VETAGRO SUP

CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année **2012** - Thèse n°

Profil sérologique et recherche de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de chiens apparemment sains : étude prospective sur 30 cas.

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 6 juillet 2012
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Marie NENNIG
Née le 27 juillet 1986
à *Bonneville*

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

VETAGRO SUP

CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année **2012** - Thèse n°

Profil sérologique et recherche de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de chiens apparemment sains : étude prospective sur 30 cas.

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 6 juillet 2012
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Marie NENNIG
Née le 27 juillet 1986
à *Bonneville*

VetAgro Sup

UNIVERSITÉ DE LYON

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zorée	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK	Michel	Professeur 1ere cl	Gestion des élevages
FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
JUNOT	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET	Sylvie	Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonction de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

Remerciements

A Monsieur le Professeur Dominique PEYRAMOND,

De la faculté de médecine de Lyon,

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Marine HUGONNARD,

De Vetagro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail,

Pour sa gentillesse et sa disponibilité,

Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Angeli KODJO,

De Vetagro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Qui a nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Isabelle GOY-THOLLOT,

De Vetagro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Pour nous avoir aidé dans la réalisation de ce travail,

Pour son aide et ses précieux conseils,

Sincères remerciements.

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire des Leptospires de Lyon, sans qui ce projet n'aurait pas pu se réaliser.

Merci à Géraldine pour son aide précieuse.

A mes parents,

A mes sœurs,

A ma famille,

A mes amis.

A Paul, en témoignage de mon amour.

Table des matières

Remerciements 5
Table des matières 9
Table des illustrations 15
Table des abréviations 17
INTRODUCTION 19
PREMIERE PARTIE : POUVOIR PATHOGENE DES LEPTOSPIRES 21
I. La famille des Leptospires 21
A. Classification 21
1) Classification sérologique 21
2) Classification génomique 23
B. Facteurs de virulence 24
1) Caractéristiques morphologiques et structurales 24
i. Morphologie générale 24
ii. Structure et ultrastructure microscopique 25
2) Caractéristiques bactériologiques 26
i. Métabolisme des leptospires 26
ii. Conditions de survie et de culture 26
3) Principaux déterminants de la pathogénicité 27
i. Action mécanique : mobilité et capacité invasive 27
ii. Facteurs d'échappement à la réponse immunitaire 28
iii. Substances élaborées 28
iv. Le LPS : un facteur de virulence 29
II. Pathogénie de la leptospirose 31
A. Le risque infectieux 31
1) La contamination 31
2) Matières virulentes 32
3) Hôtes principaux et hôtes occasionnels 32
B. Schéma pathogénique général 34
C. Réponse immunitaire de l'hôte 35
III. Présentations cliniques de la maladie 37
A. Différentes formes cliniques 37
1) Formes suraiguës 37
2) Formes aiguës et subaiguës 37

i. Formes typiques 38
a) Forme rénale 38
b) Forme hépatique 38
ii. Formes atypiques 39
a) Forme respiratoire 39
b) Syndrome hémorragique 39
c) Forme nerveuse 39
d) Forme oculaire 40
e) Forme cardiaque 40
3) Formes chroniques 40
4) Formes subcliniques 41
B. Corrélation entre le sérogroupe et la forme clinique 41
C. Lésions tissulaires et organiques 42
1) Lésions rénales 42
2) Lésions hépatiques 42
3) Lésions pulmonaires 42
DEUXIEME PARTIE : DIFFERENTES METHODES DIAGNOSTIQUES DE LA LEPTOSPIROSE 43
I. Eléments de suspicion 43
A. Suspicion épidémiologique : facteurs de risques 43
B. Suspicion clinique 43
C. Eléments de suspicion para cliniques 44
1) Modification des paramètres hématologiques, biochimiques et urinaires 44
2) Apport de l'imagerie dans le diagnostic de la leptospirose 46
i. Echographie abdominale 46
ii. Radiographie thoracique 46
II. Outils diagnostiques disponibles en routine 47
A. Différentes méthodes diagnostiques 47
1) Diagnostic indirect 47
2) Diagnostic direct 48
B. Diagnostic indirect : sérologie par technique Microagglutination (MAT) 48
1) Principe 48
2) Limites d'interprétation des résultats 49
i. Prise en compte du statut vaccinal 49
ii. Prise en compte de la cinétique de la production d'anticorps 51
iii. Prise en compte des éventuelles réactions croisées 51

C. Diagnostic direct : méthode Polymerase Chain Reaction (PCR) 52
1) Principe 52
2) Intérêts et limites de la méthode PCR 53
III. Signification d'une sérologie positive 54
IV. Signification d'une PCR positive 56
V. Complémentarité du test sérologique d'agglutination et de la PCR 57
A. Comparaison MAT/PCR urines 57
B. Comparaison MAT/PCR sur sang 58
C. Conclusion 59
VI. Etat des connaissances sur le statut de porteur sain 59
A. Données chez l'homme 59
A. Données chez le chien 60
TROISIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE: PROFIL SEROLOGIQUE ET RECHERCHE D'ADN DE LEPTOSPIRES PATHOGENES SUR URINE ET SANG DE 30 CHIENS APPAREMMENT SAINS 63
I. Objectif 63
II. Matériel et Méthodes 64
A. Population d'étude 64
B. Méthodes 64
1) Evaluation du statut vaccinal de l'animal 64
2) Enquête épidémiologique 64
3) Evaluation du statut clinique de l'animal 65
4) Nature et méthodologie des prélèvements biologiques 65
5) PCR sur sang et urine 66
6) Sérologie MAT et critères d'interprétation 66
7) Contribution personnelle 68
III. Résultats 68
A. Présentation de la population d'étude 68
1) Données épidémiologiques 68
i. Sexe 68
ii. Races 69
iii. Âge 70
iv. Lieu et mode de vie 71
2) Statut vaccinal 72
3) Antécédents pathologiques et données cliniques 74
B. Analyse macroscopique des urines 75

