

L'IFD positive a permis une orientation en vue de la culture sur milieux BCYE α spécifiques pour *Legionella*.

Nous avons également réalisé quatre lames-témoins avec les souches de référence du CDC que nous avons régénérées à l'eau distillée stérile, toujours suivant le même procédé.

II.4.4.3 – Culture

- Principe de la culture

L. pneumophila a des exigences nutritionnelles en fer et en L-cystéine, son pH optimum de croissance est de $6,9 \pm 0,05$, conditions réalisées dans le milieu BCYE α .

- La culture proprement dite :
 - Dans un tube à hémolyse une dilution au 1/10^e en eau distillée stérile des parties purulentes des expectorations IFD (+) a été réalisée et homogénéisée au Vortex pendant 4mn, les milieux sélectifs et non sélectifs étant préincubés à l'étuve à +37°C pendant 30 mn.
 - Pour chaque prélèvement, l'inoculum précédemment préparé a étéensemencé en stries sur 1 BCYE α et 1 BCYE α / VC à l'anse de platine.
 - L'incubation a été faite à l'étuve à +37°C en jarre sous 5% CO₂.
 - L'examen des cultures a été faite à partir du 3^e jour puis quotidiennement jusqu'au 10^e jour.

RESULTATS

De Septembre 1999 à Mars 2000, 76 patients adultes dont 40 hommes ont été recrutés. Leurs âge variaient de 16 et 90 ans avec un âge moyen de 37ans \pm 2 et un sex-ratio de 1,1.

Un malade présentant une mucoviscidose a été finalement exclus de l'étude.

La gestion des données a été effectuée grâce au logiciel Filemaker Pro[®] version 3.0.

- Résultats globaux des isolements

Dans notre série de 76 patients adultes, nous avons obtenu au total 91 souches bactériennes dont : 6 *Legionella pneumophila* ; 9 *Mycoplasma pneumoniae* et 5 *Chlamydia pneumoniae* ; soit respectivement : 6,59% ; 9,89% et 5,49%.

Tableau VIII : Répartition des bactéries atypiques

| | Nombre | % |
|-----------------------|--------|------|
| <i>L. pneumophila</i> | 6 | 6,59 |
| <i>M. pneumoniae</i> | 9 | 9,89 |
| <i>C. pneumoniae</i> | 5 | 5,49 |

Tableau IX : Résultats des investigations bactériologiques

| | IFD | Chlamyvit® <i>C. pneumoniae</i> recherche | culture | Présomption à l'examen direct |
|-----------------------|-----|---|----------|----------------------------------|
| <i>L. pneumophila</i> | 6 | - | Négative | 4 |
| <i>C. pneumoniae</i> | - | 5 | - | 4 |
| <i>M. pneumoniae</i> | - | - | 9 | 4 |

Ces bactéries atypiques : *L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* ont été retrouvées chez 17 patients parmi lesquels 13 (76,4%), présentait une co-infection avec un autre agent microbien qui a été objectivée par une culture quantitativement significative sur milieu approprié. Ainsi :

Pour *M. pneumoniae*, une co-infection a été relevée dans 6 cas dont 4 étaient liés à un streptocoque non groupable.

Un autre germe (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, bacille à Gram négatif) a toujours été isolé avec *C. pneumoniae* et *L. pneumophila* n'a été retrouvé seul que dans un cas.

M. pneumoniae et *L. pneumophila* ont été retrouvés ensemble dans 1 cas ; *C. pneumoniae* et *L. pneumophila* ont été retrouvés ensemble dans 2 cas.

Nous avons parfois noté des associations de trois germes : *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* et *Streptococcus pneumoniae* dans un cas ; *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* dans un cas également.

Tableau X : Répartition en fonction des associations de germes

| | <i>Legionella pneumophila</i> | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
|---------------------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Streptocoque non groupable | - | - | 4 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2 | - | - |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 2* | 1+1* | 1* |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | - | 1 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | - | - |
| Bactérie atypique | 3 (2 <i>Mycoplasma</i> , 1 <i>Chlamydia</i>) | 2 (<i>Legionella pneumophila</i>) | 1* (<i>Legionella pneumophila</i>) |

*association de 3 germes

Tableau XI : Répartition en fonction du sexe

| | hommes | femmes |
|-----------------------|--------|--------|
| <i>L. pneumophila</i> | 5 | 1 |
| <i>M. pneumoniae</i> | 5 | 4 |
| <i>C. pneumoniae</i> | 5 | 0 |

L'interprétation judicieuse en fonction de l'âge n'a pas été possible car les écarts d'âge relevés ont été trop importants parmi les patients chez lesquels ont été retrouvés les bactéries atypiques.

DISCUSSION

Cette étude prospective avait pour but de déterminer l'écologie bactérienne dans les IRB aiguës communautaires de l'adulte à Dakar, où il fallait prouver la place des bactéries atypiques : *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*.

Les critères de sélection des malades ont d'emblée écarté tous les sujets à risque si l'on sait qu'en Afrique, les conditions socio-économiques précaires pourraient constituer des facteurs de susceptibilité aux infections.

