
Legionella spp. et Legionelloses

**Cours de Résidanat de Microbiologie
Pr. A.Benslimani – 23 Décembre 2007**

Historique

- 1976: Congrès de *l'American Legion*, parmi 4400 participants, 182 cas de pneumonies dont 34 décès.
 - 1977: découverte par McDade de la bactérie responsable de « la maladie des légionnaires ».
 - Des travaux rétrospectifs ont révélé l'existence de cette maladie dans le passé.
 - Le nom de *Legionella* a été donné à cette bactérie, et toutes les espèces de cette bactérie furent rassemblées dans la famille des *Legionellaceae*.
-

Epidémiologie

- Bactéries ubiquitaires et cosmopolites, qui font partie de la flore aquatique et sont trouvées dans de nombreux réservoirs (naturels et/ou artificiels) d'eaux douces, ainsi que dans la boue.
 - Présence dans l'eau, soit à l'état libre, soit associés à des amibes (telles *Naegleria sp.*), ou encore...
 - Développement intracellulaire chez les protozoaires ciliés (tels ceux du genre *Tetrahymena*);
 - Colonisation des réseaux d'eau surtout anciens avec stagnation, ou des bacs d'eau, par le biais d'un important biofilm
 - Jamais isolées dans de l'eau de mer, ni dans la terre sèche ou bien chez l'animal.
 - Réservoirs artificiels: les bactéries gîtent au sein d'un biofilm :
 - Systèmes de **climatisation**.
 - Réseaux de distribution d'eau chaude (douches, robinets, ...)
 - Bassins utilisés pour la détente, la balnéothérapie ou le thermalisme dans lesquels l'eau est chaude (> 30°) et agitée (bains à remous, bains à jet,...).
 - Eaux thermales.
 - Fontaines décoratives.
 - À l'hôpital: Équipements médicaux pour traitements respiratoires par aérosols: humidificateurs de respirateurs, barboteurs d'O₂, tentes à O₂...
-

Pathologie et transmission:

- Les infections humaines sont causées par l'espèce pneumophila (séro-groupe 1 +++).
 - La moitié des 48 espèces connues de Legionella ont été associées à une affection humaine.
 - La transmission, hydrique et aérienne, se fait par inhalation d'aérosols infectieux: Il n'y a pas de transmission interhumaine.
 - La maladie frappe surtout des patients âgés de plus de 55 ans, souvent fumeurs ou atteints d'une affection sous-jacente (pulmonaire ou autre).
 - En Communautaire, l'affection est épidémique (Anadémie), endémique, souvent sporadique.
 - En milieu hospitalier, les infections nosocomiales à L.pneumophila surviennent toute l'année et la contamination se fait, soit par les aérosols de douche, soit par les respirateurs, soit encore par l'eau utilisée pour humidifier l'oxygène.
-

Physiopathologie

- 1-Pénétration: par inhalation d'aérosols contaminés par des bactéries;
 - Les aérosols de petite taille atteignent les alvéoles pulmonaires;
- 2-multiplication à l'intérieur des macrophages alvéolaires avec phagocytose: Ceci entraîne une pneumonie aiguë disséminée:
 - Elle se manifeste comme une alvéolite purulente avec afflux de PN+++ , macrophages enserrés dans un réseau fibrineux et hémorragie intra-alvéolaire .
- 3- Il y a extension rétrograde de l'infection vers les bronchioles et les ganglions lymphatiques loco-régionaux.
- Habituellement, l'infection reste confinée au tissu pulmonaire mais une diffusion hématogène reste possible;
- On peut donc retrouver les bactéries dans le sang, les organes du SRE (foie, rate, gg)
- Des localisations métastatiques sont rares (pyélonéphrites, myocardite, endocardite...)

4- Virulence et Immunité:

La virulence des légionelles est liée à leur capacité à se multiplier dans les monocytes, les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II, d'où destruction de ces cellules.

L'aptitude de ces bactéries à survivre et à se multiplier dans l'environnement, est lié à leur parasitisme vis-à-vis des protozoaires et des amibes. Leur présence au sein de kystes amibiens leur assure une certaine résistance aux fortes variations de température et aux biocides.

L'Immunité :

Legionella spp. induit essentiellement une immunité cellulaire T-dépendante .

