

كلية
الطب
بصفاقس

LABORATOIRE DE RECHERCHE
MICROORGANISMES & PATHOLOGIE HUMAINE



PATHOLOGIE D'INOCULATION: BACTERIES RESPONSABLES ET MOYENS DIAGNOSTIQUES

DR ABIR ZNAZEN

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

CHU HABIB BOURGUIBA SFAX

COURS COLLEGE: PATHOLOGIE D'INOCULATION

Sfax, LE 05/02/10

INTRODUCTION

Pathologie d'inoculation

Agents pathogènes

Modes de transmission

bactéries:

- *Pasteurella*
- *Francisella tularensis*
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- Infections à anaérobies
- Leptospires
- *Borrelia*
- Sodoku
- Rickettsies
- Bartonelles

Virus:

- Rage
- Flavivirus

- Morsures
- Piqûres
- Blessures

4 situations:

1. Piqûre de tique:

- ♦ Rickettsioses: FBM/TM
- ♦ Maladie de Lyme: *Borrelia burgdorferi*

2. Poux:

- ♦ Typhus endémique
- ♦ Fièvre des tranchées: *Bartonella quintana*
- ♦ Fièvres récurrentes: *Borrelia recurrentis*

3. Morsure:

- ♦ Pasteurollose: *Pasteurella multocida*
- ♦ Les infections à anaérobies et à Streptocoques
- ♦ Sodoku

4. Excoriation:

- ♦ Rouget du porc: *Erysipelothrix*
- ♦ Tularémie: *Francisella tularensis*
- ♦ Leptospirose: *Leptospira*
- ♦ Maladie de griffe du chat: *Bartonella henselae*

BORRELIA

Ordre:

Spirochetales

Famille:

Spirochetaceae

Leptospiraceae

Treponema

Brachyspira

Turneria

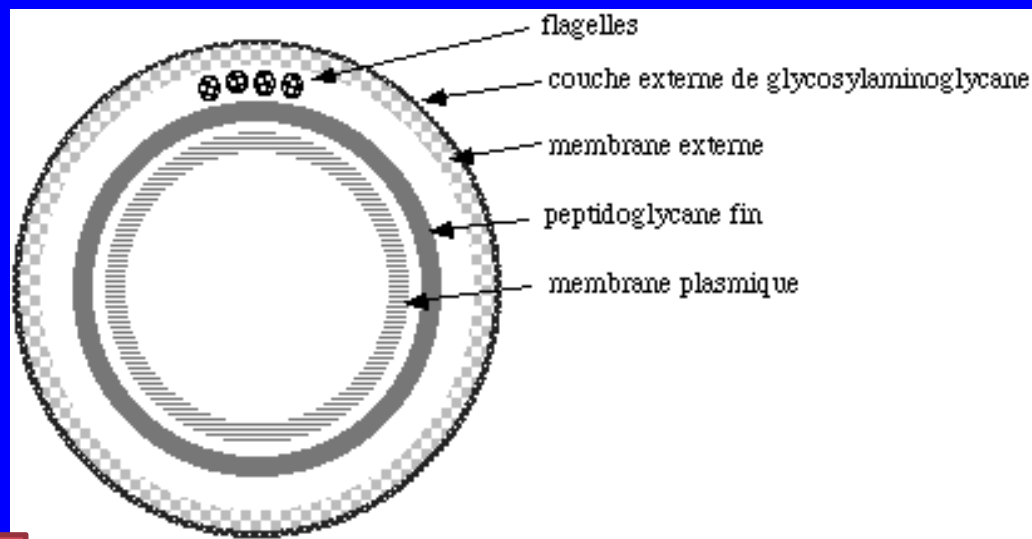
Leptonema

Borrelia

Leptospira

Spirochètes

- ◆ Bactéries spiralées, caractérisées par :
 - * forme hélicoïdales
 - * mobilité caractéristique (déplacements, flexions...) due à un appareil locomoteur interne encore appelé flagelles périplasmiques
- ◆ Très répandues dans la nature

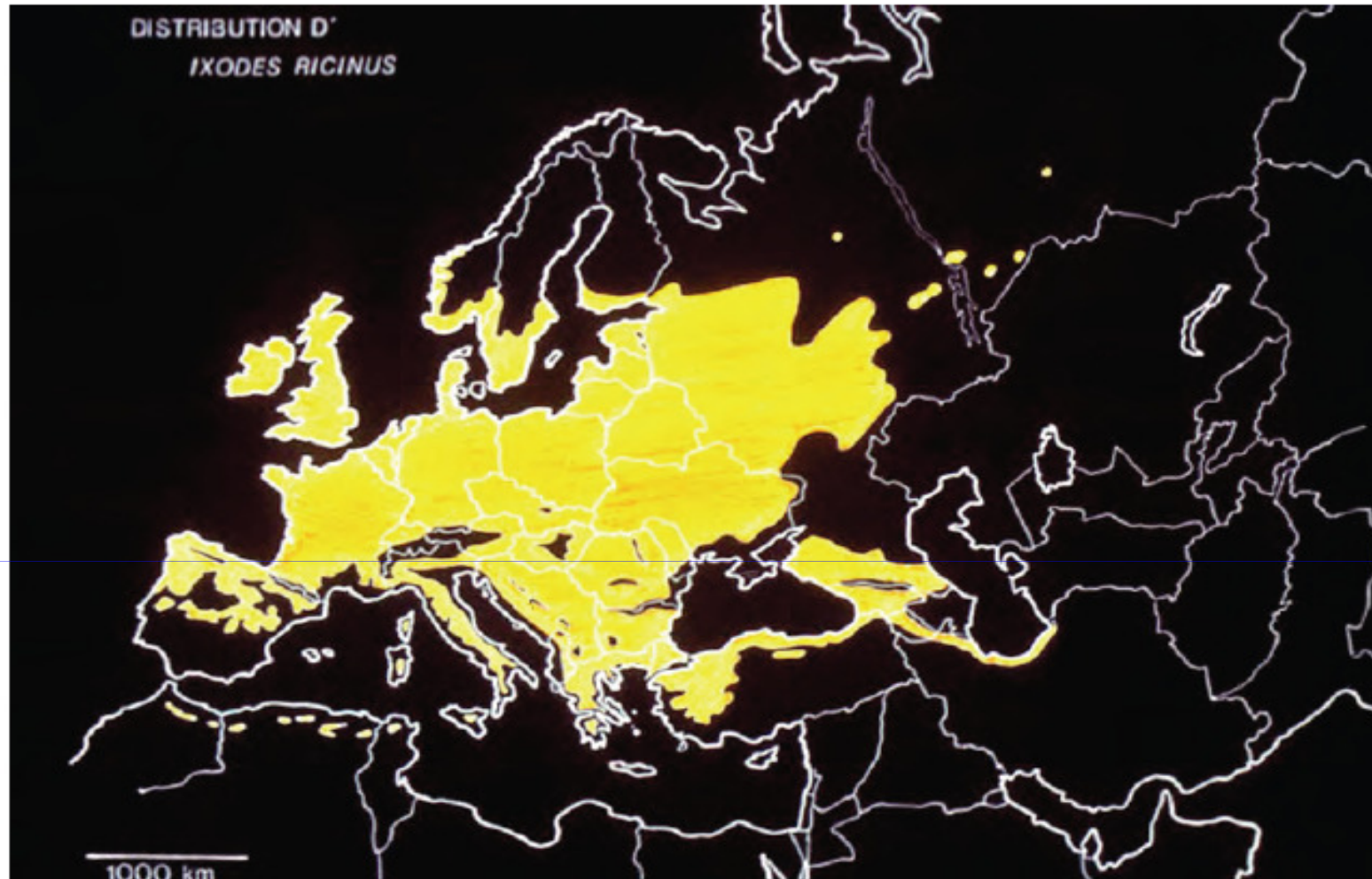


- ◆ *Borrelia*:
 - ◆ Structure:
 - ◆ membrane externe à laquelle sont attachées des protéines
 - ◆ Pas de LPS
 - ◆ 7 à 30 flagelles périplasmiques
 - ◆ Espèces pathogènes:
 - ◆ Maladie de Lyme: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. garinii*, *B. afzelii*
 - ◆ Les fièvres récurrentes: *Borrelia recurrentis*, *B. duttoni*, *B. anserina*

La maladie de Lyme



Photo : *Ixodes ricinus* (adultes femelle et mâle, nymphe, larve)