1) Densité urinaire mesurée au réfractomètre 75
2) Anomalies de la bandelette urinaire 75
C. Résultats sérologiques 76
1) Etude des profils sérologiques 77
i. Groupe ne présentant pas d'anticorps (n=11) 77
ii. Groupe présentant un profil sérologique compatible avec la vaccination (n=10) 78
Le tableau 14 présente les titres des dix chiens de ce groupe 78
iii. Groupe présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique (n = 9) 79
a) Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique imputable à un sérogroupe vaccinal (n = 3) 80
b) Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique imputable à un sérogroupe sauvage (n=1) 80
c) Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique avec titres positifs multiples (n = 5) 81
2) Etude des titres anticorps contre les sérogroupes vaccinaux en fonction de la date du dernier rappel vaccinal 82
3) Critères épidémiologiques et résultats MAT 85
D. Résultats des PCR 87
E. Critères épidémiologiques et résultats PCR 87
F. Corrélation PCR/Sérologie 89
IV. Discussion 91
A. Population d'étude 91
B. Apport des résultats de la bandelette urinaire 92
1) Cas du chien présentant une glucosurie 92
2) Interprétation de la protéinurie et de la bilirubinurie en fonction de la densité urinaire ... 92
C. Analyse des résultats sérologiques MAT 93
1) Groupe ne présentant pas d'anticorps 93
2) Groupe présentant un profil sérologique compatible avec la vaccination 93
3) Groupe présentant un profil compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe vaccinal Canicola 93
4) Cas du chien n° 24 présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe Grippotyphosa 94
5) Cas présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique avec positivités multiples 95
D. Critères influençant les résultats MAT 95
1) Vaccination 95
2) Influence de la vaccination sur les titres vaccinaux 96

3) Facteurs de risque 96
E. Analyse des résultats PCR 97
F. Critères influençant les résultats PCR 98
1) Vaccination 98
2) Facteurs de risque 98
G. Concordance des résultats MAT et PCR 98
1) Résultats concordants 98
2) Résultats non concordants 99
H. Conclusion quant à l'utilisation des tests MAT et PCR pour l'identification de porteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes 100
CONCLUSION 103
BIBLIOGRAPHIE 105
ANNEXES 111

Table des illustrations

Figures :

Figure 1 : Sérogroupes et sérovars pathogènes les plus importants épidémiologiquement chez l'animal [55, 107]. 22
Figure 2: Photographie de *Leptospira* interrogans au microscope électronique (x1500) [55] 24
Figure 3 : Ultrastructure des leptospires [27, 54] 24
Figure 4: Mouvement des leptospires (A) [27] et microscopie électronique de Leptospira biflexa (B) [55] 25
Figure 5 : Cycle Epidémiologique de la leptospirose d'après [9, 14] 31
Figure 6 : Hypothèse quant à l'incidence de la nature du sérovar sur l'expression et la transmission de la leptospirose chez le chien [75] 33
Figure 7 : Schéma pathogénique général de la leptospirose d'après [42] 34
Figure 8 : Evolution de la quantité de leptospires ou d'anticorps par rapport à la date d'infection [51] 36
Figure 9 : Coupe histologique d'un rein de chien atteint de leptospirose montrant des leptospires (Coloration Warthin-Starry) 42
Figure 10 : Fonction de vie des chiens de l'étude 68
Figure 11 : Gabarit des chiens de l'étude 69
Figure 12 : Age des chiens de l'étude 70
Figure 13 : Répartition des chiens de l'étude par type d'eaux stagnantes 72
Figure 14: Intervalle entre le dernier rappel vaccinal pour la valence leptospirose et la date de collecte du sérum 73
Figure 15 : Résultats de la bandelette urinaire des trente chiens le jour des prélèvements 75
Figure 16 : Profils sérologiques 77
Figure 17 : Antériorité du dernier rappel vaccinal dans le groupe sans anticorps 77
Figure 18 : Antériorité du dernier rappel vaccinal pour les 10 chiens avec un profil vaccinal 78
Figure 19 : Antériorité du dernier rappel vaccinal pour les 6 chiens présentant un profil vaccinal et une réaction à un seul sérogroupe. 79
Figure 20: Profil sérologique des chiens présentant une sérologie compatible avec une infection leptospirosique 79
Figure 21: Répartition des titres contre le sérogroupe Canicola en fonction de la date du dernier vaccin 83
Figure 22 : Répartition des titres contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae en fonction de la date du dernier vaccin 84
Figure 23: Fréquence des sérologies MAT selon différents critères épidémiologiques 86
Figure 24 : Fréquence des résultats PCR selon différents critères épidémiologiques 88

Tableaux :