Ainsi, la protection chez l'animal vis à vis de l'infection par cet agent peut être transmise par les cellules spléniques mais pas par le sérum d'animaux immunisés.

La Bactérie

Classification

- Gamma-2 subdivision des Proteobacteria
 - 1 seule Famille: *Legionellaceae*
 - 1 seul Genre: *Legionella* (1979)
 - Espèces: 48 connues , parmi lesquelles on retiendra:
 - - *L. pneumophila* : espèce-type, responsable de la maladie des Légionnaires ;
 - - *L.bozemanii*: espèce isolée par Marilyn Bozeman en 1959 dans un cas de Pneumonie mortelle (considérée alors comme « Rickettsia Like »)
 - - *L.dumoffi*: espèce isolée de l'eau d'une tour de refroidissement de climatiseur à New York
 - - *L.longbeachae*: espèce isolée à LongBeach en Californie ,de l'aspiration endotrachéale de cas de Pneumopathies
 - - *L.micdadeae* : espèce isolée par Tatlock en 1943 par inoculation au cobaye du sang d'un malade (Epidémie de FortBragg) ; Considérée alors comme une Rickettsie atypique.
-

TABLE 1. *Legionella* species and serogroups^a

Species	No. of serogroups	No. associated with dis
1. <i>L. pneumophila</i>	15	15
2. <i>L. bozemanii</i>	2	2
3. <i>L. dumoffii</i>	1	1
4. <i>L. micdadei</i>	1	1
5. <i>L. longbeachae</i>	2	2
6. <i>L. jordanis</i>	1	1
7. <i>L. wadsworthii</i>	1	1
8. <i>L. hackeliae</i>	2	2
9. <i>L. feeleii</i>	2	2
10. <i>L. maceachernii</i>	1	1
11. <i>L. birminghamensis</i>	1	1
12. <i>L. cincinnatiensis</i>	1	1
13. <i>L. gormanii</i>	1	1
14. <i>L. sainthelensi</i>	2	2
15. <i>L. tucsonensis</i>	1	1
16. <i>L. anisa</i>	1	1
17. <i>L. lansingensis</i>	1	1
18. <i>L. erythra</i>	2	1 ^b
19. <i>L. parisiensis</i>	1	1
20. <i>L. oakridgensis</i>	1	1
21. <i>L. spiritensis</i>	1	0
22. <i>L. jamestowniensis</i>	1	0
23. <i>L. santicrucis</i>	1	0
24. <i>L. cherrii</i>	1	0
25. <i>L. steigerwaltii</i>	1	0
26. <i>L. rubrilucens</i>	1	0
27. <i>L. israelensis</i>	1	0
28. <i>L. quinlivanii</i>	2	0

29. <i>L. brunensis</i>	1	0
30. <i>L. moravica</i>	1	0
31. <i>L. gratiana</i>	1	0
32. <i>L. adelaidensis</i>	1	0
33. <i>L. fairfieldensis</i>	1	0
34. <i>L. shakespearei</i>	1	0
35. <i>L. waltersii</i>	1	0
36. <i>L. genomospecies</i>	1	0
37. <i>L. quateirensis</i>	1	0
38. <i>L. worsleiensis</i>	1	0
39. <i>L. geestiana</i>	1	0
40. <i>L. natarum</i>	1	0
41. <i>L. londoniensis</i>	1	0
42. <i>L. taurinensis</i>	1	0
43. <i>L. lytica</i>	1	0
44. <i>L. drozanskii</i>	1	0
45. <i>L. rowbothamii</i>	1	0
46. <i>L. fallonii</i>	1	0
47. <i>L. gresilensis</i>	1	0
48. <i>L. beliardensis</i>	1	0

^a Species are listed in chronological order based on the date of isolation identification.