**Figure 1 : Distribution géographique d'*Ixodes ricinus*,
tique vecteur de la borréliose de Lyme en Europe**

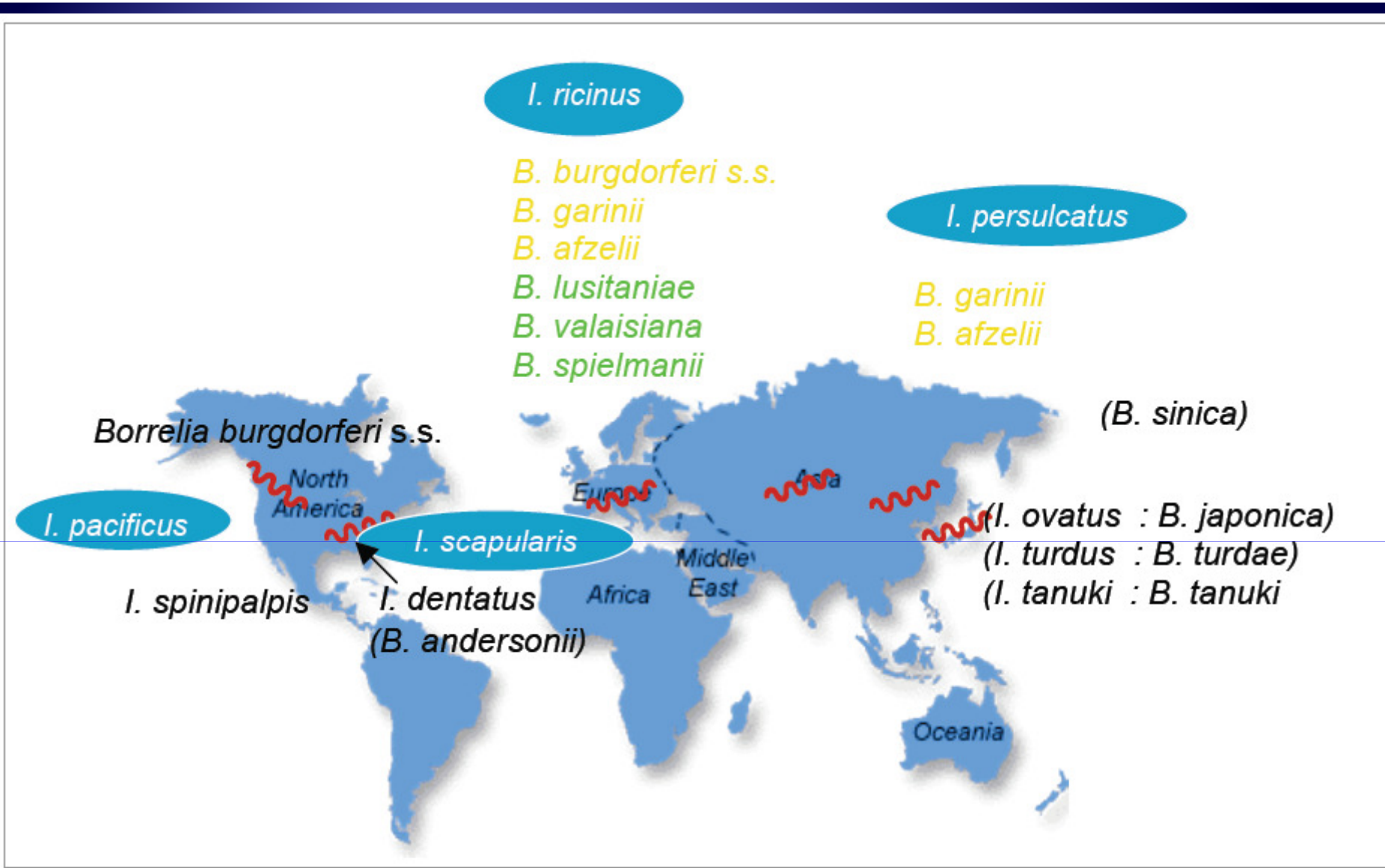


Figure 2 : Répartition des différentes espèces de *Borrelia burgdorferi sensu lato* dans le monde

Characterization of *Borrelia lusitaniae* Isolates Collected in Tunisia and Morocco

Hend Younsi,¹† M'Hammed Sarih,²† Fatima Jouada,³ Edmond Godfroid,⁴
Lise Gern,³ Ali Bouattour,¹ Guy Baranton,⁵ and Daniele Postic^{5*}

*Institut Pasteur, Tunis, Tunisia*¹; *Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco*²; *Institut de Zoologie, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland*³; *Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium*⁴; and *Institut Pasteur, Paris, France*⁵

Received 29 March 2004/Returned for modification 17 October 2004/Accepted 7 November 2004

Borrelia lusitaniae is a species within the complex *Borrelia burgdorferi* sensu lato and is infrequently isolated in Europe. In contrast, this species is by far the most predominant in North Africa and in Portugal. In this study, we analyzed the genetic diversity, at several loci, of a large population of isolates from free-living *Ixodes ricinus* ticks collected in Tunisia and Morocco. We found a moderate diversity of the whole genome by using pulsed-field gel electrophoresis as well as in the *ospA* gene sequences, compared to a high level of strain homogeneity in the small noncoding ribosomal spacer. In contrast, a high diversity of this locus has been previously reported for Portuguese isolates. We hypothesize that *B. lusitaniae* strains isolated in North Africa constitute a clone of Portuguese origin.

Phases cliniques

- ◆ Stade primaire : érythème chronique migrant



- ◆ Stade secondaire (en absence de traitement):
 - * Atteinte neuro-méningée, articulaire, cardiaque.
- ◆ Stade tertiaire : manifestations focalisée

Diagnostic microbiologique de la maladie de Lyme

Diagnostic direct:
culture
PCR

Diagnostic indirect:
sérologie

Culture et PCR

◆ Prélèvements:

- ◆ Biopsie cutanée
- ◆ liquide articulaire/ biopsie synoviale
- ◆ LCR
- ◆ Sang et urines: à proscrire++

◆ Culture:

- ◆ BSK II: acides aminés, facteurs de croissance, SAB, sérum de lapin
- ◆ Sélectif: rifampicine, fosfomycine (cocktail Sigma)
- ◆ Incubation à 30-33°
- ◆ Révélation : microscopie à fond noire
=> morphologie + mobilité

Culture et PCR

◆ PCR:

- ◆ Gènes cibles:
 - ◆ Protéines de surface: *osp A* et *ospB*
 - ◆ Flagelline: *fla*
 - ◆ Gènes ribosomiaux: ADN 16s
 - ◆ Espaces intergéniques
- ◆ Détection+ identification de l'espèce:
 - ◆ Hybridation en milieu liquide
 - ◆ Ribotypage
 - ◆ Séquençage

Sérologie

◆ Prélèvements:

- ◆ sang
- ◆ LCR

◆ Techniques :

- ◆ IFI
- ◆ ELISA
- ◆ Immunoblotting: pas de consensus sur les critères de positivité (nombre et nature des bandes)

Sérologie

- ◆ **Interprétation :**
 - ◆ Réactions croisées!
 - ◆ Érythème migrant: sensibilité IgM + < 50%
 - ◆ Manifestations systémiques (neuroborréliose):
 - ◆ Titre des IgG/ IgM modéré voir négatif => séroconversion (100% des cas à plusieurs semaines)
 - ◆ Confirmation diagnostique: synthèse intrathécale (LCR)
 - ◆ Arthrite de Lyme et ACA: IgG tjrs + et IgM –
 - ◆ Persistance des IgG
 - ◆ Sujet sain +
 - ◆ Pas d'indication pour la surveillance

Recommandations pour le diagnostic biologique en fonction des formes cliniques (grade C)		
Formes cliniques	Indications et résultats des examens essentiels au diagnostic	Examens optionnels**
Érythème migrant	AUCUN examen	AUCUN
Neuroborréliose précoce	<ul style="list-style-type: none"> - Réaction cellulaire lymphocytaire dans le LCR et/ou hyperprotéïnorachie - Sérologie positive dans le LCR, parfois retardée dans le sang - Synthèse intrathécale d'IgG spécifiques* 	<ul style="list-style-type: none"> - Culture et PCR du LCR - Séroconversion ou ascension du titre sérique des IgG
Lymphocytome borrélien	<ul style="list-style-type: none"> - Aspect histologique du lymphocytome - Sérologie positive (sang) 	Culture et PCR du prélèvement cutané
Atteinte cardiaque	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie positive (sang) 	Sur avis spécialisé
Arthrite	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie positive dans le sang à titre habituellement élevé (IgG) - Liquide articulaire inflammatoire 	Culture et PCR sur liquide et/ou tissu synovial
Neuroborréliose chronique	<ul style="list-style-type: none"> - Synthèse intrathécale d'IgG spécifiques* 	Culture et PCR du LCR
Acrodermatite chronique atrophiante	<ul style="list-style-type: none"> - Aspect histologique évocateur - Sérologie positive à titre élevé (IgG) 	Culture et PCR du prélèvement cutané***
Formes oculaires	<ul style="list-style-type: none"> - Sérologie positive - Confirmation par avis spécialisé 	Sur avis spécialisé

Situations au cours desquelles la sérologie n'a pas d'indication (grade C)

- Sujets asymptomatiques
- Dépistage systématique des sujets exposés
- Piqûre de tique sans manifestation clinique
- Érythème migrant typique
- Contrôle sérologique systématique des patients traités

16^e Conférence de Consensus en Thérapeutique Anti-Infectieuse
Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives



**16^e CONFERENCE DE CONSENSUS
EN THERAPEUTIQUE ANTI-INFECTIEUSE**

Borrelia recurrentis

Responsables de **fièvres récurrentes** : infections transmises à l'homme par des arthropodes vecteurs.

Fièvre récurrente à poux

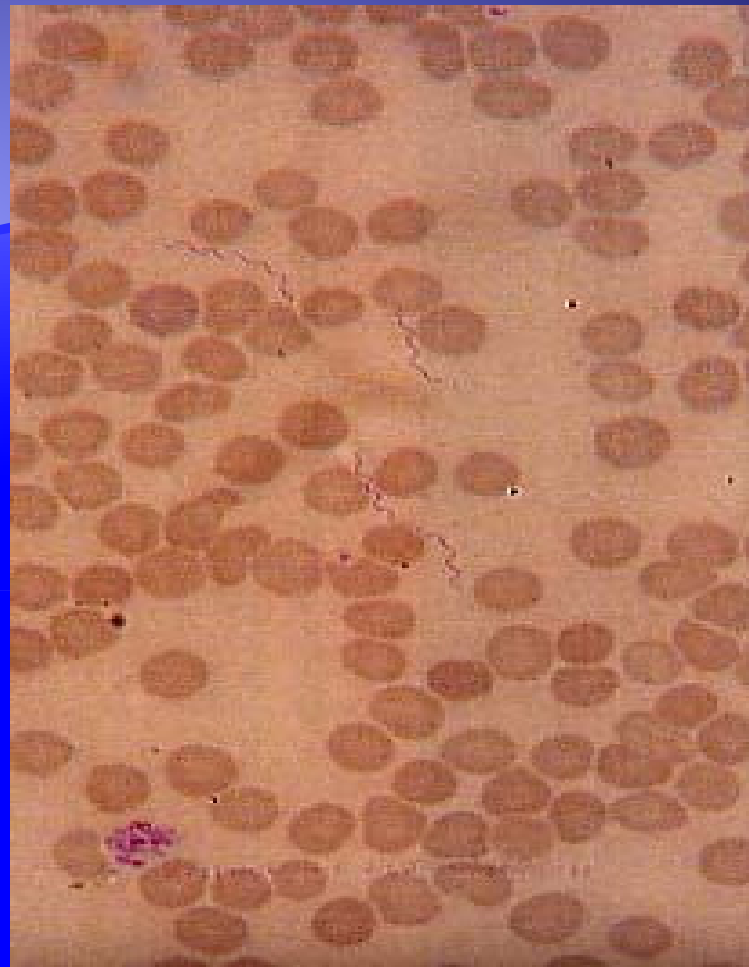


Fièvre récurrente à tiques



Diagnostic

- ◆ Culture: BSK H: sang
- ◆ PCR: sang
- ◆ Variations antigéniques à hautes fréquences: problèmes de sérologie
- ◆ Enzyme GlpQ=> tests spécifiques