Tableau 1 : Correspondance entre espèce génomique et sérogroupes [77] 23
Tableau 2 : Hôtes réservoirs des principaux sérovars infectant le chien [55, 107] 32
Tableau 3: Tableau récapitulatif de la fréquence des signes cliniques associés aux formes aiguës de leptospirose selon les études [20, 39, 51, 59, 74] 37
Tableau 4: Fréquence des anomalies biologiques rencontrées selon les études [20, 24, 39, 41, 46, 51, 59, 68, 74] 45
Tableau 5: Définition du seuil de positivité selon les études [20, 23, 39, 46, 93, 101] 50
Tableau 6: Corrélation des résultats PCR et de la sérologie MAT dans l'étude de Harkin et al. (2003) [47] 57
Tableau 7 : Corrélation des résultats des tests MAT et PCR sur urine dans l'étude de Harkin (2003) [48] 57
Tableau 8 : Différentes souches testées 67
Tableau 9 : Races des chiens de l'étude 69
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des données épidémiologiques âge, race, sexe 71
Tableau 11 : Vaccin utilisé et date du dernier rappel de vaccination 74
Tableau 12 : Nombre de chiens présentant une protéinurie et une bilirubinurie à la BU en fonction de la densité urinaire. 75
Tableau 13 : Résultats des sérologies MAT 76
Tableau 14 : Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec la vaccination 78
Tableau 15: Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptopirosique imputable au sérogroupe Canicola 80
Tableau 16 : Profil compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe Grippotyphosa 80
Tableau 17: Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptospirosique avec titres positifs multiples 81
Tableau 18 : Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptospirosique avec réaction à titres multiples 82
Tableau 19: Répartition des titres en anticorps contre les sérogroupes vaccinaux en fonction du dernier rappel vaccinal 82
Tableau 20 : Profil épidémiologique des chiens avec un profil sérologique MAT compatible avec une infection leptospirosique 85
Tableau 21 : Résultats comparés des tests PCR sur sang et urine 87
Tableau 22: Résultats comparés des tests MAT et PCR 89

Annexes :

Annexe 1 : Mailing d'appel aux volontaires 111
Annexe 2 : Formulaire d'accompagnement des prélèvements 112
Annexe 3 : Critères épidémiologiques des animaux de l'étude 114
Annexe 4 : Résultats des analyses urinaires des animaux de l'étude 116
Annexe 5 : Résultats des tests MAT et PCR des animaux de l'étude 117

Table des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BU : Bandelette Urinaire

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

DU : Densité Urinaire

EDTA : acide Ethylène Diamine TétraAcétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IgA ImmunoGlobuline de type A

IgG ImmunoGlobuline de type G

LPS : Lipopolysaccharide

MAT : Test de microagglutination

PCR : Polymerase Chain Reaction

SIAMU : Soins Intensifs Anesthésiologie et Médecine d'Urgence (Campus vétérinaire de Lyon, VetAgro Sup)

INTRODUCTION

La leptospirose est une maladie de répartition mondiale, causée par des bactéries de l'ordre des Spirochètes, du genre *Leptospira*, pouvant toucher l'homme ainsi que de nombreuses espèces domestiques dont le chien.

Le caractère zoonotique de la leptospirose et son éventuelle gravité clinique font de cette maladie un réel enjeu tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Dans le monde on estime à plus de 500 000 le nombre de cas annuels de leptospirose chez l'homme avec un taux de mortalité supérieur à 10%.

Le cycle épidémiologique des leptospires est entretenu par de nombreux mammifères, en particulier les rongeurs sauvages, qui constituent les hôtes principaux pouvant excréter les bactéries dans leurs urines et contaminer le milieu extérieur, sans exprimer de symptômes cliniques. Ces porteurs excréteurs asymptomatiques représentent les véritables réservoirs de la bactérie.

Actuellement, la question du portage asymptomatique chez le chien reste peu explorée. Par sa proximité de milieu de vie avec l'homme, le chien pourrait représenter une sentinelle épidémiologique de la maladie et un potentiel vecteur, à l'origine d'un risque de contamination pour l'homme. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude prospective.

Nous avons orienté notre travail expérimental sur l'étude du profil sérologique et la recherche de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de trente chiens apparemment sains.

Dans la première partie de ce manuscrit nous nous intéresserons aux connaissances actuellement disponibles sur la leptospirose et ses différentes présentations cliniques, en insistant en particulier sur le portage asymptomatique chez l'homme et chez le chien. La seconde partie sera consacrée aux outils actuellement utilisés dans le diagnostic de la maladie chez le chien. La dernière partie exposera la méthodologie et les résultats de notre étude clinique prospective. Ces résultats seront discutés et confrontés aux données disponibles sur le sujet.

PREMIERE PARTIE : POUVOIR PATHOGENE DES LEPTOSPIRES

I. La famille des Leptospires

A. Classification

Les leptospires appartiennent à l'ordre des Spirochètes. Longtemps rapproché des protozoaires notamment du genre Trypanosoma, cet ordre est considéré à part entière depuis les années 1950, grâce à l'arrivée de la microscopie électronique. L'ordre des Spirochétales est subdivisé en trois familles, les *Leptospiraceae*, les *Spirochaetaceae*, et les *Brachyspiraceae.* La famille des *Leptospiraceae* regroupe les genres *Leptonema et Leptospira*. La famille des *Spirochaetaceae* est subdivisée en genre *Treponema, Serpulina et Borrelia*. Enfin la famille des *Brachyspiraceae* comprend le genre *Brachyspira*.

Le genre *Leptospira* est défini par sa morphologie, sa mobilité, son métabolisme. Il regroupe plusieurs espèces selon les classifications ; on distingue la classification sérologique basée sur les caractères antigéniques et la classification génomique.

1) Classification sérologique

Dans la classification sérologique, établie avant 1989, on distingue deux espèces parmi le genre leptospira: *Leptospira interrogans* d'une part rassemblant les souches pathogènes pour l'homme et l'animal *;* et d'autre part l'espèce *Leptospira biflexa* regroupant les souches non pathogènes saprophytes [57]. Cette classification phénotypique, basée sur la méthode sérologique de microagglutination est basée sur la détection des anticorps agglutinants induits par les antigènes des leptospires [67].

