



# RECHERCHE DE *LEGIONELLA SPP.* DANS LES EAUX DE DISTRIBUTION D'ABIDJAN, CÔTE D'IVOIRE

**KOUADIO K<sup>1</sup>, OULAI A<sup>1,4</sup>, KAKOU-NGAZOA S<sup>2</sup>, KALPY C<sup>3</sup>, MANIZAN P<sup>1</sup>, COULIBALY E<sup>1,3</sup>, NIAMKE S<sup>4</sup> et DOSSO M<sup>1,2,3</sup>.**

- 1. Unité d'écoépidémiologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire**
- 2. Plateforme de biologie moléculaire, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire**
- 3. Unité de microbiologie de l'environnement, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire**
- 4. Unité de Formation et de Recherches en Biosciences, Université d'Abidjan-Cocody**



- ❑ Les *Legionella*:
  - bactéries hydrotelluriques
  - Gram négatif
  - Isolées pour la première fois par McDade en 1977 (Grégoire, 1996)
  - Responsables d'un ensemble d'infections pulmonaires
  - Plus grave = maladie des Légionnaires appelée légionellose





## INTRODUCTION(2)

- Présentes dans les réservoirs naturels ou artificiels d'eau douce (réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire , ballons de réserve d'eau, douches, robinets)
- Les systèmes de climatisation les tours aéroréfrigérantes, les eaux thermales ou encore les fontaines décoratives.
- Prolifèrent dans l'eau stagnante entre 25 et 43°C



## INTRODUCTION (3)

- ❑ La détection de cette bactérie est fastidieuse et difficile.
- ❑ La prévention repose essentiellement sur une surveillance environnementale et clinique.





## OBJECTIFS

- En Afrique (Afrique du Sud, au Maroc et au Cameroun) d'importantes données font mention de l'existence des *Legionella spp.*
- En Côte d'Ivoire, les études de Coulibaly D en 2000 et Talla-Nzussouo Y en 2005: augmentation taux de prévalence des pneumopathies chez les malades hospitalisés.
- L'objectif de rechercher Legionella en Côte d'Ivoire
- Mettre en place une stratégie de surveillance des réseaux de distribution d'eau.





## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### ❑ **Prélèvement et collecte des échantillons**

- Février et Août 2010.
- 4 sites retenus (3 CHU et 1 hôtel).
- 1 L d'eau prélevé : chauffe-eau, pommes de douche, robinet.
- La température et le pH mesurés in situ
- Echantillon conservé entre 6 et 8°C et acheminé au laboratoire de microbiologie de l'environnement pour analyse.





## MATÉRIEL ET MÉTHODES(2)

### ❑ Filtration des échantillons

- Echantillons filtrés sur des membranes polycarbonates de 0,45  $\mu\text{m}$  de diamètre (Sartorius AG-37075 Goettingen, Germany).
- filtres mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée stérile contenant 5 ml d'échantillon initial d'eau.
- Les flacons passés au sonicateur: 3 min à 50 kHz afin de décrocher les bactéries de la membrane.
- Le concentrât cultivé et détecté par PCR





## MATÉRIEL ET MÉTHODES(3)

### ❑ **Extraction génomique de l'ADN bactérien**

- Le protocole d'extraction selon Kit Nuclisens (Biomérieux, Boxtel, NL).
- 500 µl du filtrat ajoutés à 1 ml de tampon de lyse et incubés 10 min à T° ambiante.
- 40 µl de solution de silice ajoutés et incubés durant 10 minutes à T° ambiante.
- Centrifugation de 30 secondes à 13000 tours/minute à T° ambiante.
- culot lavé séché.
- Elution de l'ADN obtenu par l'ajout de 60 µl de tampon d'éluion suivie d'une incubation à 56°C pendant 10 min et d'une centrifugation d'1 min à 13000 tours/min.
- Surnageant contenant l'ADN total récupéré et conservé à -20°C.