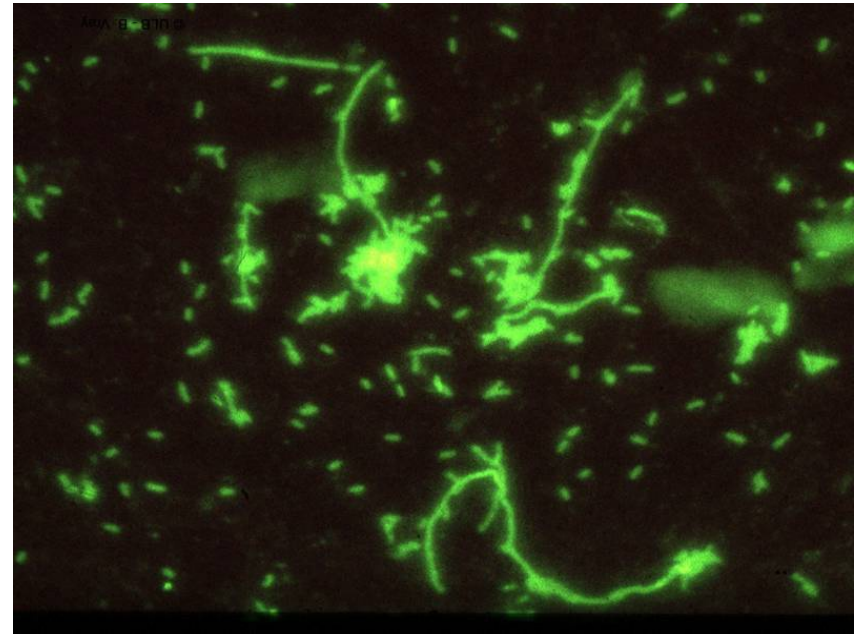
^b Serogroup 2 of *L. erythra* has been associated with human disease.

Caractères morphologiques

- Bacille de 2-4 μ de long sur 0,4-0,8 μ de large ,
- Gram négatif,
- polymorphe avec parfois formes filamenteuses
- non sporulés, non capsulés,
- le plus souvent mobile (coloration de Leifson)
- Paroi riche en Acides Gras insaturés (90%)

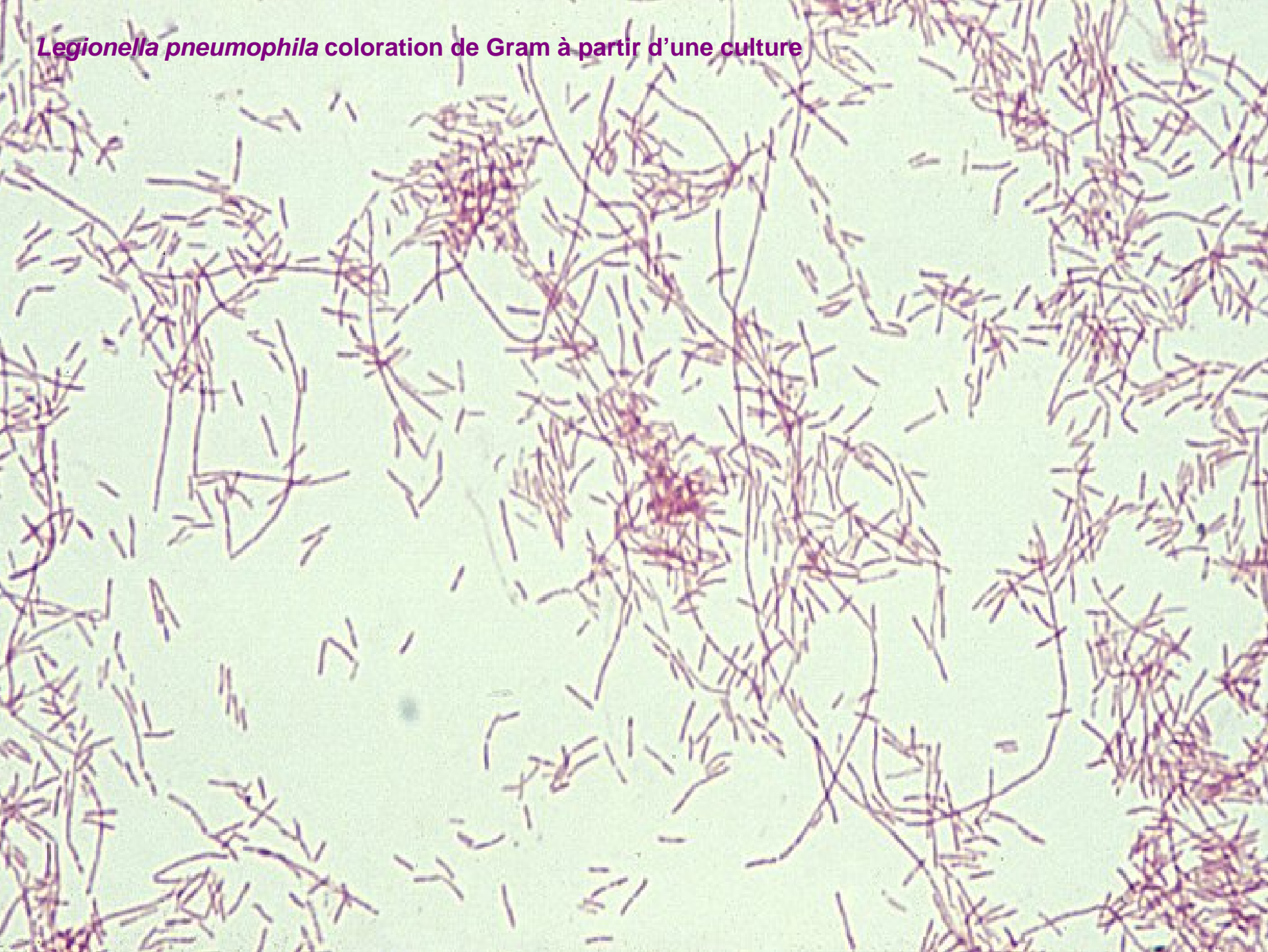
Dans les produits pathologiques	A partir d'un milieu de culture
<p>Petits bacilles non visibles à la coloration de Gram, mis en évidence par des colorations spéciales :</p> <ul style="list-style-type: none">- Coloration au Noir Soudan (inclusions lipidiques)- Coloration de Gram à la Fuschine Phéniquée basique- IFD aux anticorps monoclonaux	<p>Bacilles filamenteux Gram négatif</p>

