

DETECTION MOLECULAIRE DE *RICKETTSIA FELIS* ET DE *WOLBACHIA SP.* DANS DES PUCES ET DES POUX DE CHIENS ET DE CHATS EN OUGANDA*

Bernard Davoust^{1,2}, Oleg Mediannikov², Johnson Acon³,
Philippe Parola² et Jean-Lou Marié^{1,2}

RESUME

La technique de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise en œuvre pour détecter des bactéries intracellulaires de la famille des *Anaplasmataceae* (*Rickettsia felis* et *Wolbachia sp.*) dans des puces et des poux infestant des chiens et des chats en Ouganda. Sur 155 puces récoltées, 76,5% contenaient de l'ADN de *R. felis*. Cette bactérie est responsable d'une rickettsiose humaine émergente : la fièvre boutonneuse à puces qui devra être connue des médecins ougandais.

Mots-clés : *Rickettsia felis*, *Wolbachia pipientis*, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Trichodectes canis*, fièvre boutonneuse à puces, Ouganda.

SUMMARY

PCR was used to evidence *Rickettsia felis* and *Wolbachia pipientis* in fleas and lice infesting dogs and cats in Uganda. Since 76.5% of 155 fleas collected from domesticated animals contained DNA from *R. felis*, this bacterium has to be considered by local physicians in the diagnosis of human typhus-like syndrome in Uganda.

Keywords: *Rickettsia felis*, *Wolbachia pipientis*, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Trichodectes canis*, Flea-borne spotted fever, Uganda.



* Texte de la communication écrite présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 20-21 mai 2010

¹ Direction régionale du service de santé des armées de Toulon, France

² Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes UMR 6236 IRD-CNRS, Faculté de médecine, Marseille, France

³ Université Makerere, Faculté de médecine vétérinaire, Kampala, Ouganda

I - INTRODUCTION

Les puces et poux, ectoparasites du chien et du chat, sont des vecteurs reconnus de maladies causées par les bactéries du genre *Rickettsia*, de la famille des *Anaplasmataceae* et du genre *Bartonella*. Peu de données sur

l'épidémiologie de ces agents sont disponibles pour le continent africain. Cette étude vise donc à dépister, en utilisant des méthodes de biologie moléculaire, des agents bactériens vectorisés, en Ouganda, Afrique de l'Est.

II - MATERIEL ET METHODES

1. SUR LE TERRAIN

Des puces et des poux ont été récoltés sur des chiens et chats présentés à la consultation de la faculté vétérinaire de Kampala, en Ouganda, en septembre 2003 (tableau 1). Ils ont été conservés dans de l'alcool à 70°. L'identification réalisée en utilisant des critères

morphologiques a permis la mise en évidence de :

- puces : 81% de *Ctenocephalides canis* et 19% de *C. felis* ;
- poux : *Trichodectes canis*.

Tableau 1

Répartition par espèce-hôte des puces et poux étudiés

	Chiens (n = 38)	Chats (n = 5)	Total
Puces	155	7	162
Poux	17	0	17

2. AU LABORATOIRE

L'extraction de l'ADN des ectoparasites a été mise en œuvre en utilisant le kit QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Allemagne). L'amplification génique (PCR) a été réalisée pour les gènes codant la citrate synthase (*gltA*) pour les bactéries du genre *Rickettsia*, la sous-unité

16S de l'ARN ribosomique pour les bactéries de la famille des *Anaplasmataceae* et l'espace intergénique de l'ARNr 16S/23S pour les bactéries du genre *Bartonella*. Les produits de PCR ont été visualisés et les échantillons positifs ont été purifiés (kit QIAquick PCR purification, Qiagen) et séquencés pour l'identification d'espèce.

III - RESULTATS

Rickettsia felis a été détectée (100% d'identité pour *gltA*) dans 76,5% (70,0%-83,0%) (124/162) des puces de chiens et chats. Aucune rickettsie n'a été mise en évidence dans les poux (tableau 2).

Wolbachia sp. a été détectée dans 63,6% (56,2%-71,0%) (103/162) des puces de chiens

et de chats et 11,8% (1,5%-36,4%) (2/17) des poux de chiens.