## MATÉRIEL ET MÉTHODES(4)

### ❑ Détection moléculaire par amplification génique

- La détection de *Legionella spp* dans les extraits d'ADN provenant des concentrats des échantillons d'eaux faite selon le protocole Joly *et al.* (2006) basé sur la séquence 16S rRNA et sont spécifiques du genre *Legionella spp* de taille de 386 bp.
- Réaction a été faite dans un volume final de 50 µl contenant 1,5 µl de chacune des amorces 10µM Legio-F (5'-AAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3') et 10µM Leg-R (5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG-3'), 2µl de 10 mM dNTPs, 2,5 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de tampon Go-Taq-Polymérase (10X) et 0,4µl de 5U/ul Taq Polymerase (Promega, Allemagne) et 5µl d'ADN.
- Amplification faite dans un thermocycleur Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems, USA)
- La révélation faite en gel d'agarose à 1 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium et d'une illumination aux ultra-violets pour identification de la taille.



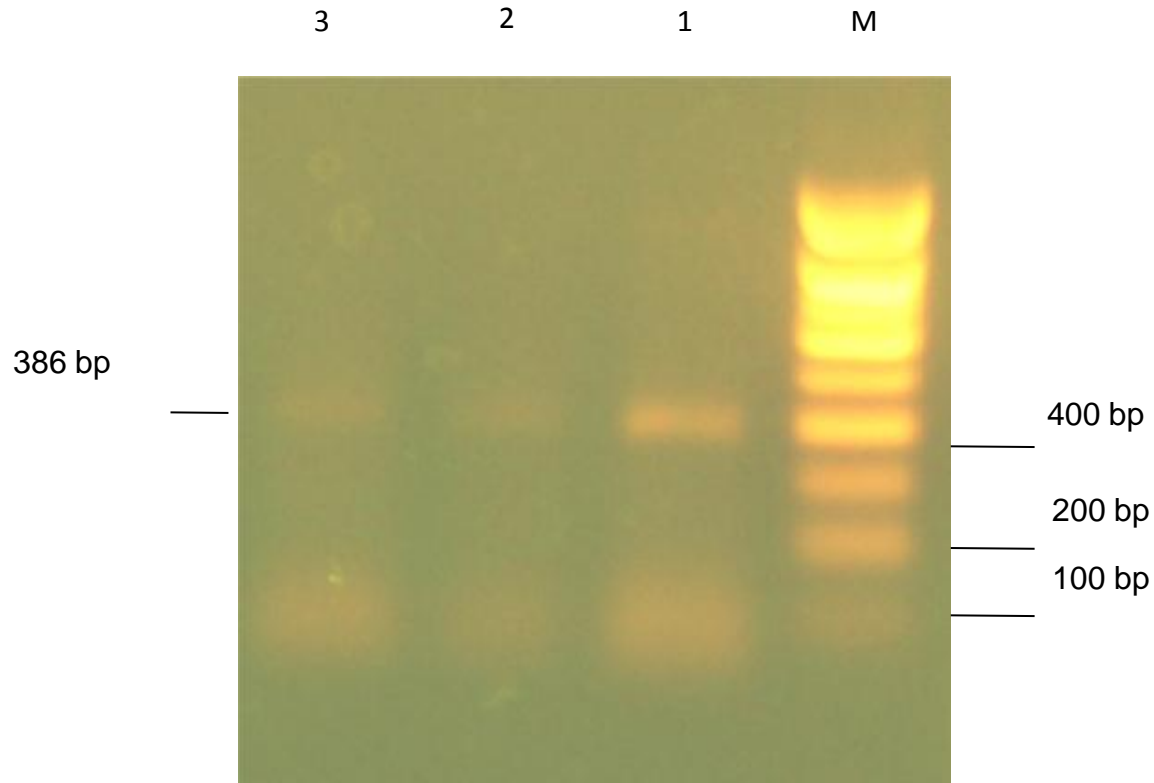


# RESULTATS

## ❑ Détection moléculaire de *Legionella spp.*

- 219 échantillons prélevés
- 54 (24,6%) des chauffe-eau,
- 27 (13,2%) des pommes de douche,
- 138 (63%) des robinets.
- 139 (63,4 %) des CHU et 80 (36,6 %) de l'hôtel.  
Températures d'eau de 28°C et de 45°C (Moyenne de 29°C)
- Eau analysée en détection moléculaire pour l'identification de la bactérie *Legionella*.
- 3 (1,3%) d'un CHU ont montré une bande positive de 386 bp = présence de *Legionella*
- Hôtel = 0 *Legionella spp.*