Coloration de Giemsa à partir d'un frottis sanguin

Rickettsia

- Bactéries intracellulaires strictes
- Transmission par des tiques, des puces et des poux (vecteur, réservoir)
- Non colorables par le Gram mais Gimenez
- Famille: *Rickettsiaceae* => deux genres: *Rickettsia* et *Orientia*

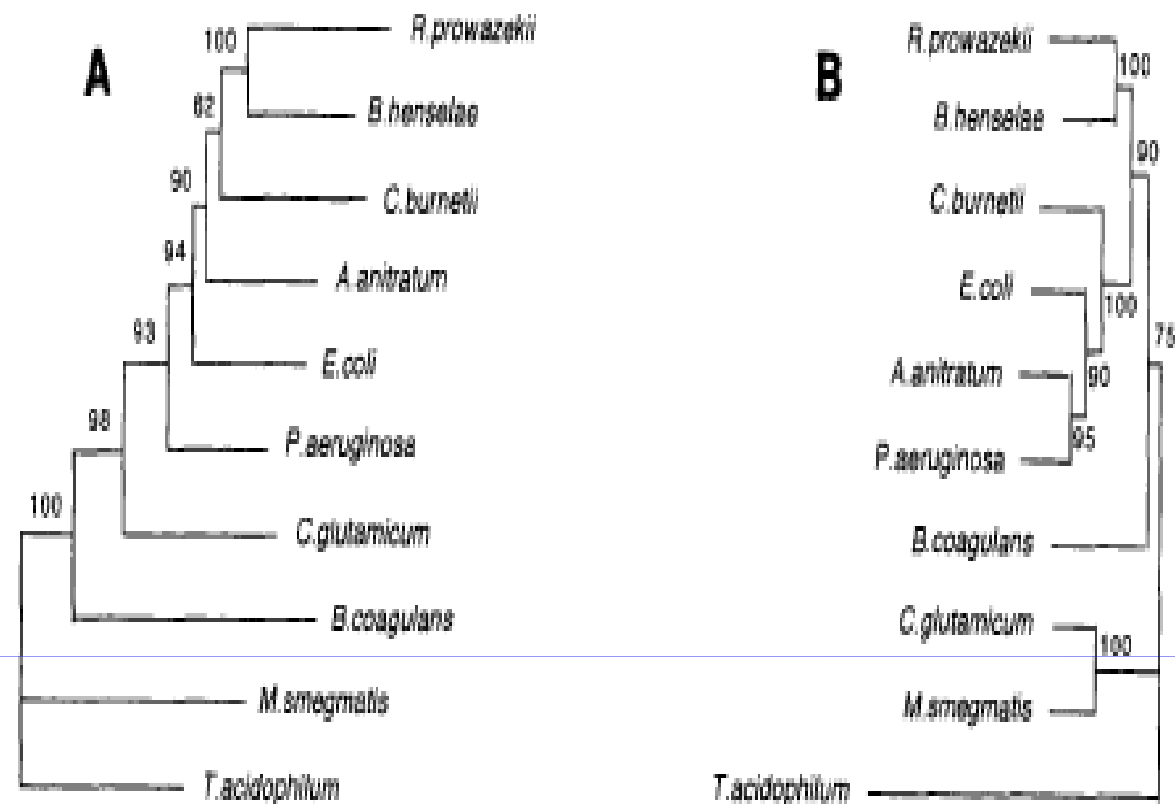


FIG. 2. Distance matrix trees derived from *gltA* data (A) and from data for the 16S rRNA-encoding gene (B). The evolutionary distances were determined by the method of Kimura. These values were used to construct a dendrogram by the neighbor-joining method. The numbers at nodes are the proportions of 100 bootstrap resamplings that support the topology shown. Scale bar = 18% difference in nucleotide sequences. The GenBank accession numbers for the *gltA* sequences included are as follows: *R. prowazekii*, M17149; *Bartonella henselae*, L38987; *Coxiella burnetii*, M36338; *Acinetobacter anitratum*, M33037; *E. coli*, J01619; *P. aeruginosa*, M29728; *Corynebacterium glutamicum*, X66112; *Bacillus coagulans*, M74818; *M. smegmatis*, X60513; and *Thermoplasma acidophilum*, X55282. The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of these bacteria are M21789, M73229, M21291, U10874, M24996, X06684, X80629, D16267, X52922, and M38637, respectively.

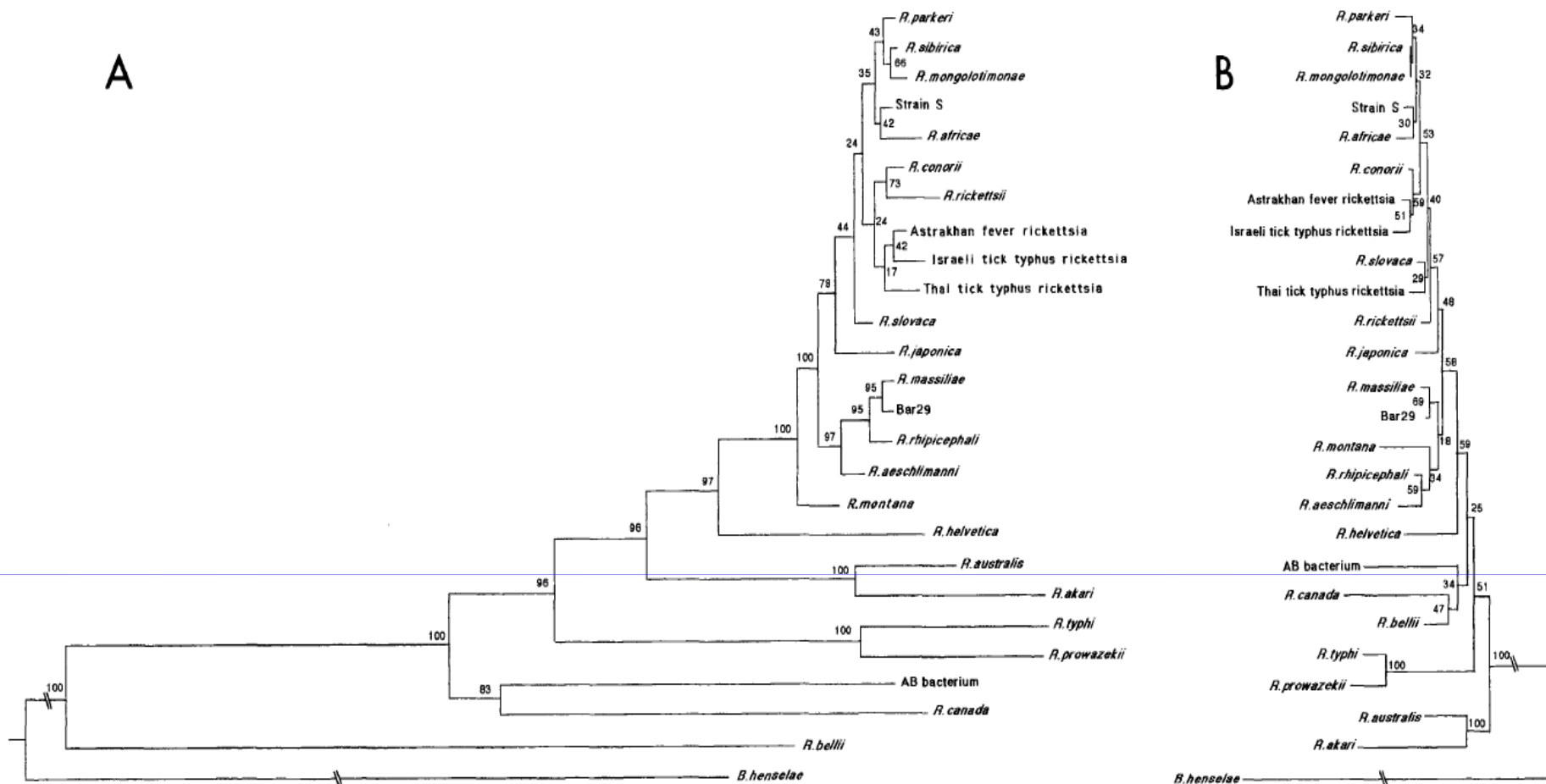


FIG. 1. Comparison of phylogenetic trees for members of the genus *Rickettsia* derived from *gltA* sequence data (A) and from 16S rRNA gene sequence data (B). The evolutionary distance values were determined by the method of Kimura, and the trees were constructed by the neighbor-joining method. Scale bar = 1% difference in nucleotide sequences for *gltA* and for 16S rDNA. The numbers at nodes are the proportions of 100 bootstrap resamplings that support the topology shown. The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences included are as follows: AB bacterium, U04163; *R. prowazekii*, M21789; *R. helvetica*, L36212; *R. japonica*, L36213; *R. massiliae*, L36214; *R. rhipicephali*, L36216; *R. rickettsii*, L36217; *R. sibirica*, L36218; "*R. mongolotimonae*," L36219; Thai tick typhus rickettsia, L36220; *R. typhi*, L36221; Israeli tick typhus rickettsia, L36223; "*R. slovacica*," L36224; *R. bellii*, L36103; *R. canada*, L36104; *R. conorii* Moroccan, L36105; *R. africae*, L36098; *R. akari*, L36099; Astrakhan fever rickettsia, L36100; *R. australis*, L36101; strain Bar 29, L36102; *R. parkeri*, L36673; strain S, U25042; and "*R. aeschlimanni*," U74757. The GenBank accession numbers for *gltA* sequences are given in Materials and Methods.

On les divise en:

le groupe des typhus (*Typhus Group* : TG),
transmis par les poux et les puces



Pediculus humanus



Xenopsylla cheopis



Dermacentor variabilis



Rhipicephalus sanguineus

le groupe des fièvres pourprées (*Spotted Fever Group* : SFG), transmis par les tiques à l'exception de *R. akari*.