Un sérogroupe contient l'ensemble des souches portant des déterminants antigéniques communs de type lypopolysaccharides sur leur membrane externe (LPS), induisant la production d'anticorps agglutinants sérogroupe spécifiques. Le sérovar est défini comme une souche ou un ensemble de souche caractérisé par un ou plusieurs antigène(s) qui lui est (sont) propre(s).

Ainsi l'espèce pathogène *L. interrogans* est divisée en plus de 250 sérovars différents, regroupés en plus de 25 sérogroupes (figure 1) selon leurs homologies antigéniques [35, 58, 63].

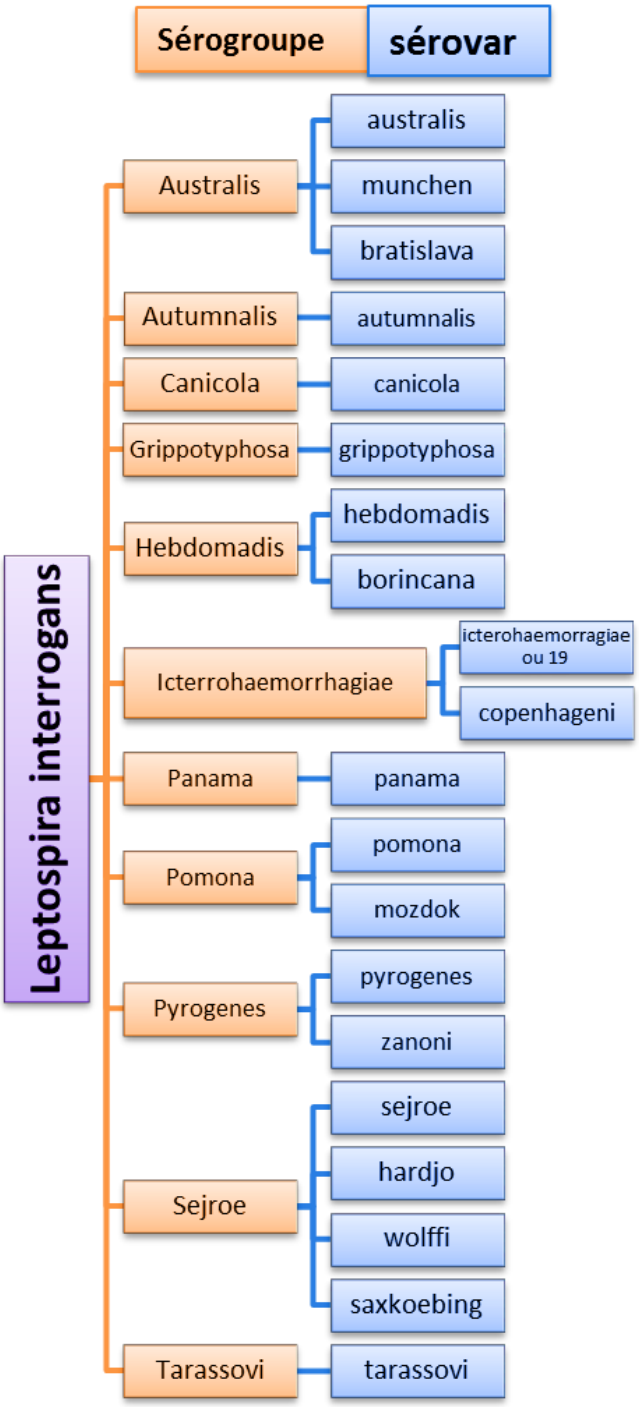

Figure 1 : Sérogroupes et sérovars pathogènes les plus importants épidémiologiquement chez l'animal [55, 107].

La classification génomique reconsidère la classification actuelle en se fondant sur des bases moléculaires précises.

2) *Classification génomique*

Les études de séquençage d'ADN des leptospires réalisées à partir de 1989 ont mis en évidence des diversités entre sérovars au sein d'un même sérogroupe conduisant à une seconde classification génomique.

Plusieurs études utilisant la technique d'hybridation ADN-ADN ont permis d'établir cette nouvelle classification et de définir des relations phylogénétiques entre les leptospires [19, 88].

Dans une étude menée par Morey et al. en 2006, le séquençage du gène rrs codant pour l'ARNr 16S, formant la petite sous unité ribosomiale de la bactérie, a permis de définir 17 espèces génomiques dans le genre Leptospira. Celles-ci ont été séparées en trois classes (tableau 1) : les espèces pathogènes, les espèces non pathogènes et les espèces intermédiaires dont le pouvoir pathogène est variable. La comparaison de la taille du gène codant pour l'ARN 16S a permis par ailleurs d'établir une relation phylogénétique entre ces espèces [77].

Classe	Espèce génomique	Principaux sérovars représentés par chaque espèce
Pathogénès	*L.interrogans*	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis, Autumnalis, Pomona, Bataviae, Pyrogenes, Bulgarica, Copenhageni, Hardjo,
	L. noguchii	Panama
	L. weillii	Celledoni
	L. santarosai	Shermani, Georgia
	L. borgpetersenii	Ballum, Javanica
	L. alexanderi	Manhao 3, Manzhuang, Nanding
	L. kirschneri	Cynopteri, Bim
	Leptospira genomospecies 1	Sichuan
Intermédiaire	*L. fainei*	Hurstbridge
	L. inadai	Lyme, Aguaruna, Kaup
	L. broomii	Non identifié
Non pathogènes	*L. meyeri*	Semaranga, Hardjo, Ranarum,
	L. wolbachii	Codice, Gent
	L. biblexa	Patoc, Andamana
	Leptospira genomospecies 3	Holland
	Leptospira genomospecies 4	Hualin
	Leptospira genomospecies 5	Saopaulo

Tableau 1 : Correspondance entre espèce génomique et sérogroupes [77]

D'un point de vue pratique, la classification génomique semble être source de confusions car des sérovars d'un même sérogroupe peuvent appartenir à différentes espèces génomiques et le

même nom peut être retrouvé dans les deux classifications sans désigner la même chose. L'ancienne classification est toujours largement utilisée dans les études à but épidémiologique, le diagnostic moléculaire n'étant pas toujours réalisé.

