Recommandations sur les légionelles et la légionellose

Module 4
Diagnostic de *Legionella* spp. dans des prélèvements cliniques

Le diagnostic de la maladie du légionnaire repose sur les résultats d'analyses cliniques et/ou radiologiques ainsi que sur des analyses de laboratoire. Ce module explique brièvement les différentes techniques utilisées dans le cadre de ces dernières.

1 Introduction 2
2 Culture 2
3 Antigène 2
4 PCR 3
5 Sérologie 3
6 Typage 4
Références 4

Version du	Version précédente	Changement par rapport à la version précédente
26.04.2024	Révision totale en 2018	Nouvelle version du module (révision totale en 2024)

1 Introduction

Selon un rapport du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), 87 % des cas de légionellose en Europe ont été diagnostiqués par test d'antigène urinaire. Le recours à des cultures, à l'amplification en chaîne par polymérisation (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ou à une combinaison de techniques est nettement plus rare. En effet, seuls 10 % des cas rapportés ont été détectés au moyen de cultures ou par PCR.

2 Culture

La culture de prélèvements respiratoires est toujours considérée comme la technique de référence pour le diagnostic de la légionellose. Elle permet d'isoler la souche bactérienne afin d'en étudier la sensibilité aux antibiotiques et de procéder au typage épidémiologique. Elle est plutôt compliquée à réaliser et nécessite beaucoup d'expérience. Les bactéries doivent être cultivées durant plusieurs jours. Les légionelles ne se développent pas sur les milieux de culture utilisés en routine dans les laboratoires de microbiologie, mais sur un milieu complexe composé notamment d'extrait de levure et de charbon actif, appelé milieu BCYE (*buffered charcoal yeast extract*). La coculture[1] de *Legionella* spp. sur amibes est également possible. Cette technique, qui permet de cultiver les espèces qui ne se développent pas sur un milieu BCYE, se trouve toutefois encore au stade de la recherche.

Les légionelles sont isolées bien plus facilement à partir d'échantillons de matériel prélevé dans les voies respiratoires inférieures qu'à partir de frottis de la gorge ou du nasopharynx. Les résultats de la culture des légionelles ne sont que très rarement positifs si les échantillons ne proviennent pas des voies respiratoires inférieures.

Les inconvénients de la culture sont :

- La longue durée d'analyse (jusqu'à 14 jours) ;
- La sensibilité moindre par rapport à d'autres méthodes ;
- La disponibilité limitée de matériel clinique approprié, prélevé de préférence dans les voies respiratoires inférieures.

Le grand avantage de cette technique est la possibilité de caractériser le génome de la souche clinique et de le comparer à des prélèvements environnementaux. Il s'agit d'un facteur clé pour identifier la source d'infection et endiguer la propagation. Lorsque cela est possible, il est donc important de recourir à une culture chez tous les patients dont le test d'antigène urinaire s'est révélé positif (voir chapitre 6).

3 Antigène

L'introduction à la fin des années 1990 de la technique immuno-enzymatique (*Enzym-Immuno-Assays*, EIA) pour détecter la présence de l'antigène de *L. pneumophila* dans l'urine a permis d'obtenir un diagnostic rapide de la légionellose. L'antigène détecté est un lipopolysaccharide bactérien (LPS) dont les différents motifs servent de base à l'identification des sérogroupes de *L. pneumophila*. Chez la plupart des patients, il est détectable entre le premier et le troisième jour suivant l'apparition des symptômes. Le développement et la diffusion des tests urinaires rapides comme l'immunochromatographie à flux latéral ou les tests de fluorescence ont révolutionné le diagnostic de la légionellose et permettent une adaptation précoce du traitement antibiotique.

Les kits disponibles dans le commerce permettent de détecter principalement les *L. pneumophila* du sérogroupe 1 (Lp1), mais sont malheureusement moins efficaces pour mettre en évidence les souches appartenant à d'autres sérogroupes. La sensibilité dépend donc du sérotype à l'origine de l'infection. Elle est de 86 % pour le sérogroupe Lp1 et de 74 % à 79 % si l'on tient compte de tous les sérogroupes.

Le principal inconvénient du test d'antigène urinaire est dû aux signaux non spécifiques des complexes immuns présents dans l'urine, qui peuvent influencer le test et donner des résultats faux positifs. Ce problème peut être facilement contourné en chauffant rapidement l'urine jusqu'à une température de 100 °C. Les lipopolysaccharides des légionelles étant résistants à la chaleur, cette technique permet de libérer les

[1] Culture conjointe de plusieurs organismes.

polysaccharides bactériens des complexes immuns et d'écarter les signaux non spécifiques. Ce procédé de chauffage simple est recommandé pour confirmer **tout** test d'antigène urinaire positif aux légionelles. Un autre facteur pouvant aboutir à de faux positifs est la persistance de l'antigène des légionelles dans l'urine. Des études récentes ont montré que l'antigène était encore détectable plusieurs mois (jusqu'à un an) après la disparition des symptômes. Cette observation est faite dans environ 10 % des cas, en particulier chez les patients souffrant de maladies sous-jacentes graves et les personnes immunosupprimées.