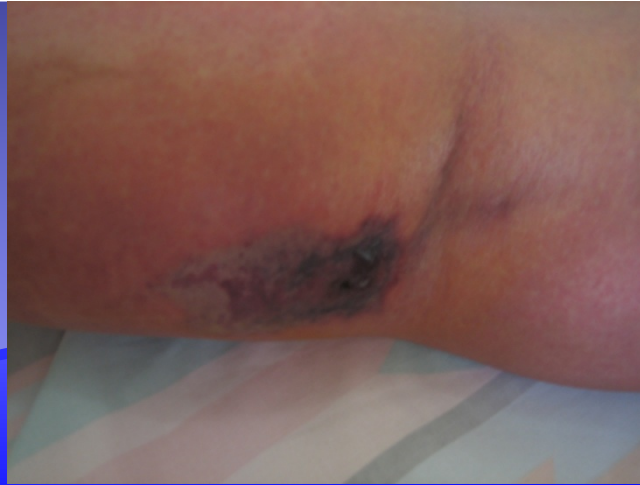
O. tsutsugamushi est désormais exclue du genre *Rickettsia*. Elle est transmise par les larves hexapodes de thrombiculidés (*Leptotrombidium deliense*) et occasionne le typhus des broussailles (*scrub typhus*), endémique dans l'est asiatique et l'ouest de l'Océanie.

Tableau 1 : différences phénotypiques entre les deux groupes de rickettsies : le groupe boutonneux (SFG) et le groupe typhique).

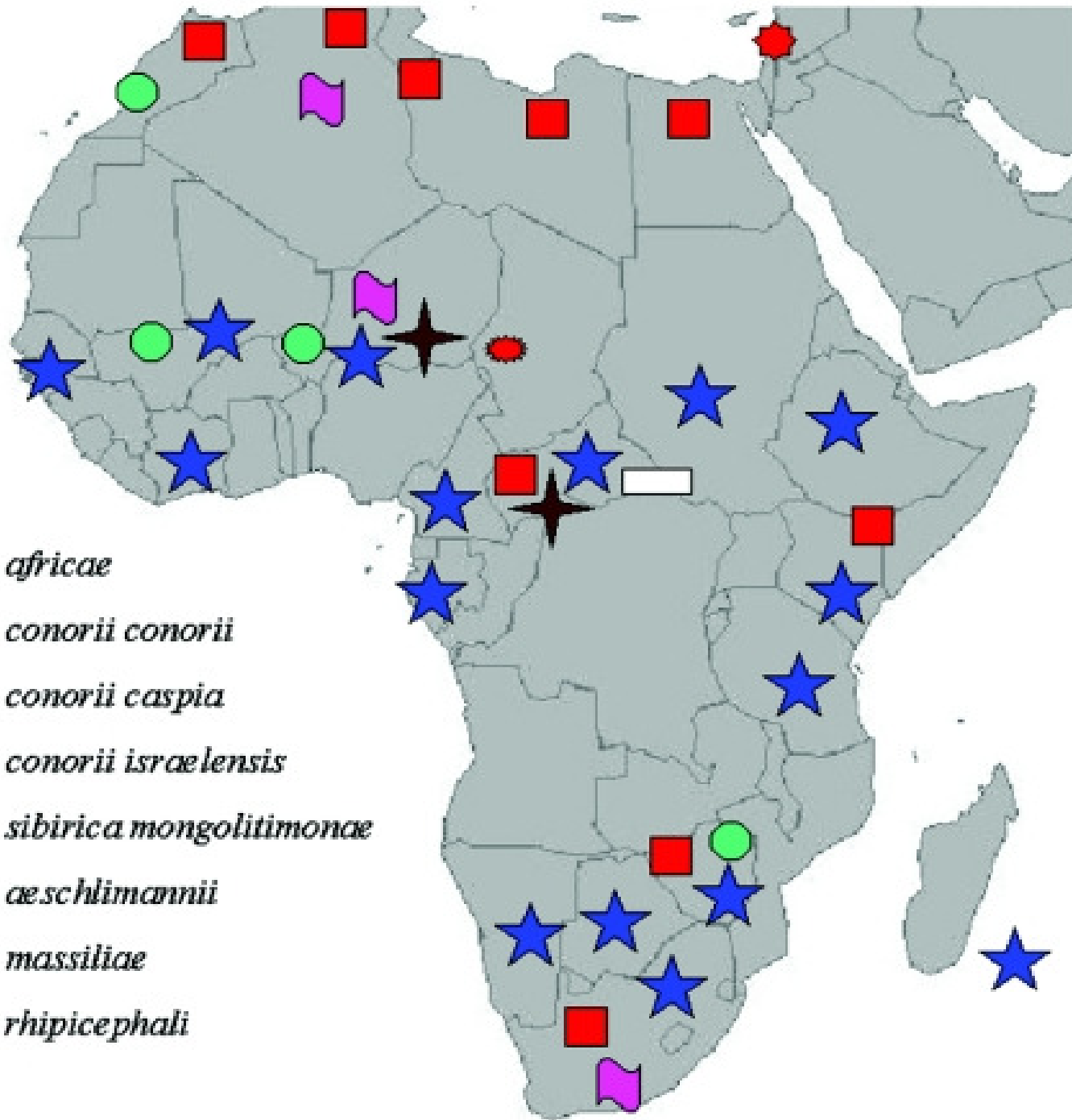
	SFG	TG
vecteurs	Tiques+++	Poux (<i>R. prowazekii</i>)
	Puces (<i>R. felis</i>)	Puces (<i>R. typhi</i>)
	Mîtes (<i>R. akari</i>)	
Température de croissance	35°	32°
%GC	32-33	29
Mobilité intracellulaire	Polymérisation des filaments d'actines jusqu'au noyau	Ne peuvent atteindre le noyau et sont retrouvés uniquement au niveau du cytoplasme.

Rickettsia

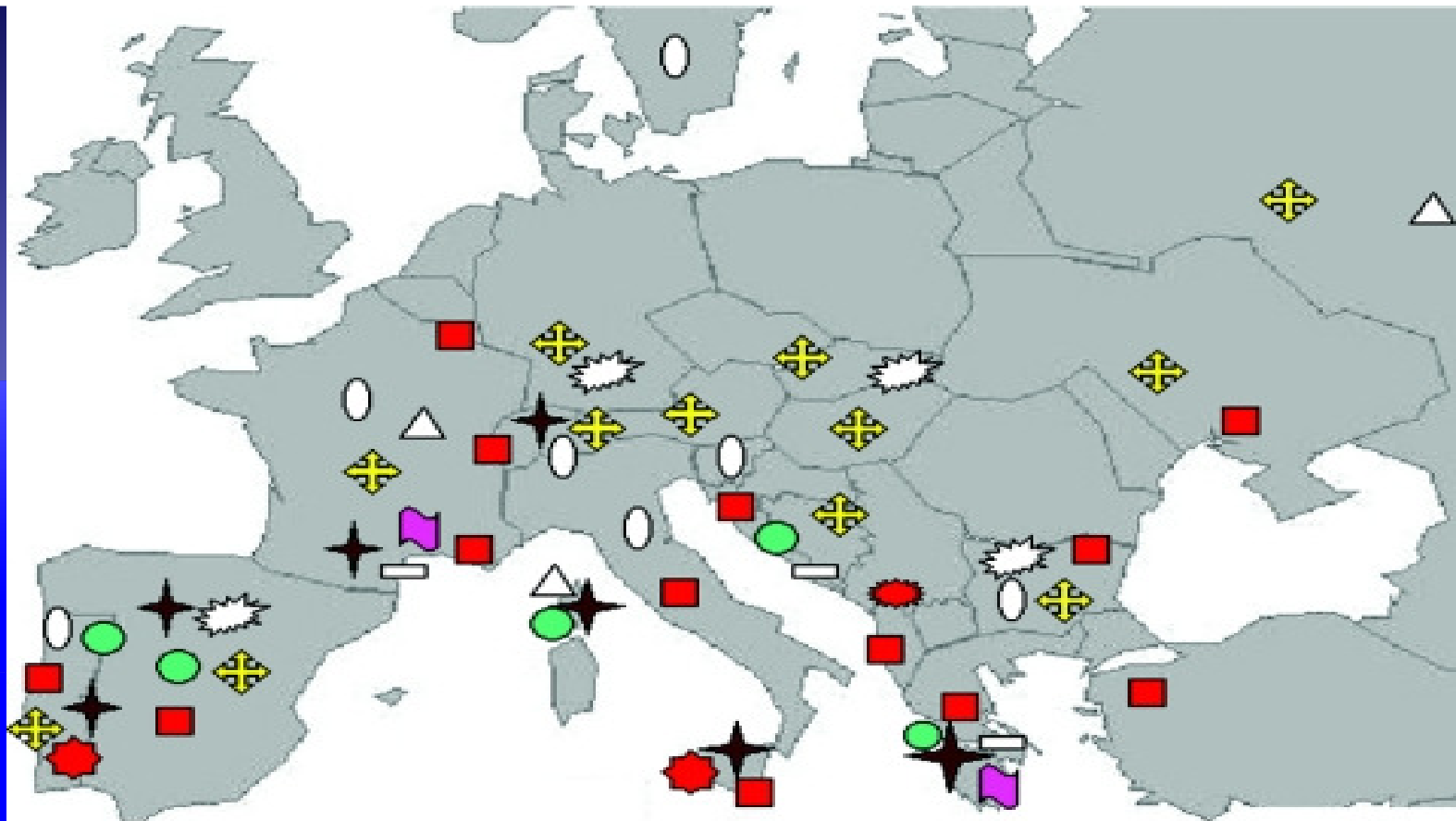
Diagnostic:







- ★ *R. africae*
- *R. conorii conorii*
- *R. conorii caspia*
- ★ *R. conorii israelensis*
- ◊ *R. sibirica mongolitimonae*
- *R. aeschlimannii*
- ★ *R. massiliae*
- *R. rhipicephali*



