

LES RICKETTSIOSES : ASPECTS BACTERIOLOGIQUES ET PARTICULARITES DIAGNOSTIQUES

THE RICKETTSIOSIS : BACTERIOLOGICAL ASPECTS AND DIAGNOSTIC FEATURES

A. Znazen, A. Hammami

Laboratoire de Microbiologie. CHU Habib Bourguiba, Sfax. Tunisie

Correspondance :

Dr Abir Znazen
Laboratoire de Microbiologie.
CHU Habib Bourguiba - Sfax
E-mail : abirznazen2001@yahoo.fr

Article reçu le 25/05/2010, accepté le 3/01/2011.

Résumé :

Les Rickettsies sont des cocobacilles à Gram négatif intracellulaires obligatoires de la famille des Rickettsiaceae qui ne comprend actuellement que deux genres : Rickettsia et Orientia. Les espèces du genre Rickettsia sont divisées en deux groupes : le groupe des fièvres boutonneuses (SFG) et le groupe des typhus (TG). Les rickettsies sont en général transmises par les tiques, les mites les puces et des poux. Après piqûres de l'arthropode ou pénétration cutanée à travers des lésions de grattage, la cellule épithéliale constitue la principale cible de la bactérie. Au niveau du site d'inoculation, une escarre noirâtre va apparaître puis la bactérie pourra gagner la circulation lymphatique puis sanguine entraînant une rickettsiémie. La bactérie va atteindre alors plusieurs organes dont la peau avec une éruption, le poumon, le cerveau, le cœur, etc.

Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires strictes, le diagnostic des rickettsioses est souvent confirmé par la sérologie qui reste le moyen le plus accessible au laboratoire de routine. La technique de la micro-immunofluorescence constitue la méthode de référence. Pour la détection et l'identification des rickettsies, différents types de prélèvements peuvent être utilisés tels que les biopsies cutanées au niveau de l'escarre ou de l'éruption cutanée, les prélèvements de sang total ou même les tiques ou les puces. L'isolement de ces bactéries est réservé aux laboratoires pouvant réaliser la culture cellulaire. La PCR ciblant différents gènes, est une méthode sensible et spécifique.

Mots clés : Rickettsia, biologie, taxonomie, PCR, sérologie.

Abstract:

Rickettsiae are gram-negative intracellular rods belonging to the family Rickettsiaceae, which currently includes only two genera: Rickettsia and Orientia. The species within the genus Rickettsia are divided into two groups: the spotted fever group (SFG) and typhus group (TG). Rickettsiae are usually transmitted by ticks, mites, fleas and lice. After the arthropod bites or penetration through skin excoriations, the epithelial cell is the main target of the bacterium. At the site of inoculation, an eschar will appear, and then the bacteria can reach lymphatic and blood circulation leading to a rickettsemia. The bacteria will then reach several organs including skin rash, lung, brain, heart....

Since Rickettsiae are strict intracellular bacteria, the diagnosis of rickettsial diseases is often confirmed by serology which remains the most accessible tools to the routine laboratory. The microimmunofluorescence is the reference method. For detection and identification of Rickettsia, various types of samples can be used such as skin biopsies at the eschar or rash, samples of whole blood or even ticks or fleas. The isolation of these bacteria is restricted to laboratories that can perform cell culture. PCR targeting different genes is sensitive and specific.

Key words : Rickettsia, biology, taxonomy, PCR, serology.

TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

Les bactéries du genre *Rickettsia* sont des cocobacilles à Gram négatif intracellulaires obligatoires de 0,3 à 0,5 x 0,8 à 2 µm². Ces bactéries ne peuvent être colorées par la coloration de Gram. Elles prennent plutôt la fuschine basique lors de la coloration de Gimenez [1].

Initialement les rickettsies étaient classées sur la base des caractères phénotypiques [2]. Ainsi, étaient classées dans la famille des Rickettsiales, les petits coccobacilles à Gram négatif qui :

- retiennent la fuschine basique à la coloration de Gimenez,
- se divisent par fission binaire,
- se cultivent sur des tissus,
- peuvent entraîner la maladie chez des hôtes invertébrés qui agissent comme vecteurs ou réservoirs ou les vertébrés infectés par piqûre d'arthropodes.