***Legionella pneumophila* coloration à la fuschine phéniquée**



***Legionella pneumophila* coloration par Immunofluorescence Directe**

Legionella pneumophila coloration de Gram à partir d'une culture



Caractères cultureux

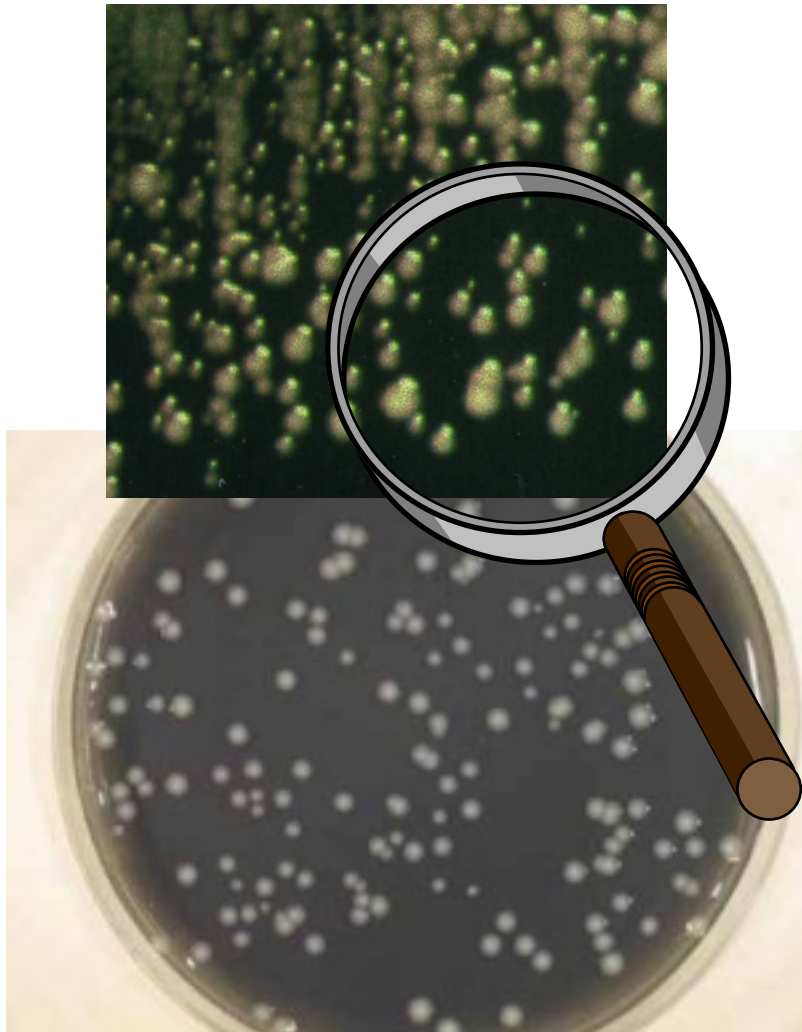
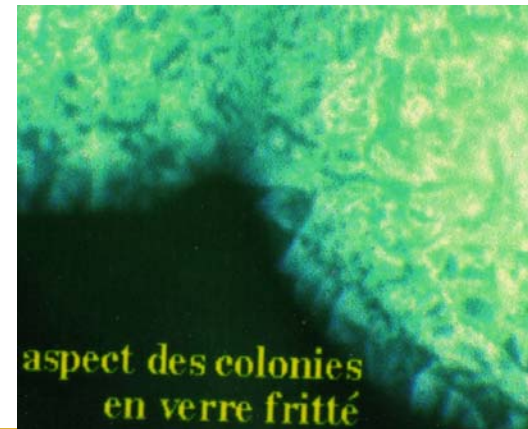
- Absence de culture sur les milieux bactériologiques courants (GN, GSF ,LJ...)
- Exigence en Cystine et en Fer
- pH : 6,85-6,95 (optimum=6,9)
- Composition du milieu de culture= L-Cystein +Pyrophosphate Ferrique + Charbon Activé .
- Les milieux de culture appropriés pour cette bactérie sont :
 - * **Mueller-Hinton** + 1% Isovitalex + 1% Hémoglobine
 - * **Milieu FG** (Hydrolysate de Caséine et d'Amidon, enrichi en L-Cysteine et Pyrophosphate Ferrique).
 - * **Milieu CYE** (Charcoal Yeast Extract Agar) (Extrait de Levure, de Charbon activé, de L-Cystéine et de Pyrophosphate Ferrique) .
 - * **Milieu Alpha BCYE** = Milieu CYE tamponné + Alpha-cétoglutarate.
- Incubation: 25°- 48°C (Optimum= 35 °C) pendant 15 jours .
- Aérobiose Stricte +2,5% CO2