La détection de l'antigène dans l'urine présente des avantages considérables par rapport aux autres procédés :

- Les échantillons d'urine sont faciles à obtenir ;
- L'antigène peut être détecté à un stade très précoce de l'évolution de la maladie ;
- Le test est rapide et facile à réaliser ;
- Le test ayant une valeur prédictive positive élevée, un résultat positif confirme dans la plupart des cas que la personne est infectée par des légionelles.

Pour les médecins, c'est surtout la valeur prédictive élevée qui est importante. En cas de symptômes évocateurs de légionellose, un résultat positif permet d'affirmer avec une grande certitude que la personne est effectivement infectée. Un résultat négatif n'exclut toutefois pas une légionellose. Si la suspicion persiste malgré un résultat négatif, d'autres techniques de détection doivent être mises en œuvre en vue d'une investigation plus approfondie.

Récemment, des tests basés sur d'autres antigènes, comme les protéines ribosomiques, ont été développés et commercialisés. Si les études scientifiques à ce sujet sont encore insuffisantes, les tests semblent prometteurs et pourraient être utilisés pour détecter d'autres sérogroupes voire d'autres types de légionelles.

4 PCR

La PCR permet potentiellement de détecter tous les types connus de légionelles. Si les échantillons sont prélevés au niveau des voies respiratoires (sécrétions bronchiques, lavage broncho-alvéolaire, biopsies ou expectorations), elle permet d'obtenir des résultats rapides avec une bonne spécificité et sensibilité. Les quelques études disponibles ayant évalué la technique de la PCR avec des échantillons de sérum ou d'urine ont toutefois révélé une faible sensibilité.

Les techniques d'amplification des acides nucléiques requièrent un personnel spécialement formé et un équipement très performant. Grâce aux progrès technologiques réalisés au cours des dernières années, elles sont toutefois de plus en plus accessibles aux laboratoires disposant d'un petit budget.

Certaines études montrent que si la PCR est utilisée en complément d'un test d'antigène urinaire, elle permet d'augmenter le nombre de diagnostics de cas de légionellose de 18 à 30 %. Avec le recours croissant aux PCR multiplex (qui permettent de détecter simultanément plusieurs microorganismes) pour le diagnostic de pneumonies communautaires, le diagnostic des légionelles pourrait se faire de plus en plus souvent par PCR.

5 Sérologie

Jusqu'au milieu des années 1990, la détection de la maladie du légionnaire reposait principalement sur un diagnostic sérologique. Cette technique est toutefois de moins en moins utilisée depuis l'introduction du test d'antigène urinaire et du recours accru aux techniques moléculaires (PCR) sur des échantillons prélevés au niveau des voies respiratoires.

La sérologie ne fournit qu'un diagnostic rétrospectif ; il ne s'agit pas d'un indicateur immédiat de la maladie. En d'autres termes, si l'on se base sur une séroconversion en comparant les échantillons prélevés pendant la phase aiguë avec ceux prélevés de quatre à huit semaines d'intervalle pendant la phase de convalescence, cela signifie que la période au cours de laquelle le traitement est possible est passée depuis longtemps. De plus, un seul titre d'anticorps élevé est généralement peu révélateur. En effet, plusieurs études de prévalence montrent que selon l'âge, le domicile et l'environnement de travail, jusqu'à 30 % des personnes en bonne santé peuvent présenter des titres d'anticorps élevés contre les légionelles.

Compte tenu de toutes ces restrictions, les tests sérologiques sont devenus moins courants pour le diagnostic primaire de la légionellose. Ils présentent plutôt un intérêt dans le cadre d'études épidémiologiques.

6 Typage

Le typage des souches de *Legionella* spp. isolées à partir d'échantillons prélevés sur des patients ou dans l'environnement vise à confirmer ou écarter un lien avec des sources d'infection. Il permet d'étudier la répartition des souches bactériennes aux échelles locale et internationale et d'en suivre l'évolution au cours du temps.

Il existe deux sortes de méthodes de typages des isolats cultivés. Les méthodes phénotypiques basées sur les caractéristiques biochimiques ou immunologiques des isolats (par ex. le sérotypage) et les méthodes génotypiques qui s'appuient sur les différents motifs des séquences de l'acide nucléique du génome des bactéries, telles que le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP), le pulsotypage (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), le typage séquentiel (*Sequence-Based Typing*, SBT) et le séquençage du génome entier *(whole genome sequencing*, WGS). Cette dernière technique permet de visualiser la totalité du matériel génétique (ADN) des légionelles et de comparer les échantillons.

Références

European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2020. Stockholm: ECDC; 2022.

Kawasaki T., Nakagawa N., Murata M., Yasuo S., Yoshida T., Ando K, Satoshi O., Okada Y. Diagnostic accuracy of urinary antigen tests for legionellosis: A systematic review and meta-analysis. Respiratory Investigation 2022; 60:205-214.

Mercante J. W., Winchell J. M. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clinical Microbiology Reviews 2015; 28:95-133.

Viasus D., Gaia V., Manzur-Barbur C., Carratalà J. Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. Infectious Diseases and Therapy 2022; 11:973-986.