L'approche microbiologique :

- De façon consensuelle nous avons travaillé sur les expectorations bien qu'elles soient polymicrobiennes ; mais elles ont l'avantage d'être faciles à recueillir et la méthode de prélèvement n'est pas contraignante pour le malade. En outre l'examen cyto-bactériologique des crachats (ECBC) a l'avantage d'être peu onéreux par rapport à d'autres méthodes : LBA, aspirations, brossages protégés distaux qui réduisent certes les risques de contamination et offrent une meilleure garantie dans la recherche des agents mais sont invasives. Le respect des normes d'acceptabilité édictés par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (70, 72) a permis de recueillir des prélèvements de qualité. L'examen direct des expectorations après coloration au bleu de méthylène, a été beaucoup plus performant que l'examen direct au Gram dans la recherche des agents atypiques. En effet, la réaction inflammatoire mononucléée (lymphocytes, macrophages) a été un bon élément d'orientation dans la recherche desdits agents, l'examen en coloration de Gram n'ayant révélé qu'une flore bactérienne banale.

- Les investigations bactériologiques

- L'utilisation du test rapide a été optimisée et validée pour la recherche de *C. pneumoniae* :

Ce test a l'avantage d'être plus rapide que la culture. Même si le diagnostic d'espèce n'est pas fait, il discrimine *C. psittaci* du fait des circonstances épidémiologiques particulières de promiscuité avec les oiseaux (23) en rapport avec l'infection qu'il engendre et a valeur diagnostique en faveur de *C. pneumoniae*, récemment individualisé comme pathogène (46) et dont l'implication dans les atteintes respiratoires va en croissant (28, 45, 87).

- La recherche de *L. pneumophila*.

L'immunofluorescence directe a nécessité un lourd investissement technique ; tous les réactifs ont été préparés au laboratoire. Cependant, sa spécificité est bonne (99,9%) (29) et le contrôle de qualité a été fait avec les souches de référence du CDC en attendant la confirmation par un contrôle externe. Quoique peu sensible et ayant une valeur présomptive diagnostique (81), elle est toujours préférable à une méthode sérologique qui reste rétrospective ; mais ses résultats pourraient être confirmés par d'autres techniques plus sensibles et plus rapides de détection : la PCR et la recherche de l'antigénurie (34, 37, 57). La culture quand à elle, seule méthode de certitude, se révèle parfois décevante (7, 12).

- La recherche de *M. pneumoniae*

Elle a été longue et fastidieuse ; cependant, la certitude diagnostique est garantie par : les exigences nutritionnelles particulières des mycoplasmes qui ont été prises en compte par l'amélioration apportée aux milieux standards disponibles (4) et la particularité d'adhésion de *M. pneumoniae* vis-à-vis de différents supports qui a permis la confirmation des colonies par cyto-adhérence (2, 3, 52).

- **L'approche épidémiologique**

Les co-infections quasi-constantes observées ont été relevées dans la littérature. Pour *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*, elles sont facilement explicables par leur effet délétère sur la dynamique mucociliaire, ce qui favorise une colonisation ou une surinfection bactérienne (62, 64, 69). Il n'existe pas de porteurs sains de *L. pneumophila* et des associations en particulier avec *Streptococcus pneumoniae* ont été rapportées (13).

Dans notre série de 76 patients adultes, nous avons eu au total 91 souches bactériennes. Les proportions relatives des bactéries atypiques ont été : *L. pneumophila* : 6,59% ; *C. pneumoniae* : 5,49% et *M. pneumoniae* : 9,89% par rapport aux données ci-après relevées dans la littérature :

- lors d'une étude italienne incluant 228 patients, ont été retrouvés : *L. pneumophila* : 8,3% ; *C. pneumoniae* : 10,5% et *M. pneumoniae* : 12,3% (83)

-
- une espagnole de 392 patients a retrouvé *L. pneumophila* : 12,5% ; *C. pneumoniae* : 13,5% ; *M. pneumoniae* : 1,3% (87)
 - et une série américaine de 359 malades *L. pneumophila* : 6,7% ; *C. pneumoniae* : 6,1% ; *M. pneumoniae* : <1% (33).

Se référant à ces études réalisées dans les pays du nord où ni les conditions climatiques, ni les conditions socio-économiques, ni même l'approche diagnostique où l'échantillonnage est en général plus important, les critères incluant les pathologies pulmonaires chroniques et la méthode sérologique ne sont les mêmes que dans notre série, l'implication des bactéries atypiques dans les pneumopathies communautaires ne fait aucun doute à Dakar. Cependant l'absence de données dans la littérature en Afrique nous prive d'un précieux élément de comparaison car il semblerait que cette étude soit la première du genre Afrique noire.

CONCLUSION

Dans les infections respiratoires basses, l'approche thérapeutique probabiliste vise essentiellement le pneumocoque en l'absence d'investigations microbiologiques.

Les seuls arguments, s'ils ne sont pas sérologiques dont dispose le clinicien concernant les bactéries atypiques : *Legionella pneumophila* ; *Chlamydia pneumoniae* ; *Mycoplasma pneumoniae* également reconnus comme causes non négligeables des pneumopathies communautaires de l'adulte sont les échecs au traitement initial par une bêtalactamine.