Sur la base de ces critères phénotypiques, l'ordre des *Rickettsiales* comprenait plusieurs tribus. Les études phylogéniques basées sur la comparaison des séquences de l'ADNr 16s ont bouleversé l'ancienne classification. Actuellement, il est admis que les Rickettsies appartiennent à la division des proteobactéries et que l'ordre des *Rickettsiales* comprend les genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, *Rickettsia* et *Wolbachia*. Le genre *Rochalimaea* a été intégré au genre *Bartonella* de la famille des *Bartonellaceae* qui appartient toujours à la division des proteobactéries, mais a été retirée de l'ordre des *Rickettsiales*. *Coxiella burnetii* a été, également, reclassé dans la famille des *Legionellaceae*. Puisque le gène 16S rDNA n'était pas assez discriminant au sein du genre *Rickettsia* [3, 4], les études phylogéniques se sont surtout basées sur les techniques de MLST (Multi Locus Sequence Typing) et MST (Multi Spacer Typing) pour la classification des différentes espèces, en étudiant plusieurs autres gènes : *sca1*, *sca2*, *sca4*, *ompA*, *ompB*, *gltA* et le gène codant pour une protéine de 17 KDa. Actuellement, 24 espèces de Rickettsies sont validées [5]. Les espèces de ce genre sont divisées en deux groupes : le groupe des fièvres boutonneuses (GFB) et le groupe des typhus (GT) selon plusieurs critères (tableau 1). *Orientia tsutsugamushi*, agent du typhus des broussailles, était considéré comme un troisième groupe. Actuellement, *Orientia* constitue un genre à part au sein de la famille des Rickettsies.

Tableau I : Différences phénotypiques entre les deux groupes de rickettsies : le groupe boutonneux et le groupe typhique

Table I : phenotypic differences between the two groups of *rickettsiae* : the spotted fever Group and the typhus group

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

PATHOGENIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS A RICKETTSIA

La séquence d'évènement dans l'infection à *Rickettsia* a été bien établie. Les rickettsies du GFB, transmises par les tiques ou les mites, sont inoculées à la peau à partir de la salive de l'arthropode durant son repas sanguin [6]. Les rickettsies du GT sont éliminées dans les fèces des puces et des poux puis vont pénétrer par auto-inoculation à travers les lésions de grattage au niveau du site de la piqûre de la puce ou du pou [7]. La cible initiale des rickettsies au niveau du site d'inoculation est non encore identifiée. Toutes les cellules nucléées du derme : fibroblastes, macrophages, cellules dendritiques et cellules endothéliales peuvent constituer une cible. Les bactéries vont passer ensuite dans les vaisseaux lymphatiques pour atteindre les ganglions régionaux puis peuvent regagner la circulation sanguine. Ainsi, tous les organes peuvent être atteints mais les cibles préférentielles sont le poumon et le cerveau [6].

L'entrée des rickettsies dans les cellules est rapide. Elle se fait grâce aux protéines majeures de membrane : *OmpA* et *OmpB* qui interagissent avec une protéine de la membrane cytoplasmique *Ku70* [8]. Elles échappent à la fusion phagolysosomiale par destruction rapide de la membrane phagolysosomiale [9]. La diffusion vers les autres cellules se fait différemment pour les rickettsies du GFB et celles du GT. Pour *R. typhi* et *R. prowazekii*, la cellule épithéliale une fois infectée, va éclater et la bactérie va infecter les cellules adjacentes. Ainsi, la bactérie va passer dans les globules rouges, les tissus et les plaquettes [10].

Pour les rickettsies du GFB, la bactérie passe de cellule en cellule par mobilité grâce à la polymérisation des filaments d'actines. Ainsi, les bactéries ne s'accumulent pas dans les cellules mais engendrent plutôt des dommages au niveau de la membrane cellulaire d'où la production de produits hyperactifs d'oxygène qui entraînent la peroxydation des membranes cellulaires [11, 12].

Au cours des infections à *Rickettsia*, une inflammation vasculaire est observée. La vasodilatation, premier phénomène qui apparaît, est responsable du rash cutané. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité vasculaire entraîne un œdème périvasculaire suivi d'une accumulation périvasculaire de lymphocytes CD4 et CD8 et de macrophages. L'augmentation de la perméabilité vasculaire, la blessure endothéliale et la réponse lympho-histiocytaire sont responsables de la vascularite. Un infiltrat lympho-histiocytaire périvasculaire est observé dans le cerveau, les poumons, le cœur, les reins, la peau, le tube digestif, le pancréas, les muscles, les testicules etc...[6].

Ces blessures dans l'endothélium entraînent des altérations de sa fonction anticoagulante par exposition de la membrane basale et du collagène aux facteurs de coagulation du plasma, facteur von willebrand et les plaquettes. Les caillots de plaquettes et de fibrines sont observés uniquement dans les foci des lésions vasculaires sévères, ils sont rarement obstructifs [13]. Les thrombi occlusifs peuvent entraîner des infarctus au niveau des organes tels que le cerveau, la peau et les reins donnant alors une nécrose tubulaire aigue [14].