Dans notre étude, nous prendrons comme référence la classification sérologique, en nous intéressant à l'espèce *Leptospira interrogans* regroupant les souches pathogènes pour l'homme et l'animal.

B. Facteurs de virulence

1) Caractéristiques morphologiques et structurales

i. Morphologie générale

Les leptospires sont décrites au début du siècle par Noguchi comme des micro-organismes fins, grêles (du grec leptos) et torsadés (du grec spira), possédant un filament axial.

Ce sont les plus petits des spirochètes, leur diamètre est inférieur à 0,2 µm et leur longueur comprise entre 6 et 20 µm [35, 63].

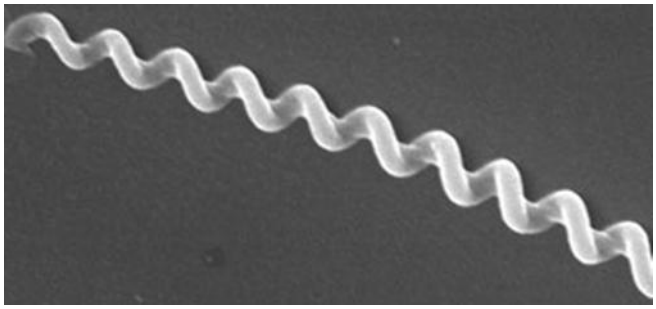

Figure 2: Photographie de *Leptospira* interrogans au microscope électronique (x1500) [55]

Ces bactéries sont de forme hélicoïdale, constituées d'une vingtaine de spires régulières et très serrées, terminées en forme de crochet. L'amplitude est de 0,1 à 0,15 µm et deux spires sont séparées d'une longueur de 0,35 µm.

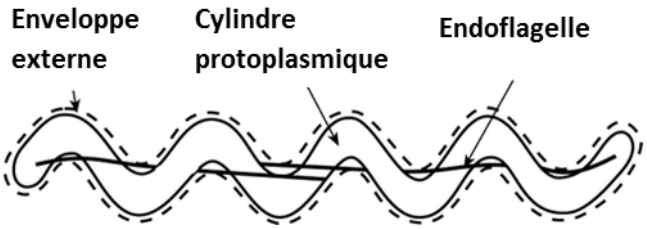

Figure 3 : Ultrastructure des leptospires [27, 54]

Les leptospires possèdent deux flagelles internes situés sous l'enveloppe externe ce qui leur confère une grande mobilité [54]. Les leptospires peuvent réaliser trois types de mouvements : une rotation autour de leur axe central, une progression linéaire, des mouvements circulaires [19]. De plus la position interne de leur flagelle permet aux leptospires de se mouvoir dans des milieux très visqueux par un mouvement de serpentin, leur assurant une plus grande vélocité que dans les liquides. Chaque flagelle et le cylindre protoplasmique sont entrelacés sur un tiers de la longueur de la cellule.

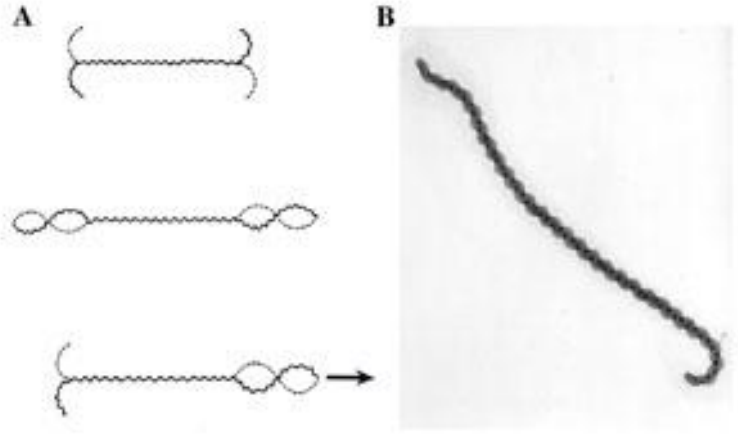

Figure 4: Mouvement des leptospires (A) [27] et microscopie électronique de Leptospira biflexa (B) [55]

ii. Structure et ultrastructure microscopique

Au microscope électronique, chaque bactérie se compose d'une enveloppe externe trilamellaire, souple, élastique et peu résistante, constituée de lipopeptides, de lipopolysaccharides (LPS) et de mucopeptides antigéniques. Celle-ci engaine totalement le cylindre protoplasmique et les flagelles. L'enveloppe externe possède une grande quantité de lipoprotéines comme LipL32, LipL36, LipL41 et LipL48 fixées par l'extrémité N-terminal de leurs acides gras [33]. LipL32 aussi appelé Hap1 ou Lip32 est la lipoprotéine majeure de l'enveloppe externe [22].

Cette enveloppe recouvre une couche plus rigide de peptidoglycanes elle-même accolée par sa face interne à la membrane cytoplasmique. Bien que sa composition soit proche de celle des bactéries Gram -, le peptidoglycane des leptospires gène à la fixation de la coloration utilisée classiquement chez les bactéries. Ainsi, l'observation classique des leptospires se fait au microscope optique à fond noir. Le peptidoglycane interviendrait dans la stimulation de la phagocytose et la production de cytokines par les monocytes [29].