La recherche de ces agents au cours d'IRB est donc d'intérêt en l'absence de données épidémiologiques disponibles en Afrique.

C'est dans ce cadre qu'a été initié le groupe OBSAIRV (Observatoire Sénégalais en Antibiothérapie au cours des infections respiratoires de ville). Ainsi, de Septembre 1999 à Mars 2000, une étude multicentrique dans les services du CHU de Dakar et dans les cabinets médicaux privés, a permis de recruter 76 cas d'IRB communautaires chez des patients adultes dont l'âge moyen était de 37 ans \pm 2 et le sex-ratio de 1,1.

Les investigations bactériologiques ont permis de retrouver sur l'ensemble des souches isolées, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* dans respectivement 6,59% ; 5,49% et 9,89% des cas. Ces germes atypiques ont été chez 17 malades dont une forte proportion (76,4%) présentaient une co-infection bactérienne prouvée.

L'approche microbiologique a été lourde ; le délai de culture de *Mycoplasma pneumoniae* en particulier est trop long à établir pour permettre la prise en charge rapide de l'infection.

C'est pourquoi, la culture à partir de prélèvements pauci-microbiens, prélevés sous fibroscopie qui seront davantage privilégiés dans les pneumopathies nosocomiales ; la détection de ces agents dans les divers prélèvements par des techniques de biologie moléculaire notamment la PCR qui ne sont hélas pas à la portée de nos populations ; mais surtout d'autres alternatives plus simples, pourraient permettre la prise en charge rapide des IRB :

- la détection d'IgA sécrétoires anti-*M. pneumoniae* dans les expectorations ou la détection d'antigènes spécifiques de *M. pneumoniae* dans les expectorations par des techniques immuno-enzymatiques
- la recherche d'antigènes solubles de *L. pneumophila* dans les urines
- l'utilisation en routine du test rapide CHLAMYVIT® qui a fait ses preuves pour la recherche de *C. pneumoniae* dans les expectorations.

Enfin , un algorithme diagnostique et thérapeutique de prise en charge, tenant compte de l'écologie microbienne et du suivi clinico-biologique des patients, inciterait à proposer l'association d'une bêtalactamine et d'un macrolide en traitement antibiotique de première intention de ces pneumopathies communautaires en attendant d'autres études qui permettraient l'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes aux antibactériens.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARILE M.F., BOVE J.M., BRADBURY J.M. et al.

Current status of control of mycoplasmal diseases of man, animals, plants and insects.
Bull. Inst. Pasteur, 1985 ; 83 : 339 - 73.

2. BASEMAN J.B.

The cytoadhesins of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.
In : ROTTEM S., KAHANE I., eds. *Subcellular biochemistry*. New York. Plenum Press, 1993 ; 243 - 59.

3. BASEMAN J.B., TULLY G.J.

Mycoplasma, sophisticated reemerging and burdened by their notoreity.
Emerging infectious diseases, 1997 ; 3 (1) : 21 - 32.

4. BEBEAR C., DE BARBEYRAC B.

Les Mycoplasmes.
In : FRENEY J. eds. *Manuel de Bactériologie Clinique*. Elsevier, Amsterdam, 1994 ; 1443 - 63.

5. BEBEAR C., LATRILLE J.

Mycoplasmes.
In : Le MINOR L., VERON M. eds. *Bactériologie Médicale*. Flammarion, Paris, 1989 ; 1088 - 93.

6. BEN AISSA-FENNIRA F., BOUGUERRA A., HAFSIA R. et al.

Analyse immunochimique d'une IgM monoclonale humaine à activité anticorps agglutinine froide au cours d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.
Archs. Inst. Pasteur Tunis, 1996 ; 76 (1/2) : 3 - 8.

7. BERCHE P.

Legionella.

In : BERCHE P., GAILLARD J. L. eds. *Bactériologie : les bactéries des infections humaines*. Flammarion Médecine-Science, France, 1988 ; 244 - 50.

8. BIBERFELD G.

Infection sequalee autoimmune reaction in *Mycoplasma pneumoniae* infection.

In : RAZIN S. eds. *The Mycoplasma*. Vol. IV. *Mycoplasma pathogenicity*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla., 1985 ; 293 - 311.

9. Mme BONISSOL

Schéma d'isolement des souches de mycoplasmes humains.

In : MARCHAL N., BOURDON J.L. eds. *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Doin éditeurs- Paris , 1987 ; 428.

10.BORNSTEIN N., FLEURETTE J.

Legionella.

In : FRENEY J., RENAUD F. eds. *Manuel de bactériologie clinique*. Elsevier, Amsterdam, 1994 ; 1327-54.

11.BORNSTEIN N., FLEURETTE J., BOSSHARD S. et al.

Evaluation de la fréquence des réactions sérologiques croisées entre *Legionella* et *Mycoplasma* ou *Chlamydia*.

Path. Biol.,1984 ; 32 (3) : 165-8.

12.BORNSTEIN N., MARMET D., FLEURETTE J.

Isolement et caractérisation des trois premières souches de *Legionella pneumophila* isolées en France.