■ *R. conorii conorii*

★ *R. conorii israelensis*

★ *R. conorii caspia*

■ *R. sibirica
mongolitimonae*

● *R. aeschlimannii*

✚ *R. slovaca*

○ *R. helvetica*

★ *R. massiliae*

★ « *R. monacensis* »
and related rickettsias

□ *R. rhipicephali*

△ *Rickettsia sp. RpA4*

Les typhus

➔ le typhus épidémique

➔ *Rickettsia prowazekii*

➔ vecteur : pou de corps



➔ le typhus murin

➔ *Rickettsia typhi*

➔ vecteur : puce du rat

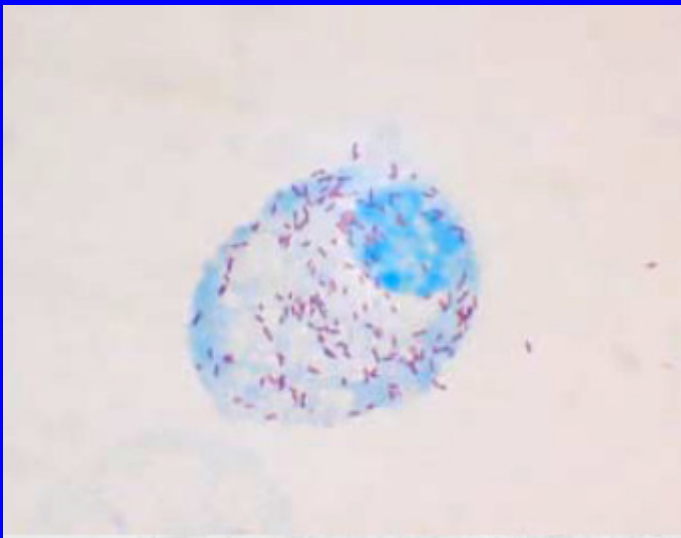


Anomalie biologique	Fréquence (%)
Anémie	12%
Hyperleucocytose à polynucléaires	11 - 28%
Leucopénie	12 - 20%
Thrombopénie	35%
Hyponatrémie	25%
Elévation des TGO	39%
Elévation des PAL	75%
Hyperazotémie	6%

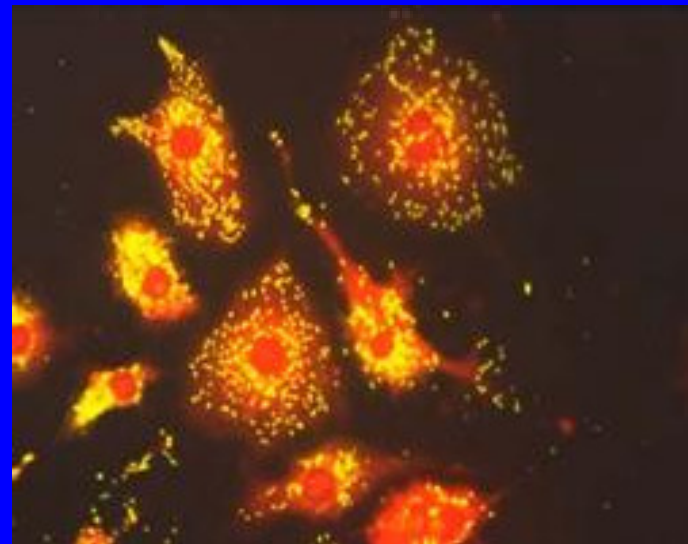
Diagnostic:

▶ Directe :

- Laboratoires spécialisés
- Prélèvements: biopsie cutanée ou sang total
- Culture cellulaire

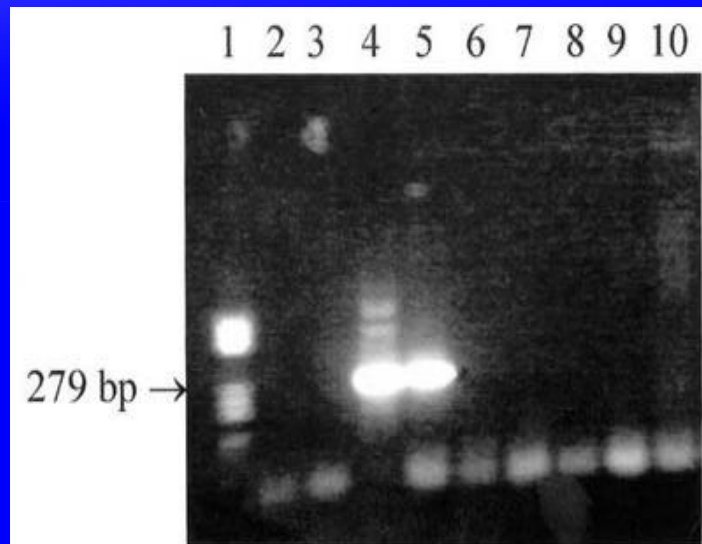


R. Conorii coloré au Gimenez

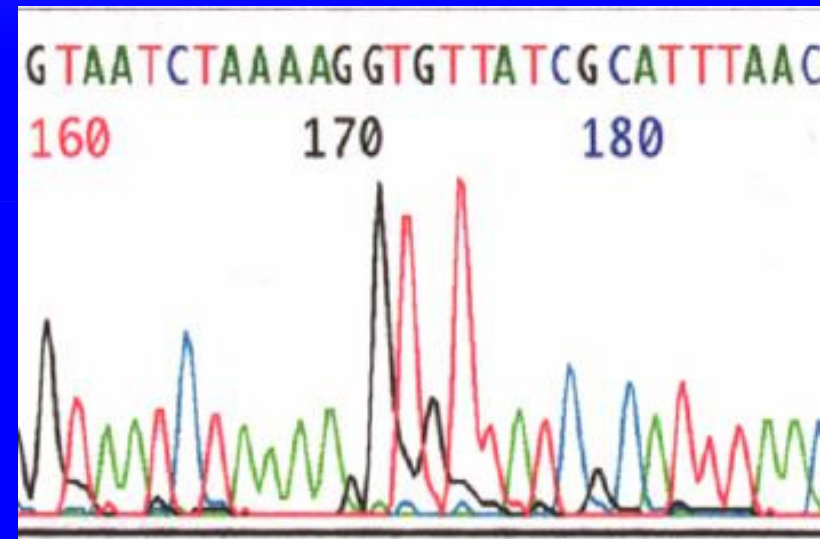


Culture de *R. conorii* subsp. *conorii*
en cellules endothéliales

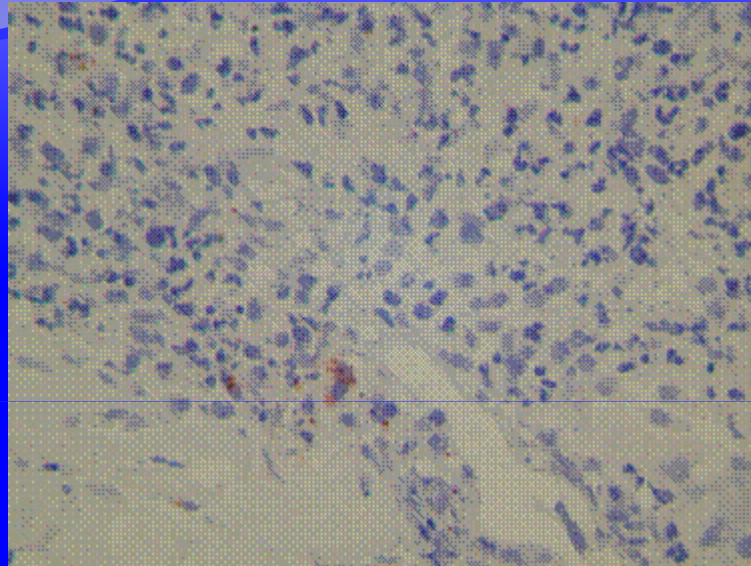
- PCR : plusieurs gènes (*ompA*, *ompB*, *gltA*)



Rechercher de Rickettsia par PCR



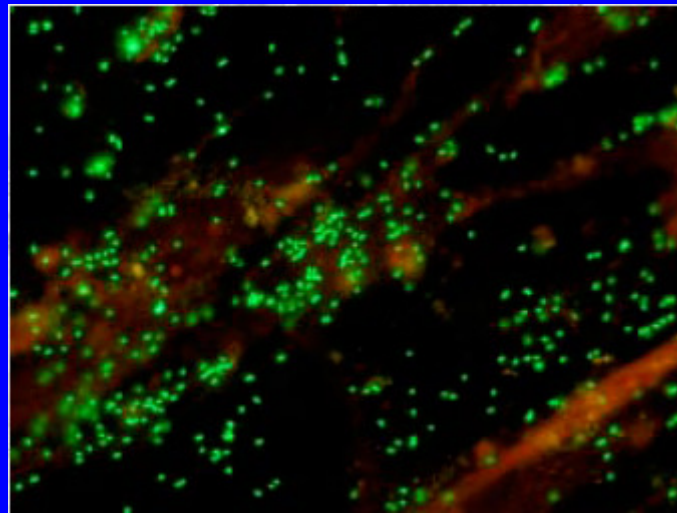
- Immunohistochime



Mise en évidence de *R. conorii subsp. conorii* par immunohistochimie dans une biopsie cutanée

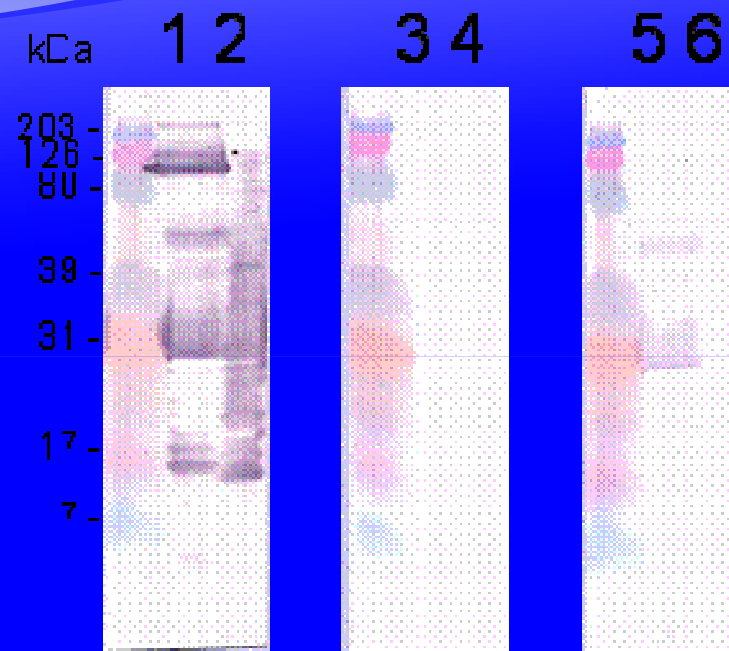
▶ Indirect:+++

- Laboratoire de routine
- Micro-immunofluorescence: technique de référence
- 2 sérum à 15 j d'intervalle avec soit séroconversion soit IgM +, soit élévation significative du titre des AC.
- Réactions croisées+++