La paroi bactérienne est constituée de l'ensemble des trois structures enveloppe externe, peptidoglycane et membrane cytoplamique.
Le corps cylindrique protoplasmique, enroulé en hélice, est constitué de cytoplasme, de ribosomes et de matériel nucléaire mais ne contient pas de mitochondries. Il correpond au corps cellulaire de la bactérie.

2) *Caractéristiques bactériologiques*

i. Métabolisme des leptospires

Les leptospires nécessitent des conditions particulières pour pouvoir se développer. Ce sont des bactéries aérobies strictes, chimio-organotrophes utilisant les acides gras à longue chaine comme source d'énergie et de carbone [18, 35, 63]. Elles métabolisent les acides gras par β oxydation. L'hydrolyse de ces molécules peut libérer des produits toxiques pour la bactérie. L'albumine est alors un élément nécessaire au bon fonctionnement de la bactérie pour détoxifier les déchets des acides gras [30]. Les sources d'azote inorganique proviennent de sels ammoniacaux ou d'ammoniac. Seuls certains acides aminés comme la proline, l'acide aspartique, le tryptophane et l'acide glutamique sont indispensables. Concernant leur activité enzymatique, elles possèdent une activité catalase positive et oxydase négative. Contrairement aux espèces pathogènes, les espèces saprophytes ont une activité lipasique [18].

ii. Conditions de survie et de culture

Les leptospires sont détruites par la chaleur (létale à 56°C), la dessiccation, le froid (létal à -20°C) et les détergents. Elles sont également sensibles à un pH acide. Ainsi leur survie ne peut s'établir qu'en milieu tempéré (température comprise entre 0°C et 25°C) et à pH neutre voire alcalin (de 6.8 à 7.4). De plus les leptospires sont très sensibles aux ultraviolets. Dans des circonstances particulières, telles qu'un milieu aqueux légèrement alcalin, il est possible d'observer de fortes résistance des leptospires pendant plusieurs mois voire plusieurs années.
Des conditions spéciales sont nécessaires à la multiplication des leptospires in vivo. Une température optimale de 28-30°C est requise ainsi qu'un pH optimal de 7.2 à 7.4, à l'abri de la lumière, en présence d'un milieu contenant des vitamines B1, B12 et de l'ammonium [35, 42, 63]. En plus des facteurs de milieu et d'ambiance, la présence d'hôtes réservoirs est indispensable à la réplication de la bactérie en milieu naturel [63, 106].
In vitro, cette culture est très difficile avec une période d'incubation longue. De plus ce sont des bactéries très fragiles facilement détruites par lyse au bout de 48h dans les tissus et quelques heures dans l'urine. Le temps d'acheminement du prélèvement est donc un critère

déterminant à la réussite de la culture. En pratique le milieu de culture devra contenir des acides gras, des sels d'ammonium et de l'albumine ; le plus utilisé est celui d'Ellinghausen et Mac Cullough modifié par Johnson et Harris (milieu EMJH). Il est possible de conserver des cultures à l'abri de la lumière, à 4°C, ou par congélation à -80°C si cette température est atteinte rapidement.

3) Principaux déterminants de la pathogénicité

i. Action mécanique : mobilité et capacité invasive

Le caractère mobile des leptospires est un facteur de pathogénicité important dans les phases précoces de l'infection et dans la dissémination systémique des bactéries dans l'organisme hôte. L'endoflagelle confère aux leptospires une grande mobilité leur permettant alors de se mouvoir dans des milieux de haute viscosité et de franchir les barrières cutanéo-muqueuses, l'humeur aqueuse ou encore le corps vitré, sans créer de réaction inflammatoire. Elles échapperaient ainsi au système immunitaire non spécifique de l'hôte dans certains tissus. Les leptopsires ne sont pas des bactéries intracellulaires mais elles ont la capacité d'entrer dans les cellules hôtes [69] puis d'en ressortir sans altérer la membrane cellulaire [15, 103]. Ce sont donc des « résidentes transitoires » des cellules hôtes, pouvant échapper à la réponse immunitaire. Plusieurs études menées sur des cellules hépatiques ou rénales d'animaux infectés se sont attachées à rechercher des facteurs d'adhésion des leptospires à la matrice extracellulaire [70]. Avec l'avancée du séquençage génétique, plus de 200 protéines de la membrane externe ont pu être identifiées. En outre, les protéines de surface des bactéries joueraient un rôle déterminant dans l'adhésion et l'invasion des cellules de l'hôte constituant ainsi un facteur majeur de pathogénicité [85, 94]. Parmi elles, les protéines LigA et LigB présentent des similitudes avec les intimines des E.coli. Elles sont exclusivement exprimées à la surface des espèces pathogènes et se lieraient principalement à la fibronectine, permettant la translocation rapide des bactéries au sein des différents tissus, à la différence des espèces saprophytes [19, 28, 44, 85]. Plus récemment, une étude a montré que la protéine LenA se fixerait au plasminogène [110]. Le complexe LenA-plasminogène pourrait ensuite être converti en plasmine, qui à son tour dégraderait le fibrinogène, à l'origine de troubles de la coagulation favorisant la dissémination de la bactérie au sein des tissus hôtes. Par ailleurs, une étude menée sur des cellules rénales de rats a montré que les cellules épithéliales des tubules proximaux rénaux produiraient une grande variabilité de glycosaminoglycanes, créant un véritable biofilm abritant et protégeant les bactéries, expliquant la colonisation massive de cet organe chez les espèces hôtes [89].