Ann. Microbiol., 1981 ; 132 B : 407 - 17.

13. BROWN R. B., SAND M., RYCZA K.M.

Community-acquired pneumonia caused by mixed aerobic bacteria.

Chest, 1986 ; 90 : 810 - 814.

14. CAMPBELL L.A., KUO C-C., GRAYSTON J.T.

Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*.

Infect. Imm., 1990 ; 58 (1) : 93 - 7.

15. CAMPBELL L. A., KUO C-C., GRAYSTON J.T.

Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease.

Emerging infectious diseases, Janv.- Mars 1998 ; 4 (4), document internet

URL : http://www.cdc.gov/ncidod/_vti_bin/shtml.dll/EID/vol4no4/campbell.htm/ma

16. CANTON P., CLOZEL M., NEIMAN M. et al.

Erythème polymorphe .Isolement de *Mycoplasma pneumoniae* dans les lésions cutanées.

Nouv. Presse Med., 1980 ; 9 : 1516 - 18.

17. CARRATALA J., GUDIOL F., PALLARES R. et al.

Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia.

Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1994 ; 149 : 625 - 29.

18. CASSEL G.H.

Infections causes of chronic inflammatory diseases and cancer.

Emerging infectious diseases Oct.-Déc 1998 ; 4 (1) document internet

URL : <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/cassel.htm>.

National center for infectious diseases. Center for Diseases Control and Prevention, Atlanta G.A.

19.CAZENNAVE-ROBLOT F., UNDERNER M., ROBLOT P. et al.

Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des pneumopathies dites atypiques. A propos de 41 observations bactériologiquement prouvées.

Med. Mal. Infect., 1987 ; 12 : 695 - 700.

20.CHANOCK R.M., HAYFLICK L., BARILE M.F.

Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identifications as a PPLO.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962 ; 48 : 41 - 9.

21.DALLO S.F., TULLY J.G., ROSE D.L.

Isolation and characterisation of *Mycoplasma genitalium* strain from human respiratory tract.

J. Clin. Microbiol., 1998 ; 26 : 2266 - 9.

22.DAVIDSON M., KUO C-C., MIDDAUGH J.P., CAMPBELL L.A. et al.

Confirmed previous infection with *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis.

Circulation, 1998 ; 98 (7) : 628 - 33.

23.DE BARBEYRAC B., DUPON M., BEBEAR C.

Infection à *Chlamydia*.

Encycl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), maladies infectieuses, 8-037-A-10, Dermatologie, 12-670-B-20, 1997, 15p.

24.DEVOUASSOUX G., HEYRAUD J.D., GONTIER G.

Infections respiratoires à *Mycoplasma pneumoniae* hospitalisées.

Rev. Mal. Resp., 1994 ; 11 (5) : 473 - 7.

25.DIEU-OSIKA S., BELASCO C.

Infections à *Mycoplasma pneumoniae*.

Médecine et enfance, 1997 ; 17 (1) : 47 - 50.

26.DOWLING J.N., SAHA A.K., GLEW R.H.

Virulence factor of the family Legionellaceae.

Microbiol. Rev., 1992 ; 56 : 32 - 60.

27.EB F., ORFILA J.

Structure antigénique des *Chlamydiae* : aspects fondamentaux, applications pratiques

Bull. Inst. Pasteur, 1986 ; 84 : 149 - 176.

28.EB F., ORFILA J., CORBEL C.

Diagnostic des infections respiratoires dues aux souches TWAR (*Chlamydia pneumoniae*) et prévalence des anticorps anti- TWAR. Etude de 210 sérums.

Med. Mal. Infect., 1989 ; 19 (10) : 430 - 4.

29.EDELSTEIN P.H.

Legionella.

In : LENNETTE E.H., BALOWS A. eds. *Manual of Clinical Microbiology* 4th edition
Washington, D.C., 1985 ; 373 - 9.

30.EHRET W., RUCKDESCHEL G.

Membrane protein of Legionellaceae. Membrane protein of different strains and serogroups of *Legionella pneumophila*.

Zentrabl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg., 1985 ; 259 : 433 - 45.

31.EKMAN M.-R., GRAYSTON J.T., VISAKORPI R. et al.

An epidemic of infections due to *Chlamydia pneumoniae* in military conscripts.

Clin. Infect. Dis., 1993 ; 17 : 420 -5.

32.EMRE U., SOKOLOVSKAYA N., ROBLIN P.M. et al.

Detection of anti-*Chlamydia pneumoniae* IgE in children with reactive airway disease.
J. Infect. Dis., 1995 ; 148 : 727 - 32.

33.FANG G.D., FINE M., ORLOFF J. et al.

New and emerging etiology for community-acquired pneumonia with implication for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases.
Medicine (Baltimore), 1990 ; 65 (5) : 307 - 16.

34.FLEURETTE J., BORNSTEIN N.

Légionelloses.

Encycl. Med. Chir., (Paris- France), maladies infectieuses, 8021-A-10, 1995, 10 p.

35.FLEURETTE J., DEVEZE L.

Les *Legionella*.