Caractères cultureux- Délai de culture

Milieux de culture	Délais d'apparition des colonies en primo culture
MH + 1% isovitalex + 1% Hb	4 à 5 jours s/CO2 à 35°C
FG	3 jours s/CO2 à 35°C
CYE	3 jours s/CO2 à 35°C
Milieu Alpha BCYE	3 jours s/CO2 à 35°C



- Colonies grises, brillantes et muqueuses.
- Aspect polymorphe.
- Aspect de verre brisé lors de l'observation à la loupe.



Culture de *Legionella pneumophila* sur Milieu BCYE

Caractères biochimiques

- Bactéries aérobies strictes, à métabolisme respiratoire.
 - **Oxydase +** mais faible et inconstant.
 - **Catalase +** mais parfois faiblement ,
 - L.pneumophila : **Hippurate +++** sauf les sérogroupes 4 et 15
 - **Gélatinase +** (sauf L.feeleii)
 - **Amidon +**
 - **Nitrate réductase - , Uréase - , Glucose - , Sucres-**
-

Caractères antigéniques

- Dans le genre *Legionella* , on compte au total 70 sérogroupes distincts.
 - Il existe **15** sérogroupes connus de l'espèce pneumophila , le **sérogroupe 1** regroupant la plupart des souches humaines .
Ce sérogroupe renferme 7 facteurs antigéniques .
 - Dans les autres espèces :*L.bozemanii* (2 Sg.) , *L.longbeachea* (2 Sg.) , *L.feeleii* (2 Sg.), *L.hackeliae* (2 Sg.) , *L.sainthelensis* (2 Sg.) , *L.spiritensis* (2 Sg.) , *L.erythra* (2 Sg.) , *L.quinliranii* (2 Sg.)
 - Toutes les autres espèces représentent chacune 1 sérogroupe.
-

Action des Antibiotiques

- L.pneumophila est sensible in vitro à :

Rifampicine

Erythromycine

Azithromycine

Aminosides

Tetracyclines

Chloramphenicol

Fluoroquinolones

- Elle est résistante aux Bêtalactamines par production de Bêtalactamase.
-

Pouvoir pathogène

- Facteurs favorisants: Sexe masculin, fumeur éthylique, âge (> 50 ans), maladie chronique (affection cardio pulmonaire, diabète), Immunodépression.
- 3 formes cliniques :

Forme classique ou « maladie des légionnaires », pneumopathie atypique grave:

- Incubation 2 à 10 jours.
- Syndrome pseudo grippal: fièvre, troubles hépatiques, diarrhées.
- Évolution vers le décès ou favorable en 8 jours

Forme bénigne ou « fièvre de Pontiac »:

- Incubation 36 heures.
- Atteinte bénigne des voies aériennes supérieures.
- Évolution spontanément favorable.