► Indirect:

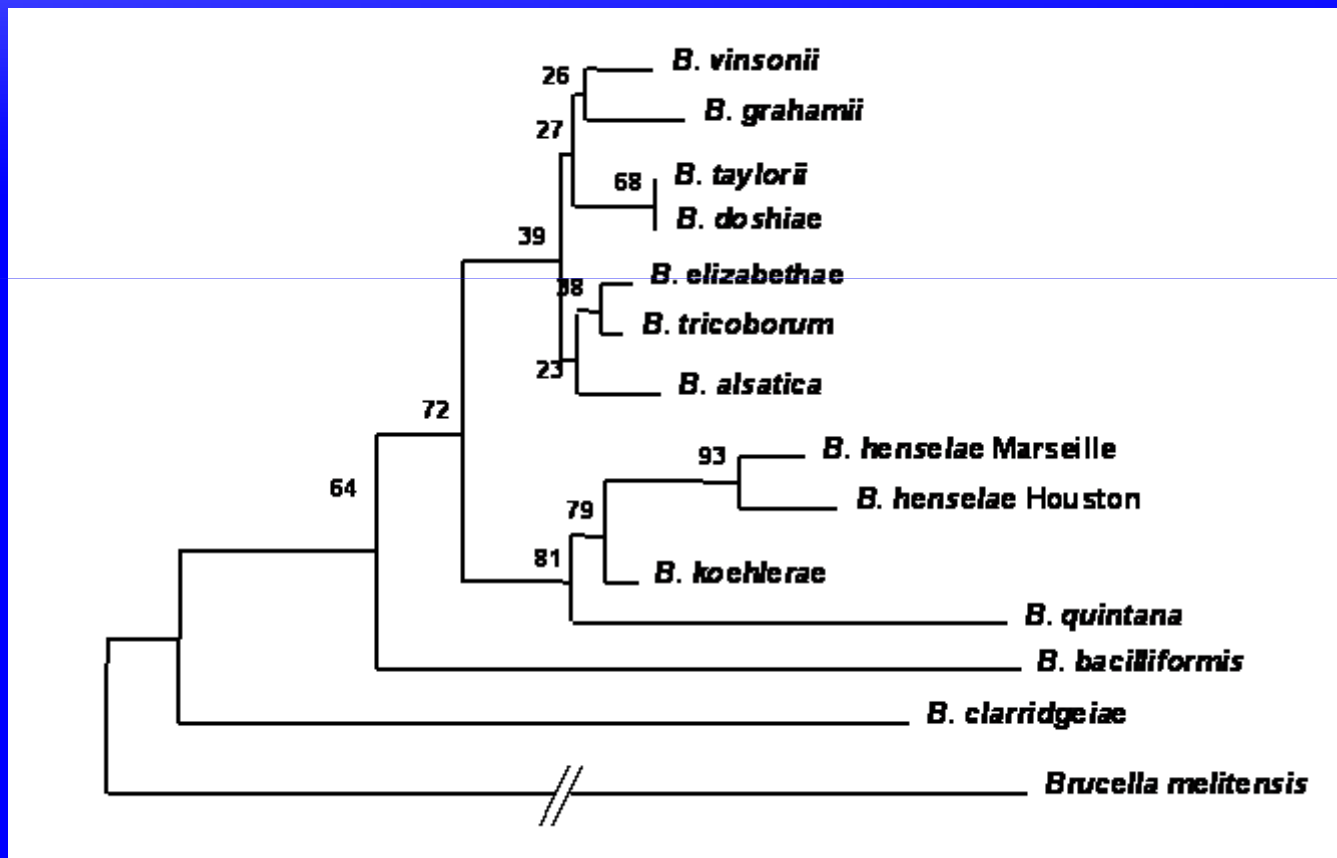
- immunoblott: diagnostic d'espèce



Western blot avant (1,2) et après adsorption croisée avec *R. typhi* (3, 4) et *R. felis* (5, 6). Pistes 1, 3, 5 : antigène *R. typhi* ; pistes 2, 4, 6 : antigène *R. felis*.

BARTONELLA

- Bactéries intracellulaires facultatives
- Petits bacilles à Gram négatif, aérobies, oxydase et catalase négatives.
- 18 espèces: 3 pathogènes (*B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*)

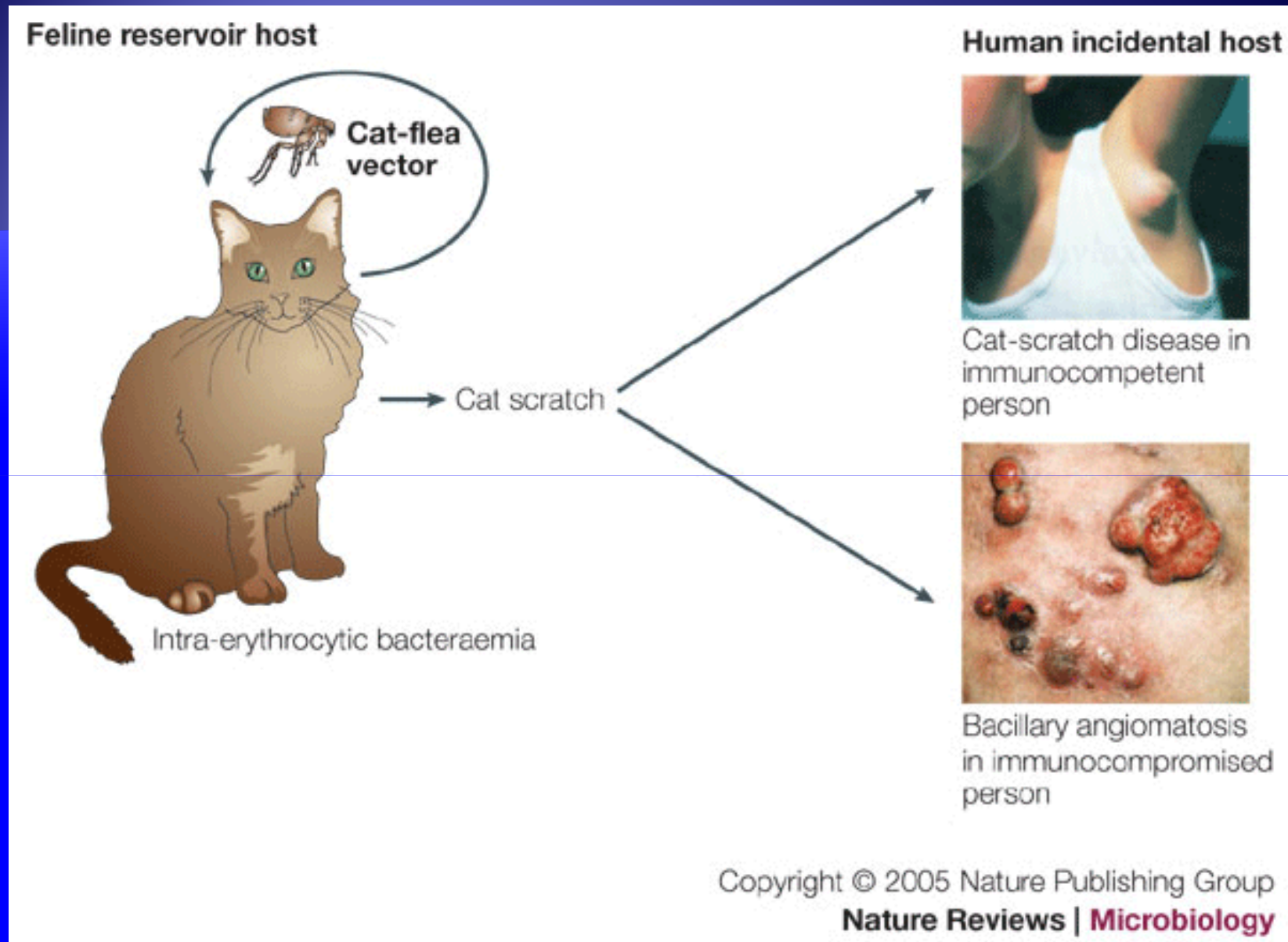


BARTONELLA

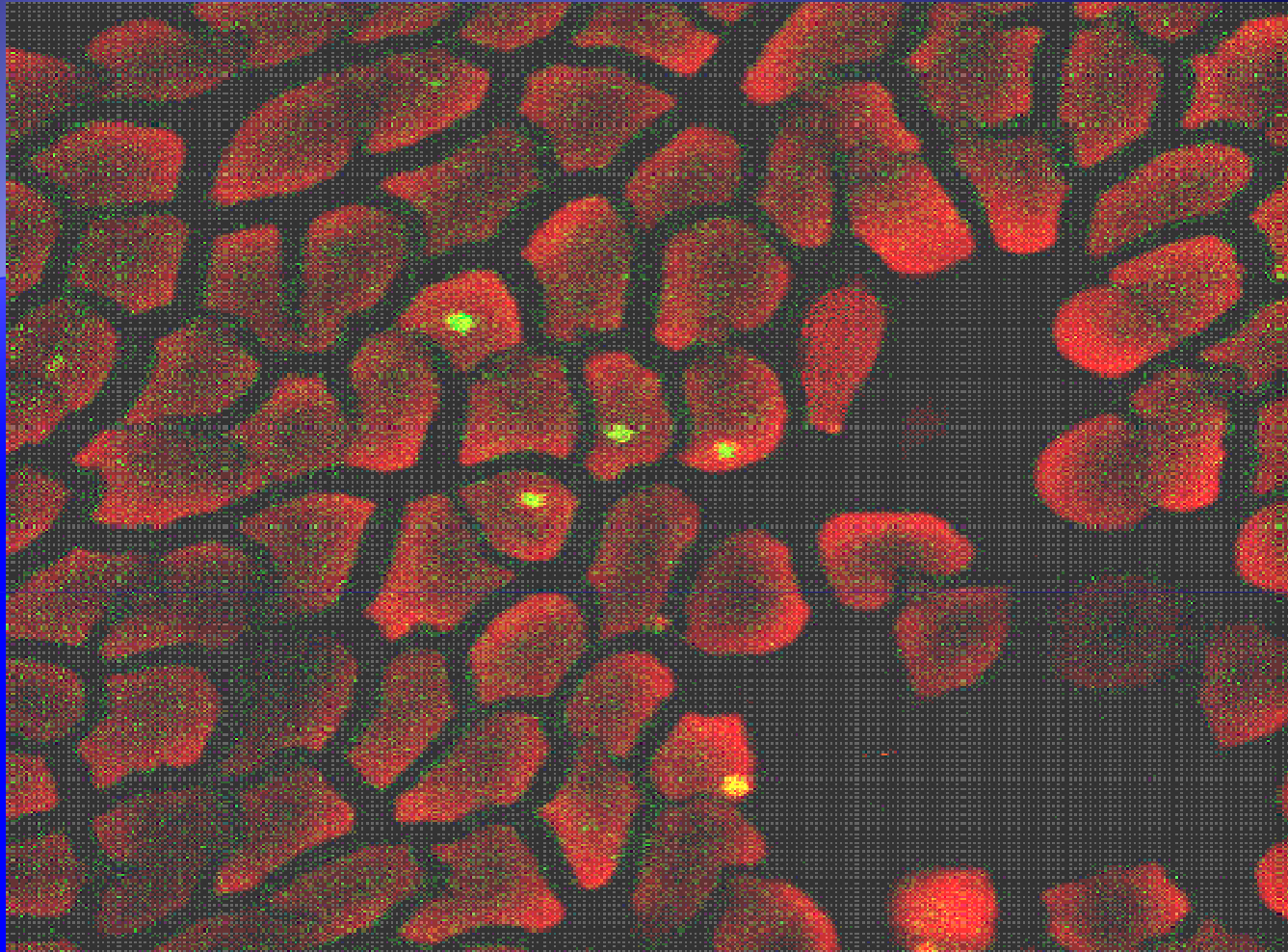
- *B. henselae*: agent de la maladie des griffes du chat.