Le Pharmacien Biologiste, 1983 ; tome XVII : n°145, 199/45 - 205/51.

36.FOY H.M., KENNY G.E., COONEY M.K. et al.

Naturally acquired immunity to pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*.
J. Infect. Disease, 1983 ; 147 : 967 - 73.

37.FUJII T., OHTA M., KONO M. et al.

Rapid detection of the gene of *Legionella pneumophila* using the fluorescence polarisation with the asymmetric PCR.

Nucleic Acids Symp Ser., 1999 ; 42 : 59 - 60.

38.GAILLARD J.L.

Les *Chlamydia*.

In : BERCHE P. eds. *Bactériologie : les bactéries des infections humaines*.

Médecine-Sciences Flammarion, 1988 ; 494 - 504.

39.GAMBERT C., WERNER E., De KERNET M. et al.

Pneumopathies à *Mycoplasma pneumoniae* chez l'enfant, étude clinique, biologiques et radiologique.

Pédiatrie, 1993 ; 48 (3) : 241 -7.

40.GAO L.Y., HARB O.S., KWAIK A.Y.

Utilisation of similar mechanism by *Legionella pneumophila* to parasite two evolutionnarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa.

Infect. Imm., 1997 ; 65 (11) : 4738 - 46.

41.GASPER T.M., FARNDOM P.A., DAVIES R.

Trombocytopenia associated with legionnaires' disease.

Br. Med. J., 1978 ; 280 : 1611

42.GAUDELUS J., DIEU-OSIKA S., BELASCO C., CAMARD O.

L'enfant et *Mycoplasma pneumoniae*.

La semaine des hôpitaux de Paris, 1998 ; 74 (13 - 14) : 669 - 76.

43.GAUDIN O.G.

Infections humaines à mycoplasmes.

Encycl. Med. Chir.(Paris-France), maladies infectieuses, 8039V¹⁰, 9-1989, 6 p.

44.GRATTARD F., BOURLET T., GALAMBRUN C. et al.

Intérêt de l'amplification génique par PCR pour le diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae* chez l'enfant.

Pathologie et Biologie (Paris), 1998 ;46 (6) : 464 - 9.

45.GRAYSTON J.T.

Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR.

Clin. Infect. Dis.,1992 ; 15 : 757 - 63.

46. GRAYSTON J.T., KUO C.-C., COULSON A.S. et al.

Chlamydia pneumoniae sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR.

Int. J. Syst. Bacteriol., 1989 ; 39 : 88 - 90.

47. GRIMONT P.A.D., BERCOVIER H.

Aspects cliniques, épidémiologiques et bactériologiques des légionelloses.

Bull. Inst. Pasteur, 1980 ; 78 : 267 - 99.

48. GRIMONT P.A.D., GRIMONT F., DESPLACES N., TCHEN P.

DNA probe specific for *Legionella pneumophila*.

J. Clin. Microbiol., 1985 ; 21 : 431 - 7.

49. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose. Circulaire

DGS n°97/311.

Bull. Epidemiol. Hebdo. 20-22/97.

50. GUILLEVIN L., LEVY Y., AMARENCO P. et al.

Pneumonie et septicémie à *Legionella pneumophila*. Complication mortelle d'une leucémie à tricholeucocytes évoluant de puis 27 ans.

Presse Med., 1984 ; 13 : 1098.

51. HAMMERSCHLAG M. R., CHIRGWIN K., ROBLIN P.M. et al.

Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness.

Clin. Infect. Dis., 1992 ; 14 : 178 -82.

52. HU P.C., COLE R.M., HUANG Y.H. et al.

Mycoplasma pneumoniae infection : role of a surface protein in the attachment organelle.

Science, 1982 ; 216 : 313.

53.HU P.C, HUANG C.H., COLLIER A.M., CLYDE W.A. Jr.

Demonstration of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein in human sera and respiratory secretions.

Infect. Imm., 1983 ; 41 : 437 - 9.

54.HUANG Y.S., BARILE M.F.

A *Mycoplasma genitalium* protein resembling the *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein.

Infect. Imm., 1987 ; 55 : 1126 - 31.

55.HUCHON G., WOODHEAD M., GIALDRONI-GRASS G. et al.

Guidelines for management of adult community acquired lower respiratory tract infections.

Eur. Respir. J., 1998 ; 11 : 986 - 91.

56.INIGUEZ J.L.

Pneumopathies à *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* chez l'enfant.

Archives de pédiatrie. 1998 ; 5 (sup 1).

57.JONAS D., ROSENBAUM A. et al.

Enzyme-linked immuno assay for detection of PCR-amplified DNA of Legionellae. in bronchoalveolar fluid.

J. Clin.Microbiol., 1995 ; 33 (5) : 1247 - 52.

58.JONES J.L., HEBERT G.A.

Legionnaires, the diseases, the bacterium and methodology. US Department of Heath education and welfare, CDC, Atlanta 1979.

59.KENNY G.E.

Mycoplasma.

In : LENNETTE E.H., BALOWS A. eds. *Manual of Clinical Microbiology*
4th edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985 ; 478 - 82.

60.KOS MI , HSIEH V., GUYOT J.P.