Le gène amplifié pourra, sans doute, permettre de caractériser une nouvelle espèce de *Wolbachia*, proche de *W. pipientis*.

Tableau 2
Puces et poux de chiens et de chats d'Ouganda, infectés
par *Rickettsia felis* et *Wolbachia pipientis*

Arthropodes	Hôtes	<i>R. felis</i>	<i>Wolbachia sp.</i>	Co-infections
		Positifs/Total (%)	Positifs/Total (%)	Positifs/Total (%)
Puces	Chiens	118/155 (76,1%)	98/155 (63,2%)	95/155 (61,3%)
Puces	Chats	6/7 (85,7%)	5/7 (71,4%)	5/7 (71,4%)
Puces	Chiens et chats	124/162 (76,5%)	103/162 (63,6%)	100/162 (61,7%)
Poux	Chiens	0/17 (0%)	2/17 (11,8%)	0 (0%)

Le pourcentage de co-infection par *R. felis* et *Wolbachia sp.* est de 61,7% (100/162) sur les puces de chiens et de chats. La proportion de puces infectées par *Wolbachia sp.* est significativement plus élevée parmi les puces infectées par *R. felis* (100/124 soit 80,6%) que parmi les puces non infectées par *R. felis* (3/38 soit 7,9%) ($p < 10^{-6}$).

Le tableau 3 présente la prévalence du nombre de chiens et de chats infestés par au

moins une puce porteuse de *R. felis* et/ou *Wolbachia sp.* Au total, 88,4% des animaux sont parasités par une (ou des) puce(s) porteuse(s) de *R. felis* et 79,1% des animaux par au moins une puce porteuse de *W. pipientis*.

Aucune bactérie du genre *Bartonella* n'a été mise en évidence.

Tableau 3
Chiens et chats d'Ouganda infestés par des puces porteuses
de *Rickettsia felis* et *Wolbachia sp.*

	Animaux avec au moins une puce infectée par <i>R. felis</i>	Animaux avec au moins une puce infectée par <i>Wolbachia sp.</i>
	Nombre/Total (%)	Nombre/Total (%)
Chiens	34/38 (89,4%)	31/38 (81,6%)
Chats	4/5 (80%)	3/5 (60%)
Total	38/43 (88,4%)	34/43 (79,1%)

IV - DISCUSSION

Il s'agit de la première description de *R. felis* en Ouganda.

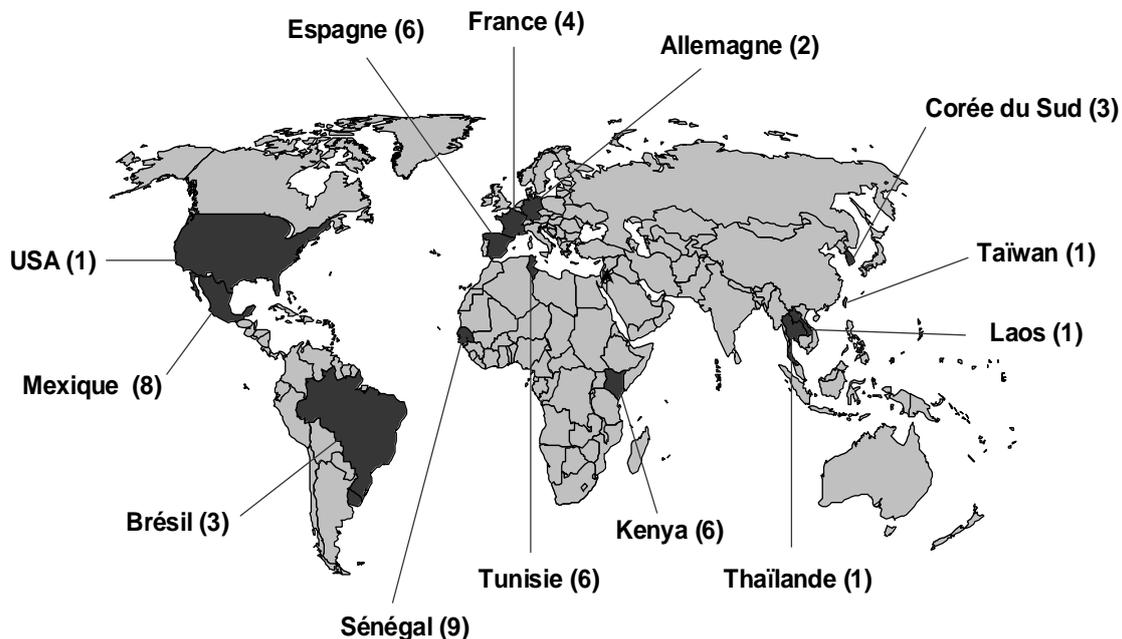
Rickettsia felis est responsable de la fièvre boutonneuse à puces. Le premier cas humain a été identifié en 1994 aux Etats-Unis (Texas) chez un patient présentant des symptômes ressemblant au typhus murin [Schriefer *et al.*, 1994]. Depuis, quelques dizaines de cas seulement ont été diagnostiqués dans le monde, sur les cinq continents (figure 1). Le nombre d'infections humaines pourrait être en réalité beaucoup plus élevé car la