ii. Facteurs d'échappement à la réponse immunitaire

Les leptospires peuvent échapper à la réponse immunitaire en échappant à la phagocytose. Une fois adsorbées par les neutrophiles, elles peuvent résister aux peptides bactéricides et être ainsi disséminées à travers les tissus. Une étude a montré que l'activité des peptides bactéricides produits par les neutrophiles varierait selon la souche de leptospire incriminée. La lyse des leptospires par les substances bactéricides ne se produirait qu'en présence d'anticorps spécifiques [95]. Le lipide A et les lipopolysaccharides contenus dans la membrane externe de la bactérie favoriseraient la résistance des leptospires à l'activité bactéricide des peptides, après phagocytose [87]. En outre, les leptospires pathogènes présenteraient une résistance à l'activation du complément [31], par fixation au facteur H, régulateur de la cascade d'activation du complément. Plusieurs protéines de surface constitueraient des récepteurs au facteur H : les protéines LenA (Leptospiral endostatin-like proteinA) et LenB (Leptospiral endostatin-like proteinB) [12, 109], la protéine C4BP [13].

iii. Substances élaborées

Les toxines produites par les leptospires contribuent à leur pathogénicité. Certaines toxines ont plus particulièrement une activité sur les vaisseaux capillaires à l'origine d'endothélite entrainant des thrombopénies, hémorragies voire des mécanismes de coagulation intravasculaire disséminée. Des lésions tissulaires liées à l'anoxie apparaissent alors. Les hémolysines [42, 60] sont des phospholipases ayant la capacité de lyser les érythrocytes. On distingue deux types d'hémolysine : les sphingomyélinases C d'une part, aussi appelées Haemolysis-associated protein-1 (HAP1), ont une action sur les membranes cellulaires des hépatocytes, des cellules endothéliales et des cellules sanguines [96]. D'autre part, les sphingomyélinases H créent des pores dans la membrane des cellules cibles [62].

Le fort pouvoir enzymatique (phospholipase, lipase, sphingomyélinase, hémolysine) des leptospires est donc responsable des lésions à l'échelle cellulaire observées lors d'une infection [19].

iv. Le LPS : un facteur de virulence

Grâce aux techniques de séquençage du génome des leptospires, plus de 140 protéines membranaires ont pu être identifiées et corrélées ou non avec la virulence des différentes souches [80]. Plusieurs facteurs de virulence membranaires ont pu être identifiés comme les facteurs d'adhérence (cf. Première partie, I.B.4.i.), la protéine Omp1L [44] agissant comme une porine. La protéine Loa22 serait un facteur de virulence important car la mutation du gène codant pour cette protéine entrainerait la perte de virulence de l'espèce *Leptospira interrogans* [79]. Inversement la protéine Lip32 ne semble pas constituer un facteur de virulence majeur [78]. Le lipopolysaccharides (LPS) est un autre élément constitutif majeur responsable de la virulence des leptospires. Il est composé d'une part du lipide A qui est une endotoxine et d'autre part de la chaîne des sous-unités O, freinant l'attachement du complexe d'attaque membranaire du complément à la membrane externe. Il possède une activité cytotoxique directe en induisant la libération de médiateurs pro-inflammatoires (Interleukine 1, Tumor Necrosing Factor α (TNF), interféron) par liaison à une protéine sérique LBP (lipopolysaccharide binding protein), elle-même se liant au récepteur CD14 des macrophages [29, 42]. Il a également une action inhibitrice sur les pompes Na+/K+ ATPases du rein [115].

Le caractère pathogène des leptospires repose à la fois sur des substances constitutives de ces bactéries telles que le LPS, véritable activateur de l'inflammation pouvant échapper à l'immunité, et les protéines de la membrane externe, mais aussi sur des substances élaborées : toxines et enzymes responsables de lésions endothéliales et érythrocytaires.

II. Pathogénie de la leptospirose

A. Le risque infectieux

1) La contamination

La contamination s'effectue par exposition de muqueuses saines (oculaires, buccales ou génitales) ou de lésions cutanées (excoriation, abrasions,…) à des eaux ou sols souillés par des urines contaminées. La transmission peut être directe des leptospires à l'hôte accidentel par contact avec de l'urine infectée, par morsure, par voie vénérienne ou transplacentaire. Toutefois la transmission indirecte est la plus fréquente et s'effectue par contact avec des eaux ou des sols contaminés ou encore par ingestion d'aliments contaminés. Les activités nautiques et de baignade en eau douce constituent ainsi une modalité de contamination majeure pour l'homme et les chiens d'eau (Golden retriever, Labrador, Terre-neuve,…). La leptospirose est de plus répertoriée en tant que maladie professionnelle, les agents de maintenance des rives, les forestiers, les égoutiers, les plongeurs et les vétérinaires étant les plus exposés à la maladie.