Surdité bilatérale après otite bilatérale à *Mycoplasma pneumoniae*.

Médecine et Hygiène, 1999 ; 57 (2273) : 1970 - 73.

61.KOSSEIAN-BAL I., BOCQUET H., BENETON N.

Syndrome d'hypersensibilité au cours d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

Annales de Dermatologie et Vénérologie, 1998 ; 125 (5) : 328 -30.

62.KUO C.-C., JACKSON L.A., CAMPBELL L.A., GRAYSTON J.T.

Chlamydia pneumoniae (TWAR).

Clin. Microbiol. Rev., 1995 ; 8 (4) : 451 - 61.

63.LEOPHONTE P.

Place actuelle des *Legionella* dans l'épidémiologie des pneumonies communautaires.

Med. Mal. Infect., 1993 ; 23 : 641 - 42.

64.LESOBRE V., AZARAIN R. et al.

Pneumopathies   *Mycoplasma pneumoniae* : 10 observations.

La Presse Médicale. 1999 ; 28 (2) : 59 - 66.

65.LINNANM KI E., LEINONEN M. et al.

Chlamydia pneumoniae specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease.

Circulation. 1993 ; 87 : 1130 - 34.

66.McDADE J.E., SHEPHARD C.C., FRASER D.W. et al.

Laboratory investigation team Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease.

N. Engl.J. Med., 1977 ; 297 : 1197-1203.

67.MARRIE T.J., HARCZY M., MANN O.E.

Culture- negative endocarditis probably due to *Chlamydia pneumoniae*

J.Infect.Dis.,1990 ; 161 : 127 - 29.

68.MARRIE T.J., PEELING R.W., FINE M.J. et al.

Ambulatory patients with community-acquired pneumonia : the frequency of atypical agents and clinical cause.

Am. J. Med., 1996 ; 101 : 508 - 15.

69.MAYAUD C.

Epidémiologie des infections respiratoires basses aiguës de l'adulte : rôle de *Chlamydia pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae*.

La Presse Médicale (1983), 1997 ; 26 (26) : 1248 - 53.

70.MAYAUD C., PARROT A., HOUACINE S., DENIS M., AKOUN G.

Epidémiologie des germes responsables des pneumopathies communautaires.

Rev. Pneumol. Clin., 1992 ; 48 : 101 - 10.

71.Memorandum.

Les légionelloses, épidémiologie et lutte : Memorandum d'une réunion de l'OMS.

Bull. OMS, 1990 ; 68 (5) : 561 - 70.

72.MOUTON Y., BIGNOLAS G., CHIDIAC C. et al.

Recommandations sur la prise en charge de la pathologie infectieuse respiratoire.

Méd. Mal. Infect., 1995 ; 25 : 1021 - 28.

73.NORTON R., SCHEPETIUK S., WEN KO T.

Chlamydia pneumoniae pneumonia with endocarditis.

Lancet, 1995 ; 345 : 1376 - 77.

74.ORFILA J., CHAIGNEAU C., GOMMEAUX A. et al.

Epidémiologie des infections respiratoires à *Chlamydia pneumoniae* dans le département de la Somme.

Bull. Epidémiol. Hebdo., 1995 ; 42 : 186 - 87.

75.PEELING R.W., BRUNHAM R.C.

Chlamydiae as pathogens : news species and new issues.

Emerging infectious diseases, 1996 ; 2 (4) : 307 - 19.

76.PUALAKKAINEN M., KUO C.-C., SHOR A. et al.

Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques.

*J. Clin.Microbiol.*1993 ; 31 : 2212 - 14.

77.RASTAWICKI W., KALUZEWSKI S., JAGIELSKI M.

Epidémiologie des infections à *Mycoplasma pneumoniae* en Pologne : 28 années de surveillance à Varsovie 1970 -1997.

Eurosurveillance, 1998 ; 10 (3) : 99 -100.

78.RAZIN S.

Mycoplasma adherence.

In : RAZIN S., BARILE M.F. eds.,*The Mycoplasma*, Vol.IV. *Mycoplasma* pathogenicity. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.,1985 ; 161 - 202.

79.RAZIN S., YOGEV D., NAOT Y.

Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasma*.
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1998 ; 62 (4) : 1094 -1156.

80.REIMAN H.A.

An acute infection of the respiratory tract with atypical pneumonia. A disease entity probably caused by a filtrable virus.

JAMA, 1938 ; 4 : 2377.

81.Réseau National de Santé Publique et CNR des *Legionella*.

Légionelloses en France en 1995 : diagnostic microbiologique .RNSP, Saint-Maurice, France, 1996.

82.SCHACHTER J.

Chlamydiae

In : BALOWS A. eds. *Manual of Clinical Microbiology*.5th edition. American Society

For Microbiology, Washington, D.C.,1991 ; 1045 - 53.

83.SCHITO G.C., GRASI G., DAINELLI B. et al.

Incidence of lower respiratory tract infections caused by *Mycoplasma*, *Chlamydia* and *Legionella* : an italian multicenter survey.

J. Chemoter., 1994 ; 6 (5) : 319 - 21.

84.SHEMER-ARNI Y., LIEBERMAN D.