Légionellose de l'immunodéprimé :

- Transplantés, Leucémiques, Cancéreux...
 - Évolution très grave
 - Pneumopathie Atypique aiguë souvent mortelle , évoluant fréquemment vers l'abcédation .
-

Diagnostic biologique des infections à *Legionella*: Prélèvements

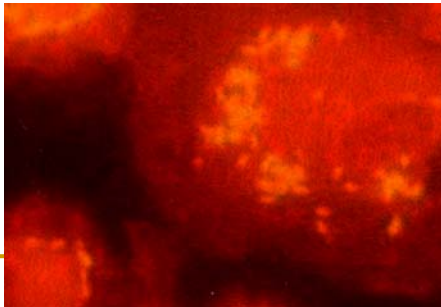
- Prélèvements:
 - Crachats
 - Liquide broncho alvéolaire
 - Lavage - Brossage bronchique
 - Ponction trans-trachéale
 - Aspiration endo-bronchique
 - Ponction trans-trachéale
 - Biopsie Pulmonaire trans- bronchique broyée
 - Culot de Centrifugation de liquide pleural
 - Hémocultures

Les prélèvements sont recueillis le plus stérilement possible pour éviter la contamination , en utilisant si nécessaire un peu d'eau stérile comme support.

- Transport : L'envoi au Laboratoire doit être effectué dans les plus brefs délais .
 - Si le délai se situe autour de 30 mn et plus , on peut conserver le prélèvement au réfrigérateur à +4°C.
 - Si ce délai dépasse 24-48 heures, le prélèvement doit être congelé à -20°C au minimum.
 - Si l'on veut pratiquer un diagnostic par Immunofluorescence directe , la pièce doit être formolée.

Diagnostic biologique des infections à *Legionella*: Coloration par IFD

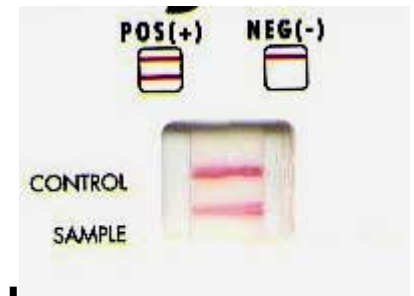
- Se fait sur frottis minces.
- Trois pools sont utilisés:
 - Pool A: *L.pneumophila* 1, 2, 3, 4.
 - Pool B: *L.pneumophila* 5 et 6, *L.dumoffi*, *L.longbeacheae* 1.
 - Pool C: *L.gormanii*, *L.micdadei*, *L.longbeacheae* 2, *L.bozemanii*.
- Seuil: Test positif si ≥ 5 bacilles fluorescents.
- Technique rapide, spécifique mais peu sensible.



IFD à l'Ac anti-legionella pneumophila sg.1

Diagnostic biologique des infections à *Legionella*: Recherche d'antigènes solubles

- Se fait sur un prélèvement d'urine.
- ELISA, RIA,
- Immunochromatographie sur membrane.
- Test positif dès les premiers jours de la maladie, jusqu'à plus de 2 mois.
- Même sous traitement antibiotique
- Permet un diagnostic rétrospectif.