BARTONELLA



BARTONELLA



Présence de *B. henselae* dans les globules rouges de chat révélés après immunofluorescence directe à l'aide d'un anticorps monoclonal

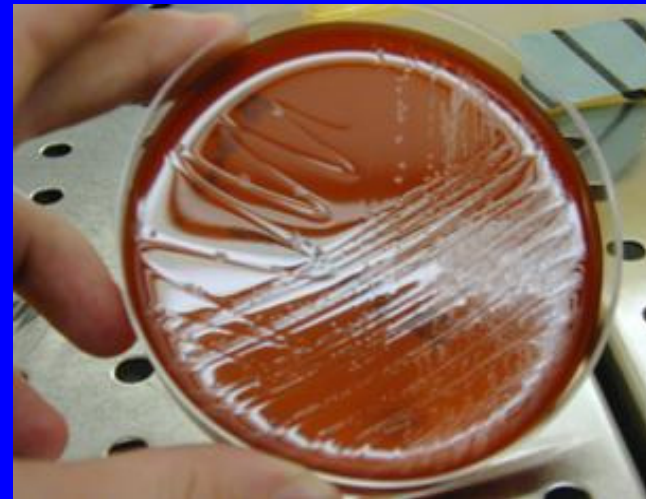
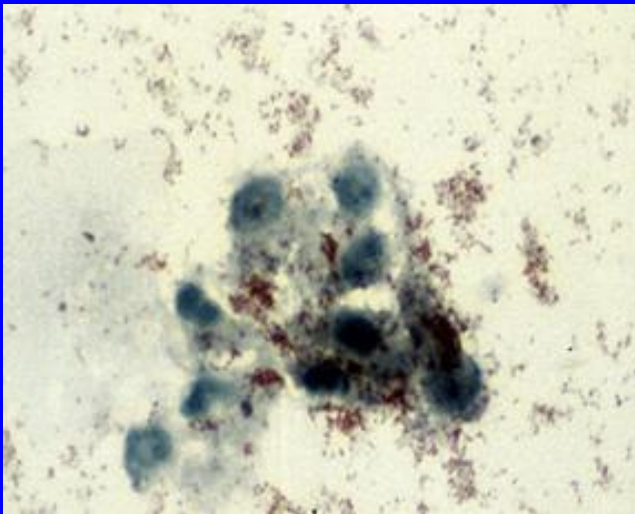
BARTONELLA

- *B. quintana*: endocardites à hémocultures négatives, septicémies chez les SDF, angiomatose bacillaire chez les HIV+



Diagnostic:

- Direct: prélèvements ganglionnaires, valves cardiaques ou sang total
 - Culture cellulaire, culture sur gélose au sang

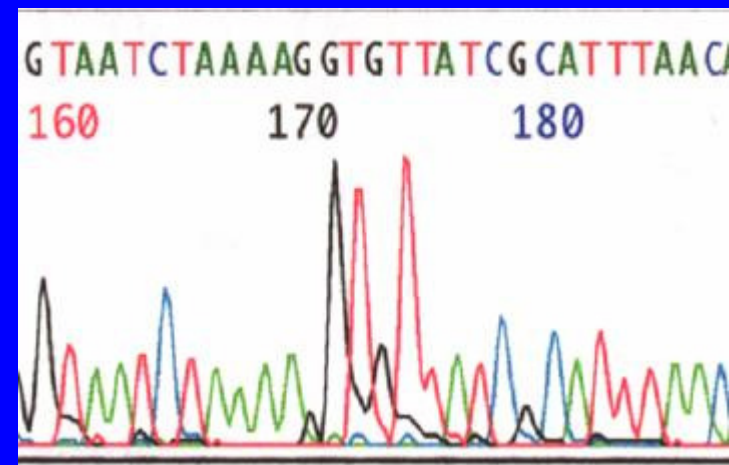


Diagnostic:

- ♦ PCR: plusieurs gènes/trois gènes spécifiques, le gène pap31, le gène groEl et le gène ITS

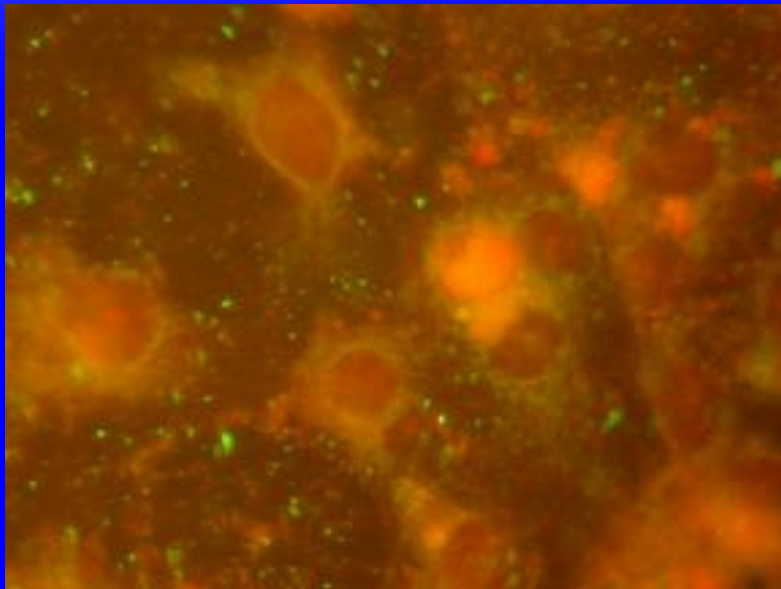


Toujours vérifier par
séquençage

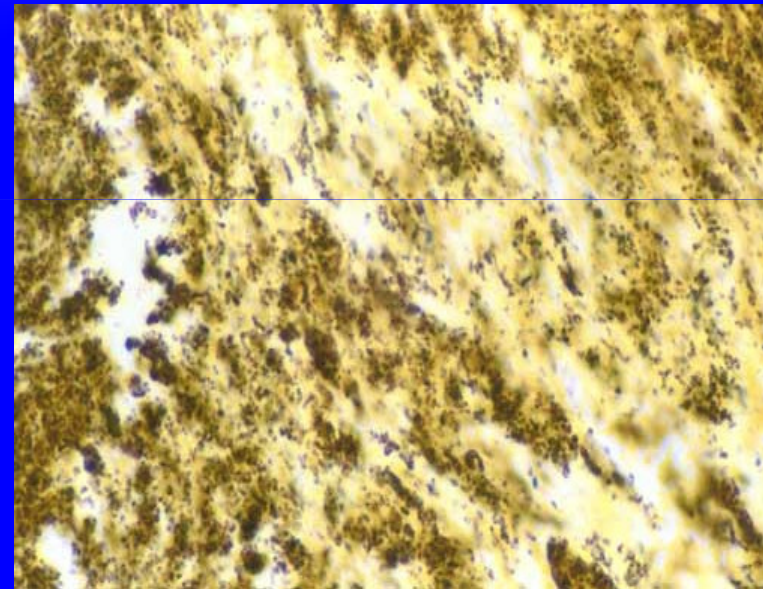


Diagnostic:

- ♦ Immunohistochimie



Immunodétection de *B. henselae* sur frottis ganglionnaire d'un patient atteint de maladie des griffes du chat.