Chlamydia pneumoniae induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells.

J. Infect. Dis., 1995 ; 171 : 1274 - 88.

85.SHOR A., KUO C.-C., PATTON D.

Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and

atheromatous plaques.

S. Afr. Med. J., 1992 ; 82 : 158 - 61.

86.SIRE S., STAUB T., CHRISTMANN D.

Manifestations extra-pulmonaires des légionelloses.

Méd. Mal. Infect. 1994 ; 24 : 874 - 80.

87.SOPENA N., SABRIA M., PEDRO-BOTET M. et al

Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1999 ; 18 (12) : 852 - 58.

88.STAHL J.P.

Pneumonies bactériennes : encore d'actualité ?

Méd. Mal. Infect., 1987 ; 12 : 688.

89.THOUVENOT D., BOSSHARD S.

Les mycoplasmes.

Lyon Pharmaceutique, 1991 ; 42 (5) : 417 - 24.

90.VIKERFOR S.T., BRODIN G., GRANDIEN M. et al.

Detection of specific IgM antibodies for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection : a clinical evaluation.

Scand. J. Infect. Dis., 1988 ; 20 : 601 - 10.

91.VINCENT J., LAMBARD D., DULIOUST S. et al.

Pneumopathie grave avec sérologie positive pour *Legionella pneumophila*.

Nouv. Presse Méd., 1980 ; 9 : 1963.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| GENERALITES | 3 |
| I - LES PNEUMOPATHIES DITES ATYPIQUES | 3 |
| I.1 - LES GERMES EN CAUSE..... | 3 |
| I.2 - EPIDEMIOLOGIE..... | 3 |
| I.3 - THERAPEUTIQUE | 4 |
| II - LEGIONELLA PNEUMOPHILA | 5 |
| II.1 - HISTORIQUE..... | 5 |
| II.2 - ECOLOGIE..... | 5 |
| II.2.1 - Habitat..... | 5 |
| II.2.2 - Résistance (35) | 5 |
| II.3 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES | 6 |
| II.3.1 - Taxinomie | 6 |
| II.3.2 - Morphologie..... | 6 |
| II.3.3 - Caractères cultureux | 6 |
| II.3.4 - Caractères biochimiques..... | 7 |
| II.3.5 - Caractères antigéniques..... | 8 |
| II.4 - PHYSIOPATHOLOGIE | 9 |
| II.4.1 - Pouvoir pathogène naturel (34) | 9 |
| II.4.1.1 - La forme typique : la maladie des légionnaires | 9 |
| II.4.1.2 - Les formes cliniques (34, 35, 86) | 10 |
| II.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental | 12 |
| II.4.3 - Pathogénie..... | 12 |
| II.4.3.1 - Mécanisme de la maladie (7)..... | 12 |
| II.4.3.2 - Les facteurs de virulence | 13 |
| II.5 - IMMUNITE | 14 |
| II.6 - EPIDEMIOLOGIE..... | 15 |
| II.7 - DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (34) | 16 |
| II.7.1 - Prélèvements | 16 |
| II.7.2 - Diagnostic direct | 16 |
| II.7.2.1 - détection dans les prélèvements | 16 |
| II.7.2.2 - Culture..... | 19 |
| II.7.3 - Diagnostic indirect | 21 |
| II.8 - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES..... | 22 |
| III - MYCOPLASMA PNEUMONIAE | 24 |
| III.1 - HISTORIQUE | 24 |
| III.2 - HABITAT..... | 24 |
| III.3 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES | 24 |
| III.3.1 - Taxonomie | 24 |
| III.3.2 - Morphologie (5)..... | 24 |
| III.3.3 - Caractères cultureux..... | 25 |
| III.3.4 - Caractères métaboliques (4)..... | 26 |
| III.3.5 - Caractères antigéniques..... | 26 |
| III.4 - PHYSIOPATHOLOGIE..... | 26 |
| III.4.1 - Pouvoir pathogène naturel | 26 |
| III.4.1.1 - Les infections respiratoires | 26 |
| III.4.1.2 - Les affections extra-pulmonaires | 27 |
| III.4.1.3 - Les infections chroniques..... | 28 |
| III.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental..... | 28 |
| III.4.3 - Pathogénie..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| III.5 - IMMUNITE | 29 |
| III.6 - EPIDEMIOLOGIE | 30 |
| III.7 - DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE | 31 |
| III.7.1 - Diagnostic bactériologique | 31 |
| III.7.1.1 - Prélèvements (4) | 31 |
| III.7.1.2 - Recherche d'antigènes | 31 |
| III.7.1.3 - Détection des acides nucléiques | 32 |
| III.7.1.4 - Culture | 32 |
| III.7.2 - Détection d'anticorps..... | 36 |
| III.8 - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES..... | 37 |
| IV - CHLAMYDIA PNEUMONIAE | 39 |
| IV.1 - HISTORIQUE | 39 |
| IV.2 - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES | 39 |
| IV.2.1 - Taxonomie | 39 |
| IV.2.2 - Morphologie et cycle de développement | 41 |
| IV.2.3 - Caractères antigéniques | 41 |
| IV.3 - EPIDEMIOLOGIE | 42 |
| IV.4 - PHYSIOPATHOLOGIE..... | 43 |
| IV.4.1 - Manifestations cliniques | 43 |
| IV.4.1.1 - les infections respiratoires..... | 43 |
| IV.4.1.2 - L'athérosclérose | 44 |
| IV.4.1.3 - Autres affections | 44 |
| IV.4.2 - Pouvoir pathogène expérimental (23)..... | 45 |
| IV.4.3 - Pathogénie | 45 |
| IV.4.3.1 - Mécanismes immunopathologiques de l'infection..... | 45 |
| IV.4.3.2 - Persistance | 46 |
| IV.5 - IMMUNITE (38) | 47 |
| IV.6 - DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE | 47 |
| IV.6.1 - Diagnostic bactériologique | 47 |
| IV.6.1.1 - Prélèvements..... | 47 |
| IV.6.1.2 - Détection des antigènes..... | 48 |
| IV.6.1.3 - Isolement..... | 49 |
| IV.6.1.4 - Détection des acides nucléiques..... | 49 |
| IV.6.2 - Sérologie..... | 50 |
| IV.7 - SENSIBILITE AUX ANTIBACTERIENS | 52 |
| MATERIELS ET METHODES | 54 |
| I - MATERIELS | 54 |
| I.1 - CADRE DE L'ETUDE | 54 |
| I.2 - LA POPULATION -CIBLE | 54 |
| I.3 - MATERIELS DE PRELEVEMENT | 54 |
| I.4 - MATERIELS DE LABORATOIRE | 55 |
| I.4.1 - Equipement de laboratoire | 55 |
| I.4.2 - Réactifs de coloration | 56 |
| I.4.2.1 - Colorants pour le Gram | 56 |
| Violet Gentiane | 56 |
| Lugol | 56 |
| Solution de fuchsine de Ziehl | 56 |
| I.4.2.2 - Colorant pour la cytologie quantitative..... | 57 |
| I.4.2.3 - Colorants pour le Ziehl | 57 |
| Fuchsine phéniquée de Ziehl | 57 |
| Acide sulfurique à 25% | 57 |
| Contre colorant au bleu de méthylène | 57 |
| I.4.3 - Réactifs pour IFD <i>Legionella pneumophila</i> | 58 |
| I.4.4 - Kits Chlamyvit® optimisés pour la détection d'antigène de <i>Chlamydiae</i> PBS Organics (référence 61003)..... | 58 |
| I.4.5 - Milieux de culture..... | 58 |
| I.1.4 - Réactif pour confirmation des colonies de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 59 |