symptomatologie, le plus souvent bénigne, n'incite pas à confirmer le diagnostic en recourant à des examens de laboratoire. De plus, certains cas cliniques peuvent être confondus avec d'autres rickettsioses et même d'autres maladies fébriles. Une revue portant sur 34 cas de fièvre boutonneuse à puces a mis en évidence les symptômes suivants : fièvre (32/34), éruption cutanée, essentiellement maculo-papulaire (24/34), escarre cutanée (4/34), signes nerveux (5/34), signes digestifs (7/34), toux sans pneumonie

(3/34), pneumonie (2/34) [Renvoisé *et al.*, 2009a]. La maladie est le plus souvent bénigne et évolue vers la guérison sans séquelles. Néanmoins, des formes sévères ont été décrites au Mexique avec des atteintes digestives, respiratoires, nerveuses et vasculaires. En 2000, un patient a présenté une douleur abdominale, des nausées et des vomissements ; deux autres patients ont

manifesté une photophobie et un troisième une perte d'audition [Zavala-Velázquez *et al.*, 2000]. Plus récemment, deux autres patients mexicains ont présenté une thrombocytopénie sévère avec une anémie associée à une hémorragie alvéolaire et une conjonctivite hémorragique, une hépatite et une insuffisance respiratoire [Zavala-Castro *et al.*, 2009].

Figure 1

Cas cliniques publiés d'infections humaines à *Rickettsia felis*

Plus récemment, *R. felis* a été identifié dans 4,4% des cas de fièvres d'origine non-palustre au Sénégal [Socolovschi *et al.*, 2010] et dans 3,6% au Kenya [Richards *et al.*, 2010].

La transmission à l'homme s'effectue très probablement par piqûres de puces contaminées ou par contact de déjections de puces avec des lésions cutanées. Toutefois, la transmission de *R. felis* à l'homme depuis les arthropodes n'a pas été encore formellement démontrée [Reif *et al.*, 2008].

R. felis a probablement été découverte chez la puce du chat en 1918 et dénommée alors *R. ctenocephali* (Sikora, 1918). Cette bactérie a été redécouverte par microscopie électronique dans des cellules de l'épithélium intestinal de *Ctenocephalides felis* [Adams *et al.*, 1990]. Le nom de *R. felis* n'a été proposé qu'en 1996, à

la suite des premiers essais de culture aux Etats-Unis. Cependant, la description définitive et la caractérisation de l'agent ont été réalisées, plus tard, à Marseille [Lascola *et al.*, 2002]. Au cours des quinze dernières années, la présence d'ADN de *R. felis* a été rapportée dans un nombre croissant d'arthropodes, essentiellement des puces, mais aussi des tiques et des trombiculidés. Dans la majorité des cas, c'est la puce du chat, *Ctenocephalides felis*, qui est impliquée dans l'épidémiologie avec des taux d'infection pouvant être très élevés. *Ctenocephalides canis*, qui est très proche et parfois référencée comme une sous-espèce de *C. felis*, et la puce du hérisson, *Archeopsylla erinacei*, sont également souvent infectées. L'infection chez les arthropodes a été mise en évidence sur les cinq continents et sa distribution est

cosmopolite à l'exception des régions nordiques les plus froides, comme la Scandinavie. *R. felis* a été révélée par la microscopie électronique dans les cellules de l'épithélium intestinal, les ovaires et d'autres organes de la puce *C. felis* [Adams *et al.*, 1990]. Sa découverte récente dans les glandes salivaires de *C. felis* suggère mais ne prouve pas une transmission par la salive lors des piqûres [Macaluso *et al.*, 2008].