L'atteinte de la microcirculation et l'effet systémique des cytokines entraînent une augmentation de la perméabilité vasculaire d'où un œdème, une hypovolémie, une hypotension avec parfois même une ischémie. L'hyponatémie entrainerait également une hypovolémie par augmentation de la sécrétion d'ADH d'où une rétention d'eau. L'hypoalbuminémie entrainerait des dommages au niveau de la microcirculation au

Les rickettsioses

niveau des tissus. Concernant la dynamique cardio-pulmonaire, une pneumopathie interstitielle avec un œdème alvéolaire et éventuellement une détresse respiratoire peuvent être observés dans les formes les plus sévères. *R. rickettsii* entraîne une arythmie dans 7 à 16% des cas, secondaire à des lésions vasculaires. L'atteinte neurologique au cours des rickettsioses serait due à une hypoxémie, une ischémie et un œdème cérébral associé à l'inflammation. Pour le TG, un état de typhos est noté. Au cours de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses (FPMR), une encéphalite peut être observée dans 26 à 28% des cas donnant une confusion et une léthargie. L'atteinte des vaisseaux contigus au liquide céphalo-rachidien entraîne une pléiocytose de l'ordre de 10 à 100 cellules/ml à prédominance lymphocytaire, observée dans 34 à 38% des cas. La survenue d'un coma est d'évolution fatale [15].

L'atteinte hépatique se voit dans les rickettsioses fatales. La nécrose hépatocellulaire focale est à l'origine de l'augmentation des transaminases. L'infection vasculaire focale entraîne une atteinte de la triade portale. L'hyperalbuminémie est observée dans 18 à 30 % des cas au cours de la FPMR et l'ictère dans 8 à 9% des cas. Dans la FPMR et la fièvre boutonneuse méditerranéenne (FBM), un état procoagulant est observé avec des lésions endothéliales d'où la libération de facteurs de procoagulation et activation de la coagulation en cascade. Il en résulte une formation de thrombi, activation des plaquettes, augmentation des facteurs fibrinolytiques et consommation des anticoagulants naturels [17]. Une thrombocytopenie est observée dans 32 à 52% des cas de FPMR et 35% des cas de FBM probablement par adhésion des plaquettes aux cellules infectées d'une part, et leur consommation dans les caillots d'autre part. L'augmentation de la bêta-thromboglobuline avec la diminution de la concentration du facteur 4 plaquettaire suggèrent l'activation des plaquettes observée lors de la FPMR [16]. Au cours de la FPMR et la FBM, il y a activation du système fibrinolytique avec augmentation de la concentration de la fibrine et des produits de dégradation du fibrinogène [6].

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

La biologie non spécifique : Certaines anomalies biologiques peuvent se voir au cours des rickettsioses. La numération-formule sanguine peut montrer une leucopénie, une anémie et une thrombopénie. Une hyponatrémie secondaire à l'hypovolémie avec une hypoalbuminémie peuvent apparaître. Des désordres hépatiques peuvent se voir surtout à type d'augmentation des transaminases [17, 18].

La sérologie : Le diagnostic des rickettsioses est souvent confirmé par la sérologie qui reste le moyen le plus accessible au laboratoire de routine. Les premiers tests utilisés étaient basés sur la réactivité croisée entre *Proteus vulgaris* OX19 et les rickettsies du groupe des typhus d'une part et *P. vulgaris* OX2 et les rickettsies du groupe des boutonneux d'autre part [19]. Vu le manque de sensibilité et de spécificité, cette méthode a été délaissée mais continue, néanmoins, à être utilisée dans certains pays surtout en Asie. D'autres techniques ont été également utilisées telles que les tests de fixation du complément, d'hémagglutination et d'agglutination des particules de latex. Ces tests peuvent être utilisés pendant la phase aigue de la maladie mais manquent de sensibilité lors des études de séroprévalence. Des tests ELISA ont été développés et sont, actuellement, utilisés pour le diagnostic du typhus de broussaille. La technique de la micro-immunofluorescence (MIF) constitue la méthode de référence pour le sérodiagnostic