| | |
|--|-----------|
| II -METHODE | 60 |
| II.1 - PREPARATION ET CONTROLE DES REACTIFS ET MILIEUX DE CULTURE | 60 |
| II.1.1 - Réactifs pour IFD de <i>Legionella pneumophila</i> | 60 |
| II.1.1.1 - Formol neutre à 10% | 60 |
| I.1.1.2 - Antisérums polyvalents anti <i>Legionella pneumophila</i> sérogroupes 1, 2, 3 et 4 | 60 |
| I.1.1.3 - Tampon phosphate pH 7,6..... | 60 |
| I.1.1.4 - Tampon carbonate glycérol pH 9..... | 61 |
| II.1.2 - Milieux de culture | 62 |
| II.1.2.1 - Milieux de culture pour <i>Legionella pneumophila</i> | 62 |
| II.1.2.2 - Milieux de culture pour <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 63 |
| II.2 – SELECTION DES MALADES..... | 66 |
| II.2.1 – Critères d’inclusion..... | 66 |
| II.2.2 – Critères d’exclusion..... | 66 |
| II.3 – RECUEIL ET TRANSPORT DES PRELEVEMENTS | 67 |
| II.4 – TRAITEMENT AU LABORATOIRE DES PRELEVEMENTS | 67 |
| II.4.1 – Critères d’acceptabilité des prélèvements..... | 67 |
| II.4.2 – Recherche directe de <i>Chlamydia pneumoniae</i> | 68 |
| II.4.2.1 – Principe du CHLAMYVIT® | 68 |
| II.4.2.2 – Description du test..... | 68 |
| II.4.2.3 – Mode opératoire | 69 |
| II.4.3 – Culture de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 69 |
| II.4.3.1 – Matériels..... | 69 |
| II.4.3.2 – Principe de la culture | 70 |
| II.4.3.3 – Titration en série | 70 |
| II.4.3.4 – Culture sur milieu diphasique | 71 |
| II.4.3.5 – Lecture des cultures | 71 |
| II.4.4 – Recherche de <i>L. pneumophila</i> | 72 |
| II.4.4.1 – Examen des prélèvements en coloration de Gram | 72 |
| II.4.4.2 – Immunofluorescence directe (IFD)..... | 73 |
| II.4.4.3 – Culture | 74 |
| RESULTATS | 75 |
| DISCUSSION | 80 |
| CONCLUSION | 84 |
| BIBLIOGRAPHIE | 86 |