Détection de *Bartonella* dans une valve cardiaque

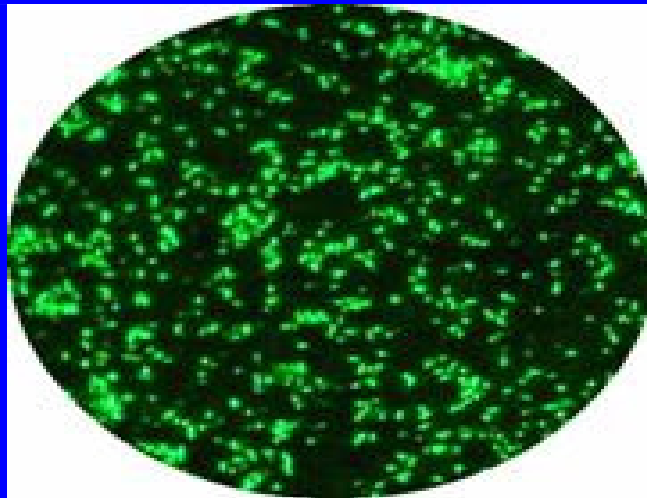
Diagnostic:

● Indirect: ++ sérologie par IFI

Ig totales > 50

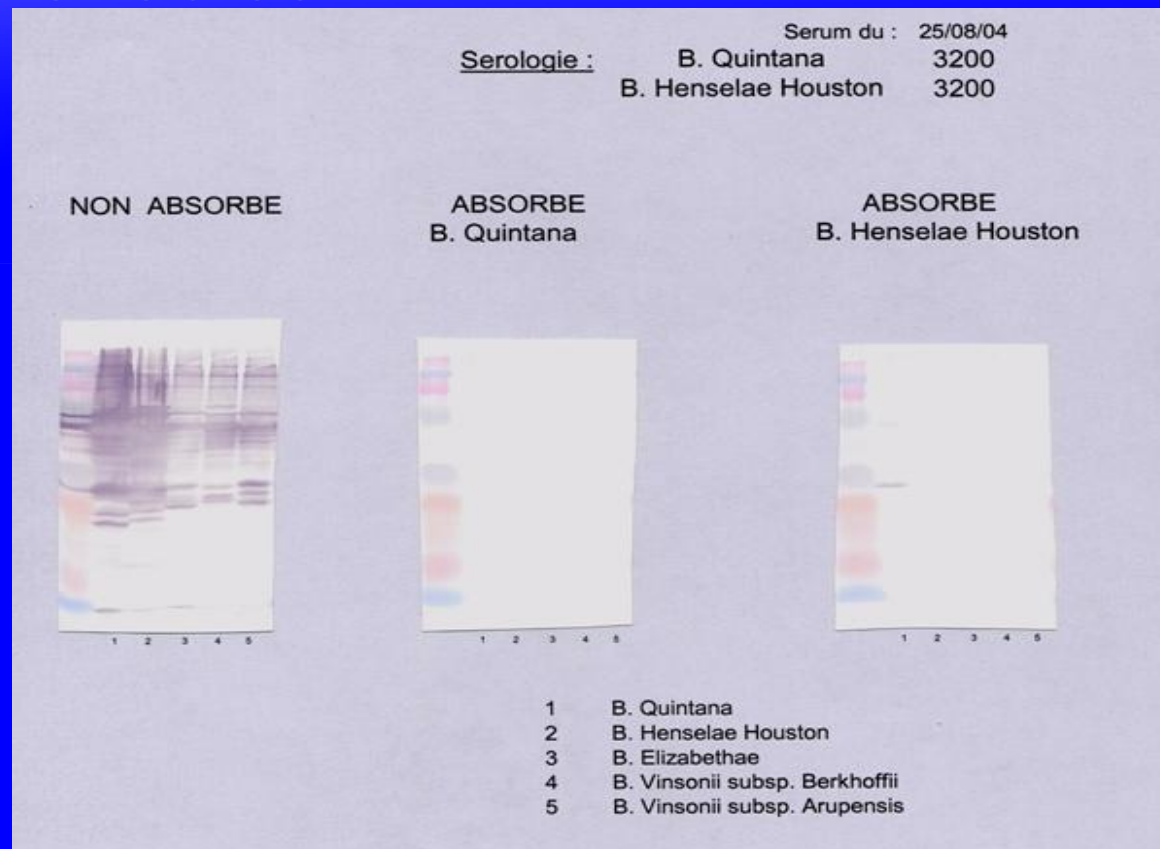
IgM: fugaces

IgT > 800: endocardite



Diagnostic:

● Indirect: confirmation de l'espèce par immunoblot

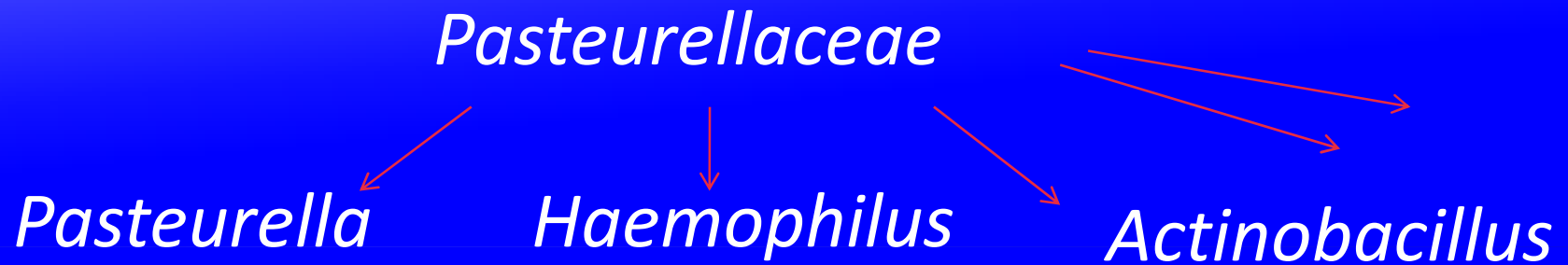


Pus de sérosité



PASTEURELLA

Cocco-bacille à Gram négatif



P. multocida: 3 sous espèces

P. multocida subsp multocida

P. multocida subsp septica

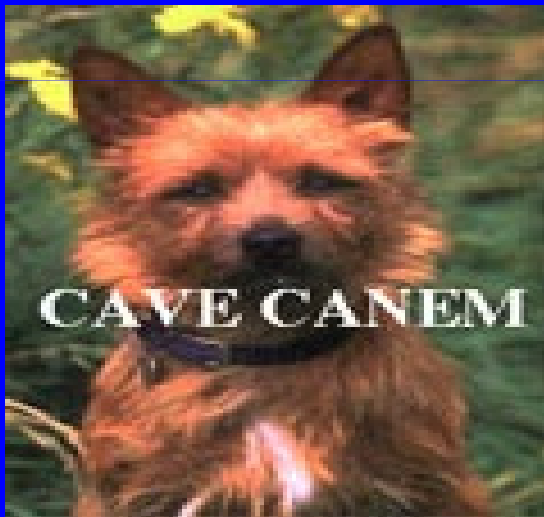
P. multocida subsp gallicida

P. canis

P. dagmatis

P. stomatis

- ◆ Bactérie de la flore salivaire des animaux (chats, chiens)



Clinique

- ◆ Homme : morsure ou griffades animales/ *Pasteurella multocida*++
 - ◆ Pasteurellose d'inoculation :
 - Stade aigu : Incubation 3 à 6 heures → inflammation très douloureuse
 - Stade subaigu ou chronique : tenosynovite, atrophie musculaire, algodystrophie
 - ◆ Pasteurellose généralisée :
 - ◆ sujets immunodéprimés
 - ◆ septicémie, pleuropulmonaire, neuroméningée

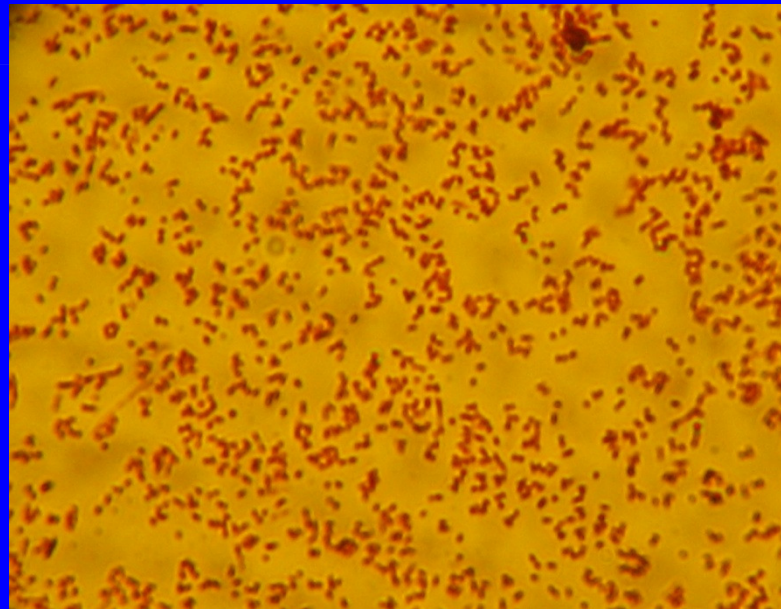
Diagnostic direct :

- ❑ Prélèvements: pus (point d'inoculation. Prélèvement précoce), sang, sécrétions bronchiques
- ❑ Culture: milieux enrichis (sérum, sang), absence de croissance sur BCP, Drigalski, Mac Cokey.

Diagnostic direct :

□ Identification:

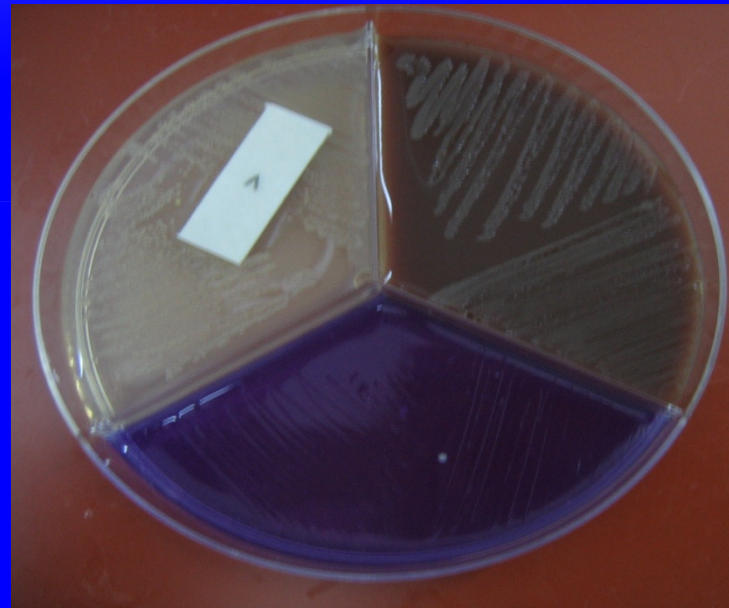
- ✓ Caractères morphologiques: cocobacilles Gram négatif, coloration bipolaire, immobiles, capsulés.



Coloration de GRAM de *Pasteurella multocida*

PASTEURELLA

Caractères culturaux: bactéries aéroanaérobies facultatives (renforcement en microaérophile en VL), T° à 37°. Sur gélose au sang: colonies rondes grisâtres parfois muqueuse qui poussent en 24H



Exigence en facteur V et inhibition par le BCP

- ✓ Caractères biochimiques:
 - oxydase, catalase, nitrate réductase, indole (+)
 - urée, gélatinase, LDC, ADH et H₂S (-)
 - Sensibilité au vibriostatique O₁₃₉

- ✓ Système ApizoE

- Diagnostic indirect: peu d'intérêt

Merci pour votre attention