Au laboratoire, la transmission transovarienne de *R. felis* chez la puce *C. felis* a été démontrée par la présence de la bactérie dans des œufs et des adultes n'ayant pas encore pris leur premier repas sanguin [Azad *et al.*, 1997]. La transmission verticale se réalise sur au moins 12 générations mais avec une diminution importante de la prévalence [Wedincamp et Foil, 2002]. La transmission horizontale de *R. felis* n'a pas été démontrée dans des populations de puces élevées en laboratoire [Wedincamp et Foil, 2002]. *C. felis* peut donc être considérée comme le principal vecteur et réservoir de *R. felis*. La chute du taux d'infection de génération en génération, chez des puces élevées en laboratoire sans contact avec des animaux vertébrés, peut suggérer l'existence d'un réservoir vertébré dans le cycle naturel de l'infection. Lorsque la prévalence de *R. felis* dans une population de puces diminue, les puces considérées individuellement présentent une charge infectieuse plus importante [Reif *et al.*, 2008]. Ce mécanisme pourrait faciliter l'efficacité de la transmission verticale et peut être aussi la transmission horizontale à un réservoir et

permettre la persistance de l'infection dans la nature.

Des arthropodes infectés ont été prélevés dans la nature chez différentes espèces animales, surtout des chats, mais aussi des chiens, des opossums, des rongeurs, des hérissons, un singe, des chevaux [Pérez-Osorio *et al.*, 2008] et un renard [Rolain *et al.*, 2009]. La séroprévalence de l'infection à *R. felis* varie de 4 à 73% chez le chat (tableau 4) et de 22 à 33% chez l'opossum [Reif et Macaluso, 2009]. Les chats errants sont davantage infestés par des puces et sont plus souvent infectés par *R. felis*. Ils sont par ailleurs plus exposés au virus de l'immunodéficience féline et donc plus sensibles aux infections. L'interprétation des résultats sérologiques doit néanmoins être réalisée avec beaucoup de prudence, en raison des réactions croisées qui existent avec les autres rickettsies du groupe boutonneux et également les rickettsies du groupe typhus. Une étude expérimentale a montré que 16 chats continuellement infestés par des puces infectées par *R. felis* présentaient tous une séroconversion dans un délai de deux à quatre mois. De plus, l'ADN de *R. felis* a été mis en évidence, de façon transitoire, dans le sang de cinq chats parmi les 16 [Wedincamp et Foil, 2000]. Dans une étude réalisée aux Etats-Unis, alors que 67% des pools de puces prélevées sur 92 chats étaient infectés par *R. felis*, tous les échantillons sanguins des mêmes chats étaient négatifs à l'examen par PCR [Hawley *et al.*, 2007].

Tableau 4

Enquêtes de séroprévalence de l'infection canine et féline à *Rickettsia felis*

Pays	Auteurs	Populations félines et canines étudiées	Taux de séroprévalence (IFI) en %
Etats-Unis	Bayliss <i>et al.</i> 2009	90 chats fébriles et 90 chats en bonne santé	3,9
	Case <i>et al.</i> 2006	170 chats de refuges en Californie et au Wisconsin	11,1
	Higgins <i>et al.</i> 1996	Chats fébriles du nord-est des Etats-Unis	8
	Labruna <i>et al.</i> 2007	22 chats domestiques de Santiago	72,7
France	Données personnelles 1997	91 chats errants du sud-est de la France	18
Espagne	Nogueras <i>et al.</i> 2009	93 chiens dépourvus d'ectoparasites, dans des refuges du nord-est de l'Espagne	49,5

Dans une autre étude, 3,9% (7/180) des chats étaient séropositifs mais aucune des PCR réalisées sur le sang de ces sept animaux n'a permis de déceler la présence de *R. felis* [Bayliss *et al.*, 2009].