des rickettsioses. Il s'agit d'une méthode sensible et spécifique. Cependant, elle présente quelques limites surtout le manque de standardisation et les réactions croisées observées entre les différentes espèces de rickettsies [20]. Le diagnostic est porté si les IgM sont positives à des taux supérieurs à 1/32 ou si l'on observe une séroconversion entre deux sérums. Les IgM et les IgG sont détectées dans les 5 à 7 jours suivant le début de la maladie. Cependant, cette sérologie peut rester négative pendant les 15 premiers jours de la maladie. Ainsi, pour la fièvre à tique africaine les anticorps n'apparaissent que dans les 25 à 28 jours. De même, la prise d'antibiotique retarde l'apparition des anticorps [21]. La MIF est hautement sensible, cependant, elle manque de spécificité. En effet, des réactions croisées peuvent se voir entre les rickettsies et les bactéries du genre *Proteus*, *Legionella*, *Bartonella* et *Ehrlichia* du fait d'une similitude antigénique au niveau de leurs lipopolysaccharides. L'interprétation des résultats peut être ainsi faussée et il faudra tester plusieurs antigènes à la fois. L'agent causal serait celui qui donne les titres les plus élevés. Ainsi, pour les rickettsioses, l'espèce sera prise en compte si la somme des titres des IgG et IgM vis-à-vis de ses antigènes est supérieure d'au moins deux dilutions à celle des autres antigènes [22]. Si les différences des titres ne permettent pas de porter un diagnostic, la technique du western blot associé à l'absorption croisée permet de faire un diagnostic au niveau de l'espèce. Toutefois, cette technique consomme beaucoup d'antigènes et ne peut être réalisée que dans des laboratoires spécialisés [20].

La biologie moléculaire : La PCR est une méthode sensible et spécifique pour la détection et l'identification des rickettsies. Différents types de prélèvements peuvent être utilisés tels que les biopsies cutanées au niveau de l'escarre ou de l'éruption cutanée, les prélèvements de sang total ou même les tiques ou les puces. Ce sont les PCR faites sur les biopsies cutanées qui sont les plus sensibles. Différents gènes peuvent être ciblés : *ompA*, *ompB*, *gltA*, *sca1*, *sca4* et *17kDa* [23-27]. Un séquençage ultérieur des produits de PCR permettra de faire un diagnostic d'espèces.

Plusieurs techniques ont été proposées pour le diagnostic des rickettsioses. Les PCR nichées ont été décrites pour leur sensibilité augmentée. Cependant, le risque de contamination avec cette technique n'est pas négligeable [28]. La PCR en temps réel constitue une technique beaucoup plus rapide et sensible avec un risque de contamination beaucoup moindre. Actuellement, des PCR utilisant des sondes spécifiques de *R. typhi*, *R. prowazekii* et *R. felis* ont été développées épargnant le recours au séquençage [29, 30].

La culture : Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires strictes. L'isolement de ces bactéries est réservé aux laboratoires pouvant réaliser la culture cellulaire. De plus, *R. rickettsii* et *R. prowazekii* sont reconnues, actuellement, comme des agents de bioterrorisme. Ainsi, la culture de ces bactéries doit se faire dans des laboratoires de sécurité de niveau 3. Plusieurs types cellulaires peuvent être utilisés pour l'isolement des rickettsies : cellules de fibroblastes, des L929, des cellules Véro. La méthode utilisée est celle de la centrifugation en tubes « bijoux » qui peuvent être inoculés par différents types de prélèvements : biopsie cutanée (avec meilleure sensibilité si elle est faite au niveau de l'escarre d'inoculation), du sang total ou les broyats d'arthropodes ramassés sur le patient [31].

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Vu que les rickettsies sont des bactéries intracellulaires strictes,

l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne peut se faire que par l'étude des plaques de lyse ou par la méthode colorimétrique. Récemment, une méthode de PCR en temps réel quantitative a été proposée pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques de plusieurs espèces de Rickettsies [32]. Ainsi, il a été démontré que les rickettsies du groupe boutonneux sont sensibles à la doxycycline, chloramphénicol, rifampicine, tétracycline et quinolones, et sont résistantes aux bêta-lactamines, cotrimoxazole, érythromycine et aux aminosides. Les rickettsies du groupe des typhus ont le même profil de sensibilité sauf qu'elles sont sensibles à l'érythromycine [33]. Les bases génétiques de ces résistances ont été vérifiées lors des séquençages complets des génomes de certaines espèces de rickettsies [34].

