

20 • Rickettsies et bactéries apparentées

Plan du chapitre

- 1• Introduction
- 2• Contexte épidémiologique et clinique
- 3• Prélèvements microbiologiques
- 4• Transport des prélèvements
- 5• Examens microbiologiques
- 6• Interprétation des résultats

1 • Introduction

Le terme «rickettsies» correspond à un ensemble hétérogène de bactéries intracellulaires, ayant la structure de bactéries à Gram négatif, associées à des arthropodes réservoirs et vecteurs. En pratique, il convient de distinguer les genres *Rickettsia/Orientia*; *Bartonella/Afipia*; *Coxiella*; *Ehrlichia* tant du point de vue épidémiologique et clinique que du point de vue microbiologique.

2 • Contexte épidémiologique et clinique

1- Rickettsia/Orientia

Le genre *Rickettsia* est composé de bactéries intracellulaires strictes associées à des tiques (groupe boutonneux), à des puces et à des poux (groupe typhus) et à des thrombiculés (*Orientia/Rickettsia tsutsugamushi*). Pour le groupe boutonneux, l'infection est évoquée devant une fièvre, éruption, escarre cutanée, adénomégalie périphérique régionale après piqûre de tique, en France et autour du Bassin Méditerranéen, au Portugal (*R. conorii*), en Afrique australe (*R. africae*), en Amérique (*R. rickettsii*) et en Europe centrale (*R. conorii*, *R. slovaca*). Pour le groupe typhus, le diagnostic est évoqué devant un tableau fébrile, éruption, myalgie, pneumonie et encéphalite dans un contexte de contact avec les rats et leurs puces (typhus murin ou endémique, *R. typhi*) ou de prolifération des poux de corps en cas d'hygiène corporelle et vestimentaire défectueuse en saison froide (typhus épidémique, *R. prowazekii*). Il s'agit essentiellement de pathologie d'importation au retour des Haut-plateaux d'Afrique (*R. prowazekii*) et d'Asie du Sud-Est (*R. typhi*). *Orientia tsutsugamushi* est transmise par des trombiculés et se manifeste comme une pathologie d'importation au retour d'Asie du Sud-Est par un tableau fébrile, éruptif avec adénomégalie périphérique régionale.

2- Coxiella

Coxiella burnetii est l'agent intracellulaire strict de la fièvre Q, zoonose ubiquitaire. L'infection est asymptomatique dans 50% des cas et responsable de fièvre isolée, syndrome grippal, pneumonie atypique, hépatite ou méningo-encéphalite avec contact avec des ovins, caprins, bovins, chats et chiens. Les patients porteurs d'une valvulopathie, d'une prothèse valvulaire, d'une prothèse vasculaire, les femmes enceintes et les patients atteints de néoplasie peuvent développer une forme chronique à type d'endocardite, infection de prothèse vasculaire ou ostéite.

3- Bartonella/Afipia felis

Bartonella spp. et *Afipia felis* sont des bactéries intracellulaires facultatives. *Afipia felis* a été isolée de ganglions de maladie des griffes du chat mais son rôle reste controversé. La recherche de *Bartonella* spp. est effectuée au cours de la maladie des griffes du chat (*B. henselae*) et de syndromes ganglionnaires chroniques (*B. quintana*), d'endocardite à hémocultures négatives, (*B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*), de septicémie chez les patients sans domicile fixe (fièvre des tranchées, *B. quintana*), d'angiomatose bacillaire au cours de l'infection VIH, (*B. quintana*, *B. henselae*) et de péliose hépatique au cours de l'infection VIH (*B. henselae*). L'alcoolisme chronique et l'absence d'hygiène vestimentaire rencontré actuellement chez les patients SDF sont des facteurs de risque de l'infection à *B. quintana*. Le contact avec les chats et leurs puces est responsable de l'infection à *B. henselae*. *B. elizabethae* a été isolée chez le rat. *B. bacilliformis* est responsable d'une septicémie avec hémolyse (fièvre de Oroya) et tumeurs cutanées (verruca peruana) et est limitée aux Andes.

4- Ehrlichia

Le diagnostic d'ehrlichiose granulomateuse humaine doit être évoqué systématiquement devant tous les patients atteints d'un syndrome arthromyalgique fébrile après exposition ou piqûres de tiques en zone d'endémie de la maladie de Lyme.

3 • Prélèvements microbiologiques

Ces pathologies donnent lieu à un prélèvement de sérum sur tube sec, un deuxième sérum peut être pré-

levé une semaine après le premier. Une hémoculture peut être prélevée sur tube hépariné. Au cours des fièvres boutonneuses à *Rickettsia*, ce prélèvement est aussi utilisé pour l'immunoséparation des cellules endothéliales circulantes et l'immunodétection de *Rickettsia conorii*. Ce prélèvement doit être congelé à -20°C pour recherche de *Bartonella* spp. Les biopsies (peau, foie, os) et les prélèvements tissulaires (valves natives, prothèses valvulaires, prothèses vasculaires, placenta) seront recueillis dans un récipient sec stérile.

4• Transport des prélèvements

Les prélèvements sont transportés à température ambiante pour un délai de 24 heures, après congélation à -20°C au delà de ce délai. Le tube de sang pour hémoculture *Bartonella* spp. doit être transporté congelé dans la carboglace.

5• Examens bactériologiques

1- Sérologie

La méthode utilisée est l'immunofluorescence indirecte qui est la méthode de référence. Pour *Rickettsia/Orientia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, des antigènes obtenus sur culture cellulaire semi-purifiés par centrifugation sont utilisés. *Coxiella burnetii* présente une variation de phase antigénique avec une phase I et une phase II. Pour *Bartonella* des antigènes semi-purifiés sur culture cellulaire ou sur milieu axénique peuvent être utilisés. La sérologie détecte le titre d'IgT (Ig Totales) et d'IgM. Pour *Coxiella burnetii*, le titre d'IgT anti-phase II doit être complété par une détermination du titre IgT, IgM et IgA anti-phase I, pour un titre d'IgT anti-phase II 1 : 1.600.