Au bilan, la séroconversion chez le chat suggère qu'au moins une infection transitoire se produit chez cette espèce. Le caractère transitoire de l'infection sanguine peut s'expliquer soit par une élimination rapide de la bactérie chez les vertébrés, sous l'effet d'une réponse immunitaire rapide et efficace, soit par la séquestration des rickettsies dans des tissus autres que le sang. La sensibilité des outils de biologie moléculaire actuellement disponibles, permet d'exclure l'existence d'une infection sanguine inférieure au seuil de détection.

Très peu d'infections cliniques par *R. felis* sont rapportées chez les animaux vertébrés. De façon intéressante, en Espagne, deux personnes d'une même famille ont présenté une fièvre boutonneuse à puces et le chien vivant sous le même toit a manifesté de l'asthénie, des vomissements et de la diarrhée sans apparition de fièvre. De l'ADN de *R. felis* a été mis en évidence à partir d'un prélèvement sanguin réalisé sur le chien [Oteo *et al.*, 2006]. Dans une situation similaire en Allemagne, le chien vivant dans une maison où étaient apparus deux cas de fièvre boutonneuse à puces, a présenté une sérologie positive en *Western blot* mais est resté asymptomatique [Richter *et al.*, 2002].

Récemment, en Californie, *R. felis* a été révélé par PCR dans le foie et les reins de trois opossums (*Didelphis virginiana*) sur 16 testés [Karpathy *et al.*, 2009]. C'est la première fois que *R. felis* est détectée chez un vertébré,

dans un organe autre que le sang. L'interprétation de ce résultat préliminaire nécessite des investigations complémentaires.

Selon Perlman, *R. felis* pourrait être considérée comme un symbiote transmis verticalement chez les invertébrés et devenant secondairement pathogène chez les vertébrés [Perlman *et al.*, 2006]. A ce jour, le rôle du chat, du chien, des rongeurs ou des hérissons comme réservoir de *R. felis* reste un sujet de débat. S'il existe un réservoir vertébré dans le cycle d'infection de *R. felis*, l'opossum, cet animal sauvage synanthrope aux Etats-Unis, est le meilleur candidat. En effet, non seulement les opossums présentent des séroconversions mais ils sont aussi fortement parasités par des puces infectées [Pérez-Osorio *et al.*, 2008].

Wolbachia spp. sont des bactéries intracellulaires endosymbiontes des arthropodes et qui interfèrent avec les mécanismes de la reproduction des arthropodes. Elles sont aussi symbiontes de filaires animales et humaines. Un traitement antibiotique permet d'éliminer la bactérie et de stériliser le nématode hébergeant la bactérie.

Dans notre enquête, la proportion de puces infectées par *Wolbachia sp.* est significativement plus élevée parmi les puces infectées par *R. felis* que parmi les puces non infectées. Cette observation est l'inverse de ce qui est habituellement décrit dans la littérature [Pornwiroon *et al.*, 2007].

L'absence de mise en évidence de bartonelles constitue une surprise en raison de l'association fréquente de ces bactéries avec les puces.

V - CONCLUSION

Cette étude confirme la forte prévalence de *Rickettsia felis*, pathogène émergent, chez les arthropodes en Afrique et pour la première fois en Ouganda.

La fièvre boutonneuse à puces doit être considérée dans le diagnostic différentiel des

syndromes fébriles d'origine inconnue en Ouganda, en particulier en cas de contact avec des chiens ou chats infestés par des puces.