Références

- Gimenez DF. Staining *rickettsiae* in yolk-sac cultures. *Stain Technol* 1964 ; 39: 135-40.
- Weiss E, Moulder JW. Order I *Rickettsiales*, Gieszczykiewicz 1939. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984 : 687-703.
- Roux V, Bergoin M, Lamaze N, Raoult D. Reassessment of the taxonomic position of *Rickettsiella grylli*. *Int J Syst Bacteriol* 1997 ; 47 : 1255-7.
- Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE et al. Phylogenetic diversity of the *rickettsiae*. *J Bacteriol* 1989 ; 171 : 4202-6.
- Fournier PE, Raoult D. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of *Rickettsia*. In: Didier Raoult, Philippe Parola, editors. *Rickettsial Diseases*. 1ère ed. Marseille, France: informa healthcare 2007 : 1-13.
- Walker D, Ismail N, Olano JP, Valbuena G, McBride J. Pathogenesis, Immunity, Pathology, and Physiopathology in *Rickettsial Diseases*. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Diseases*. 2007 ed. Informa Healthcare 2007: 15-26.
- Raoult D, Roux V. The body louse as a vector of reemerging human diseases. *Clin Infect Dis* 1999 ; 29 : 888-911.
- Martinez JJ, Cossart P. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *J Cell Sci* 2004 ; 117(Pt 21) : 5097-106.
- Renesto P, Dehoux P, Gouin E, Touqui L, Cossart P, Raoult D. Identification and characterization of a phospholipase D-superfamily gene in *rickettsiae*. *J Infect Dis* 2003 ; 188 : 1276-83.
- Teyssie N, Chiche-Portiche C, Raoult D. Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* based on actin polymerization. *Res Microbiol* 1992 ; 143 : 821-9.
- Eremeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Quantitative analyses of variations in the injury of endothelial cells elicited by 11 isolates of *Rickettsia rickettsii*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001 ; 8 : 788-96.
- Gouin E, Egile C, Dehoux P et al. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 2004 ; 427 : 457-61.
- Davidson MG, Breitschwerdt EB, Walker DH et al. Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1990 ; 51 : 165-70.
- Walker DH, Hawkins HK, Hudson P. Fulminant Rocky Mountain spotted fever. Its pathologic characteristics associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch Pathol Lab Med* 1983 ; 107 : 121-5.
- Helmick CG, Bernard KW, D'Angelo LJ. Rocky mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. *J Infect Dis* 1984 ; 150 : 480-8.
- Elghetany MT, Walker DH. Hemostatic changes in Rocky Mountain spotted fever and Mediterranean spotted fever. *Am J Clin Pathol* 1999 ; 112 : 159-68.
- Drancourt M, Raoult D, Harle JR et al. Biological variations in 412 patients with Mediterranean spotted fever. *Ann N Y Acad Sci* 1990 ; 590 : 39-50.
- Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in South Texas, 1980 through 1987. *JAMA* 1991 ; 266 : 1365-70.
- Raoult D, Dasch GA. Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus* spp. and *Legionella* spp. in patients with Mediterranean spotted fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995 ; 11 : 13-8.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; 10 : 1108-32.
- Fournier PE, Jensenius M, Laferl H, Vene S, Raoult D. Kinetics of antibody responses in *Rickettsia africae* and *Rickettsia conorii* infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002 ; 9: 324-8.
- Raoult D, Fournier PE, Fenollar F et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med* 2001 ; 344 : 1504-10.
- Roux V, Rydkina E, Eremeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the *rickettsiae*. *Int J Syst Bact* 1997 ; 47 : 252-61.
- Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group *rickettsiae* by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol* 1998 ; 48 : 839-49.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000 ; 50(Part 4) : 1449-55.
- Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001 ; 51(Pt 4) : 1353-60.
- Ngwamidiba M, Blanc G, Raoult D, Fournier PE. Sca1, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in *Rickettsia* species. *BMC Microbiol* 2006 ; 6 : 12.
- Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 5835-41.
- Henry KM, Jiang J, Rozmajzl PJ, Azad AF, Macaluso KR, Richards AL. Development of quantitative real-time PCR assays to detect *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis*, the causative agents of murine typhus and flea-borne spotted fever. *Mol Cell Probes* 2007 ; 21: 17-23.
- Svraka S, Rolain JM, Bechah Y, Gatabazi J, Raoult D. *Rickettsia prowazekii* and real-time polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12 : 428-32.
- Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens : 13 years of experience. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 4993-5002.
- Rolain JM, Sthul L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three *Rickettsial* species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ; 46 : 2747-51.
- Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. In vitro susceptibilities of 27 *rickettsiae* to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 ; 42: 1537-41.
- Rolain JM, Raoult D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in the *Rickettsia* genus. *Ann N Y Acad Sci* 2005 ; 1063 : 222-30.