**Figure 1** : Détection de *Legionella ssp.* dans les échantillons hydriques par amplification génique. **M** : Poids moléculaire d'ADN Smart Ladder (Eurobio, France) ; **1** : pomme de douche ; **2** et **3** : robinet .





## DISCUSSION

- ❑ Les résultats corroborent avec ceux de Poupard et al (2007) et Gacouin et al. (2003)
- Températures correspondent à celles des études antérieures (25-50°C)
- D'autres études ont montré la survie de *Legionella spp* à des températures variant de 4 à 60°C. Yee, Wadowsky (1982) et Munaux (2002) (32°C à 42°C) avec un optimum à 37°C.





## DISCUSSION(2)

- Surman *et al.* (2002) ont montré que distribution d'eau des résidences des T° de 37,5°C et 48,8°C favorables à la multiplication des *Legionella spp* dans l'eau du réseau
- Température supérieure à 60°C semble être néfaste à la multiplication des *Legionella spp*.
- Nos résultats ont montré que *Legionella spp* circule dans les réseaux de distribution d'eau potable à Abidjan( Surtout réseaux d'eaux sanitaires).





## DISCUSSION(3)

- Principaux réservoirs des *Legionella* = Eaux sanitaires des hôpitaux et les hôtels
- Notre étude, T° Moy d'eau des chauffe-eau = 45°C et l'eau froide (robinet, pomme de douche) = 27°C. Nos échantillons se rapprochent plus des températures rapportées et par conséquent sont favorables à la prolifération de *Legionella spp.*
- PCR présence bactérie pathogène dans les réseaux d'eau sanitaire à Abidjan.





## CONCLUSION

- ❑ En Côte d'Ivoire, aucune donnée faisant état de la présence de *Legionella spp.* et des infections dont elles sont responsables n'est disponible.
- ❑ Prévalence des infections pulmonaires est élevée dans les centres hospitaliers.
- ❑ La présence de *Legionella* dans les réseaux de distribution d'eaux d'Abidjan
- ❑ Mise en place une surveillance de *Legionella* dans les réseaux de distribution d'eau d'Abidjan.





## CONCLUSION (2)

- ❑ La mise en place de la culture de *Legionella spp* pour: déterminer pouvoir infectieux, gènes de virulence, sensibilité aux antibiotiques et prévalence dans le système de distribution hydrique et dans l'environnement nécessaire
- ❑ pour connaître la prévalence réelle de cette bactérie en Côte d'Ivoire.
- ❑ Elle incitera les autorités à prendre les mesures nécessaires pour une surveillance environnementale.







## REMERCIEMENT

- Ce travail a été entièrement financé par l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI). C'est pourquoi nous lui adressons notre sincère remerciement pour l'opportunité qu'elle nous a offerte en vue d'effectuer cette étude préliminaire de la recherche de *Legionella* pour la première fois en Côte d'Ivoire





## RÉFÉRENCE

- **Benié-Bi WR.** Mémoire du Certificat d'Etudes Spécialisées Bactériologie-virologie. 2003 ; IPCI.
- **Coulibaly D.** 2000; Thèse, Med, Abidjan N°2616.
- **McDade JE, Shepard C, Fraser DW., Redus TR, Dowdle WR** 1977; *New Engl J Med.* 297: 1197-1203.
- **Leoni E., De Luca G., Legnani P. P., Sacchetti R., Stampi S. et Zanetti F.** (2004).. *J. Appl. Microbiol.* 98:373–379
- **Marston, B. J., H. B. Lipman, and R. F. Breiman.** 1994.. *Arch. Intern. Med.* 154:2417–2422



**MERCI POUR VOTRE AIMABLE ATTENTION!**