Le déparasitage externe des carnivores domestiques permet de prévenir la transmission à l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams J.R., Schmidtman E.T., Azad A.F. - Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a Rickettsia-like microorganism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, **43**, 400-409.
- Azad A.F., Radulovic S., Higgins J.A., Noden B.H., Troyer J.M. - Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.*, 1997, **3**, 319-327.
- Bayliss D.B., Morris A.K., Horta M.C., Labruna M.B., Radecki S.V., Hawley J.R., Brewer M.M., Lappin M.R. - Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and *Rickettsia* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J. Feline Med. Surg.*, 2009, **11**(4), 266-270.
- Case J.B., Chomel B., Nicholson W., Foley J.E. - Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *J. Feline Med. Surg.*, 2006, **8**(2), 111-117.
- Hawley J.R., Shaw S.E., Lappin M.R. - Prevalence of *Rickettsia felis* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J. Feline Med. Surg.*, 2007, **9**(3), 258-262.
- Higgins J.A., Radulovic S., Schriefer M.E., Azad A.F. - *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**(3), 671-674.
- Karpathy S.E., Hayes E.K., Williams A.M., Hu R., Krueger L., Bennett S., Tilzer A., Velten R.K., Kerr N., Moore W., Ereemeeva M.E. - Detection of *Rickettsia felis* and *Rickettsia typhi* in an area of California endemic for murine typhus. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, **15**s2, 218-219.
- Labruna M.B., Ogrzewalska M., Moraes-Filho J., Lepe P., Gallegos J.L., López J. - *Rickettsia felis* in Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, **13**(11), 1794-1795.
- Lascola B., Meconi S., Fenollar F., Rolain J.M., Roux V., Raoult D. - Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer *et al.* 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 2002, **52**, 2035-2041.
- Nogueras M.M., Pons I., Ortuño A., Segura F. - Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern Spain. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, **15**s2, 237-238.
- Oteo J.A., Portillo A., Santibáñez S., Blanco J.R., Pérez-Martínez L., Ibarra V. - Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**(7), 2669-2671.
- Pérez-Osorio C.E., Zavala-Velázquez J.E., Arias León J.J., Zavala-Castro J.E. - *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, **14**(7), 1019-1023.
- Perlman S.J., Hunter M.S., Zehori-Fein E. - The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc. R. Soc. B.*, 2006, **273**, 2097-2106.
- Pornwiroon W., Kearney M.T., Husseneder C., Foil L.D., Macaluso K.R. - Comparative microbiota of *Rickettsia felis*-uninfected and -infected colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis*. *ISME J.*, 2007, **1**(5), 394-402.
- Reif K.E., Stout R.W., Henry G.C., Foil L.D., Macaluso K.R. - Prevalence and infection load dynamics of *Rickettsia felis* in actively feeding cat fleas. *PLoS One.*, 2008, **3**(7), e2805.
- Reif K.E. et Macaluso K.R. - Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J. Med. Entomol.*, 2009, **46**(4), 723-736.
- Renvoisé A., Joliot A.Y., Raoult D. - *Rickettsia felis* infection in man, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009a, **15**(7), 1126-1127.
- Richards A.L., Jiang J., Omulo S., Dare R., Abdirahman K., Ali A., Sharif S.K., Feikin D.R., Breiman R.F., Njenga M.K. - Human infection with *Rickettsia felis*, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, **16**(7), 1081-1086.
- Richter J., Fournier P.E., Petridou J., Häussinger D., Raoult D. - *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, **8**, 207-208.
- Rolain J.M., Bitam I., Buffet S., Marié J.L., Bourry O., Portelli-Clerc C., Beaucournu J.C., Parola P., Fournier P.E., Davoust B., Raoult D. - Presence or absence of plasmid in *Rickettsia felis* depending on the source of fleas. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, **15**s2, 296-297.

Schriefer M.E., Sacci J.B., Dumler J.S., Bullen M.G., Azad A.F. - Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 949-954.

Socolovschi C., Mediannikov O., Sokhna C., Tall A., Diatta G., Bassene H., Trape J.F., Raoult D. - *Rickettsia felis* – associated unruptive fever, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, **16**(7), 1140-1142.

Wedincamp J.Jr., Foil L.D. - Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas

(*Ctenocephalides felis* Bouché) infected with *Rickettsia felis*. *J. Vector Ecol.*, 2000, **25**(1), 123-126.

Wedincamp J.Jr., Foil L.D. - Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). *J. Vector Ecol.*, 2002, **27**(1), 96-101.

Zavala-Velázquez J.E., Ruiz-Sosa J.A., Sánchez-Elias R.A., Becerra-Carmona G., Walker D.H. - *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatán. *Lancet*, 2000, **356**(9235), 1079-1080.