Diagnostic biologique des infections à *Legionella*: Culture et identification

- Parfois les échantillons sont traités par une solution HCL-KCL avant la mise en culture.
 - Les milieux utilisés sont adaptés aux exigences du germe recherché: CYE, BCYE. Des antibiotiques peuvent être rajoutés pour les rendre sélectifs. Des dilutions du prélèvement sont effectuées.
 - L'incubation des boîtes doit durer jusqu'à 15 jours avec examen quotidien à la recherche de colonies suspectes.
 - L'identification est basée sur: acidification des sucres, la recherche de la NRse, l'uréase, la gélatinase et l'hydrolyse de l'hippurate. Une galerie type « API 20E » avec un inoculum lourd peut convenir.
 - L'identification sérologique de *L.pneumophila* peut se faire par agglutination.
-

Diagnostic biologique des infections à *Legionella* :

Sérologie par IFI

- Détection des anticorps dirigés contre le Lipopolysaccharide de Legionella
- Seule la sérologie de legionella pneumophila séro groupe 1 est réalisée en pratique
- On prélève un sérum précoce (le plus tôt possible) et un sérum tardif
- Pour noter une séroconversion parfois tardive, on prélève tous les 8 jours.
- Les antigènes utilisées sont sous forme de pools:

polyvalents : L.pn 1 à 4 et 5-6

monovalents : L.pn 1

- Lecture :

Vu la grande spécificité de l'antigène , le diagnostic est positif si le titre passe de moins de 16 à plus de 64.

Le diagnostic est très probable si le titre se stabilise à 128.

Il est positif si le titre est supérieur ou égal à 256 .

- Intérêt : Le sérodiagnostic permet :
 - * une suspicion précoce du diagnostic
 - * de confirmer la suspicion
 - * c'est une technique sensible à 80%
 - * La spécificité est bonne mais faux + avec Chlamydia, Mycoplasmes et C. burnetii



Diagnostic biologique des infections à *Legionella*: par technique de biologie moléculaire

- Détection par sondes nucléiques
 - Détection par technique PCR: Amplification des espaces intergéniques 16S-23S, séquençage du gène *mip*...
-

Recherche de *Legionella* dans l'environnement

- La surveillance microbiologique systématique est controversée, en raison de son coût.
 - Indiquée dans les services médicaux où sont hospitalisés des patients exposés à ce risque (IMD, cancéreux, blocs opératoires, ...), ainsi que devant toute pneumopathie aiguë.
 - Elle se fera par analyse microbiologique des eaux, plus particulièrement l'eau de climatisation.
-

Legionella et antibiotiques

- Sensibilités habituelles:
 - Rifampicine
 - Erythromycine
 - Azithromycine
 - Tétracycline
 - Chloramphénicol
 - Fluoroquinolones :Levofloxacin
 - **En pratique le traitement des infections non sévères fait généralement appel à l'erythromycine ou à d'autres macrolides plus récents comme l'Azithromycine ou la Clarithromycine.**
 - **Lors de légionelloses sévères , on utilise des fluoroquinolones (Ciprofloxacin, Ofloxacin,Péfloxacin, Lévofoxacin) ou l'Azithromycine ou des associations macrolides –rifampicine ou fluoroquinolones-rifampicine.**
-

Prévention

- Elle est difficile.
 - Il faut désinfecter régulièrement les systèmes de climatisation et les appareils de ventilation assistée.
 - Des systèmes de chauffage de l'eau à 60°C ont également été préconisées pour éliminer ces bactéries .
 - On préconise actuellement de plus en plus, l'injection , dans le réseau d'eau surtout chaude, d'un dérivé chloré : le Monochloramine
-

Références bibliographiques

- 1- Berche P., Gaillard J.L., Simonet **Legionella** Bactériologie - Bactéries des infections humaines Ed.Flammarion 1988
 - 2- KEZZAL K. **Legionella** Polycopié - Résidanat de Microbiologie Année Universitaire 1986-87
 - 3- Fleurette J. **La Maladie des Légionnaires** La Recherche N°141 Février 1983 P 146-155
 - 4- Jeffrey J. et coll **Legionella pneumophila contamination of a hospital humidifier** American Review of Respiratory Disease Vol 128, Number 4 P657-661
 - 5-Labbé CH. et Recasens O. **La Legionellose frappe en silence** Science et Vie n°984 sept 1999
 - 6- **Effet of Monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaire's disease** The Lancet n°353 1999
 - 7- Barry S. Fields and al **Legionella and Legionnaires' diseases : 25 years of investigation** Clinical Microbiology Reviews July 2002 P 506-526
 - 8- J.P.Euzéby : **Legionella** in Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (site à rechercher sur Google.com).
 - 9- TALIMAMMAR H. **Legionella sp.** cours de Bactériologie alimentaire 7 juin 2006 (fichier PowerPoint)
-