2- Immunodétection

L'immunodétection est possible sur prélèvement tissulaire frais ou fixé et inclus. Elle est disponible pour la détection de *Rickettsia* spp. en biopsie cutanée, de *Coxiella* sur placenta, valve cardiaque et anévrisme de *Bartonella* sur biopsie cutanée, valve cardiaque et de *Ehrlichia* sur biopsie ostéomédulelle. Il est possible de pratiquer une immunodétection de *Rickettsia conorii* sur les cellules endothéliales circulantes après leur immunoséparation. Les immunodétections reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux et des techniques d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase.

3- Isolement et culture

L'hémoculture et les prélèvements tissulaires frais sont ensemencés sur 4 tubes-bijou et centrifugés sur culture cellulaire Vero, (*Rickettsia*, *Coxiella*), cellules endothéliales (*Bartonella*) ou lignée granulocytaire HL 60 (*Ehrlichia*) ainsi que sur gélose à 5% de sang de mouton et gélose BCYE (*Bartonella/Afipia*). L'ensemencement pour recherche de *Bartonella* est précédé d'une congélation/décongélation du prélèvement. Les milieux sont incubés à 37°C sous une atmosphère enrichie en 5% de CO_2 et conservés 6 semaines. Sur gélose, les colonies de *Bartonella* apparaissent en 2 - 6 semaines, l'identification présumptive repose sur l'observation des bacilles incurvés, à Gram négatif, oxydase et catalase négatives. En culture cellulaire, *Rickettsia* et *Coxiella* peuvent donner un effet cytopathogène, la recherche de bactérie intracellulaire est effectuée hebdomadairement après coloration à l'acridine orange et coloration de Gimenez. Les isolats sont mis en culture cellulaire et cultivés sur gélose pour *Bartonella* et *Afipia*.

4- Identification

L'identification des souches de *Bartonella* spp. et *Afipia* spp. est possible par analyse des acides gras de paroi par chromatographie en phase gazeuse. Des anticorps monoclonaux sont disponibles pour l'identification des souches de *Rickettsia* groupe boutonneux et groupe typhus, *Orientia*, *Ehrlichia* et *Bartonella* spp. En pratique, ce sont les outils de biologie moléculaire qui apportent l'identification de certitude, basée sur l'amplification génique (PCR) suivie d'une analyse des profils de microrestriction ou de séquençage. L'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S permet d'identifier la plupart des souches. Les isolats de *Rickettsia* seront identifiés par l'analyse de la séquence du gène *gltA* (codant la citrate-synthase) et de *rompA* (codant l'antigène membranaire OmpA), les isolats de *Bartonella* par le gène *gltA* et les souches de *Coxiella burnetii* par les gènes *sod* ou *trans*. Ces outils peuvent être utilisés pour la détection de ces bactéries sur des prélèvements uniquement en vue d'orientation diagnostique.

6• Interprétation des résultats

Concernant les *Rickettsia*, les résultats de la sérologie sont interprétés dans le cadre d'un score diagnostique. Au Centre de Référence, un titre en immunofluorescence IgG 1 : 128 et IgM 1 : 64 est significatif. Au cours de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, 100% des patients sont séropositifs au 30^e

jour seulement. Par ailleurs, il existe une antigénicité croisée entre les espèces du groupe boutonneux et avec le groupe typhus, rendant l'identification d'espèce impossible par la seule immunofluorescence.

La sérologie par immunofluorescence après absorption croisée du sérum et son analyse en immunoblot permettent de préciser l'espèce rickettsienne responsable de la séropositivité. *Coxiella burnetii* présente une variation de phase antigénique. La présence d'anticorps anti-phase II IgT 1 : 200, IgM 1 : 50, signe un contact avec *C. burnetii*. La présence d'anticorps IgT anti-phase II 1 : 1.600 ou d'anticorps anti-phase I IgG 1 : 800 traduit une forme chronique d'infection à *C. burnetii*. Concernant *Ehrlichia*, le titre signification est en cours de détermination. Concernant *Bartonella*, un titre d'IgG 1 : 200 est significatif ; un titre d'IgG 1 : 1.600 a une valeur prédictive positive de 90 % dans l'endocardite. Il existe une variation d'antigénicité des souches de *Bartonella henselae*. L'isolement d'une de ces bactéries d'un prélèvement a toujours une signification pathologique chez l'homme.

Bibliographie

- EREMEEVA M., BALAYEVA N., RAOULT D. Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus : comparison of complement fixation reaction, weil-felix test, microimmunofluorescence and western immunoblotting. Clin. Diag. Lab. Immunol., 1994, 1 : 318-324.
- RAOULT D., TISSOT DUPONT H., ENEA MUTILLOD M. Positive predictive value of *Rochalimaea henselae* antibodies in the diagnostic of cat scratch disease (CSD). Clin. Infect. Dis., 1994, 19 : 335.
- TISSOT DUPONT H., THIRION X., RAOULT D. Q fever serology : cut-off determination for microimmunofluorescence. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1994, 1 : 189-196.
- LA SCOLA B., RAOULT D. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells : a 6 years follow-up. J. Clin. Microbiol., 1996, 34 : 2722-2727.
- LA SCOLA B., RAOULT D. Laboratory diagnosis of rickettsioses : current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J. Clin. Microbiol., 1997, 35 : 2715-2727.