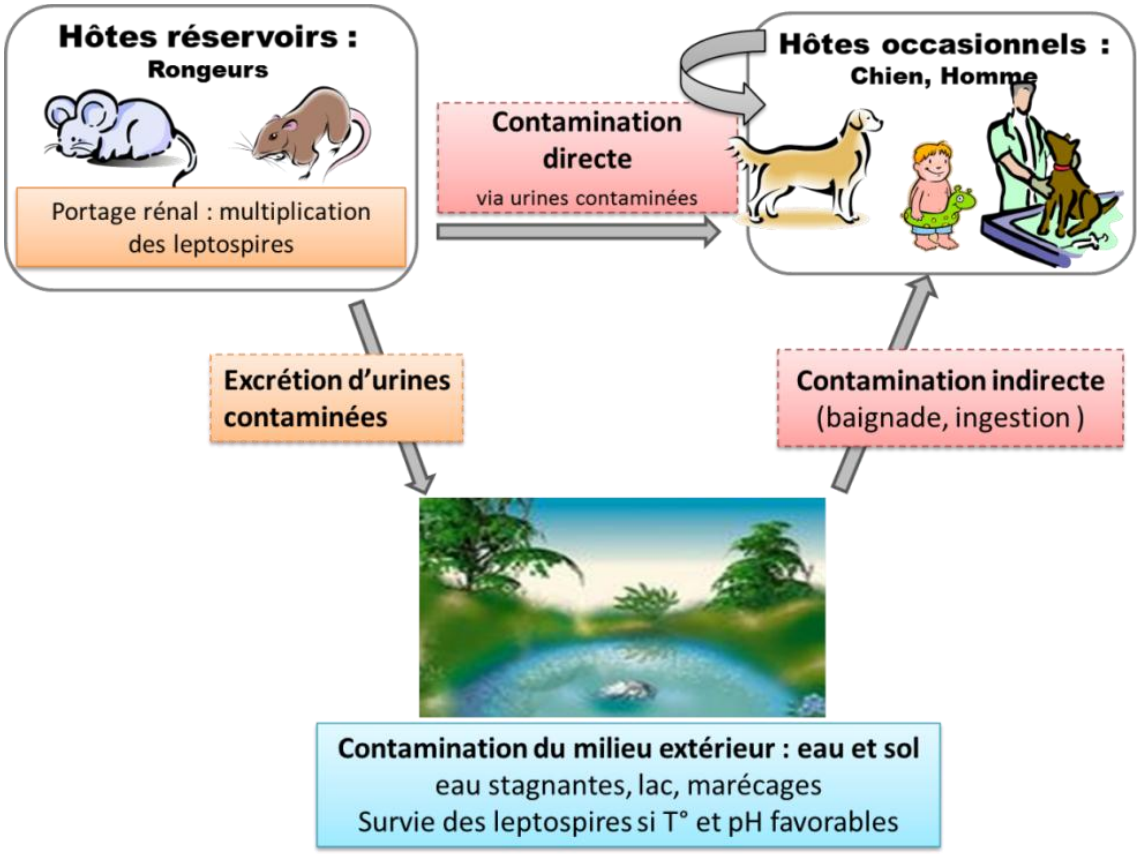

Figure 5 : Cycle Epidémiologique de la leptospirose d'après [9, 14]

2) *Matières virulentes*

La transmission de la bactérie aux hôtes s'effectue principalement par contact avec du sang ou des urines contaminées. Au cours de la première phase de la maladie une courte phase de leptospirémie est observée. Le sang apparait comme la matière virulente la plus précoce, représentant surtout un danger pour le personnel médical lors de prélèvements sanguins sur animaux infectés. Les bactéries étant essentiellement logées dans les tubules rénaux jusqu'à plusieurs semaines après la phase de septicémie, l'urine est la matière la plus virulente d'autant plus efficace qu'elle est excrétée dans le milieu extérieur. Cette persistance des leptospires dans le rein pourrait être liée à la formation d'agrégat et de biofilms les protégeant contre les antibiotiques et contre la réponse immunitaire [89].

Les urines contaminées sont émises par les animaux infectés, dans le milieu extérieur, augmentant le risque infectieux [105].

3) *Hôtes principaux et hôtes occasionnels*

Tous les mammifères peuvent être atteints de leptospirose. Toutefois certains sérovars tendent à être associés à une espèce donnée, appelée hôte principal (cf. tableau 2) [55, 105]. La faune sauvage constitue le principal réservoir des leptospires, contenant la plupart des hôtes principaux, les rongeurs étant les plus importants en terme de fréquence et de nombre [8]. L'hôte principal est réceptif à l'infection mais présente des formes cliniques frustres ou subcliniques [19]. Il est responsable de la dissémination dans l'environnement des leptospires par ses urines, durant plusieurs années, après colonisation, puis multiplication des bactéries dans les tubules rénaux. Par exemple le rat constitue l'hôte principal du sérovar Icterohaemorrhagiae, le chien est l'hôte principal du sérovar Canicola.

Sérovars	Hôte principal
L. canicola	Chien
L. icterohaemorrhagiae	Rats, ragondin, cervidés, renard
L. grippotyphosa	Raton laveur, opossum, mouffette
L. australis	Hérisson
L. autumnalis	Souris
L. hardjo	Bovins
L. bratislava	Porcs
L. pomona	Porcs, bovins, lièvre

Tableau 2 : Hôtes réservoirs des principaux sérovars infectant le chien [55, 107]

Les hôtes principaux sont ainsi source d'agents pathogènes pour d'autres animaux appelés hôtes accidentels ou hôtes secondaires occasionnels, dont l'Homme fait partie, ayant une

faible réceptivité mais une forte sensibilité, développant alors des symptômes plus marqués que les réservoirs [60]. En outre, les hôtes accidentels infectés peuvent également constituer une source d'agent infectieux : soit durant la phase clinique de leptospirurie, soit après guérison clinique durant une phase de portage et d'excrétion asymptomatique pouvant perdurer des années [8]. Il semblerait que la spécificité du sérovar pour une espèce ait des conséquences sur la transmission et l'expression de la leptospirose [75, 113]. Lorsque l'hôte serait infecté par un sérovar spécifique et deviendrait hôte principal, il présenterait une forte contagiosité avec une émission d'urines riches en leptospires. A l'inverse, s'il est infecté par un sérovar dont il n'est pas l'hôte principal, le pouvoir pathogène serait plus fort et la réponse immunitaire de l'hôte occasionnel plus importante ; il en résulterait une infection rénale de plus courte durée et donc une plus faible contagiosité. Cette hypothèse ne semble pas avoir été vérifiée aujourd'hui.

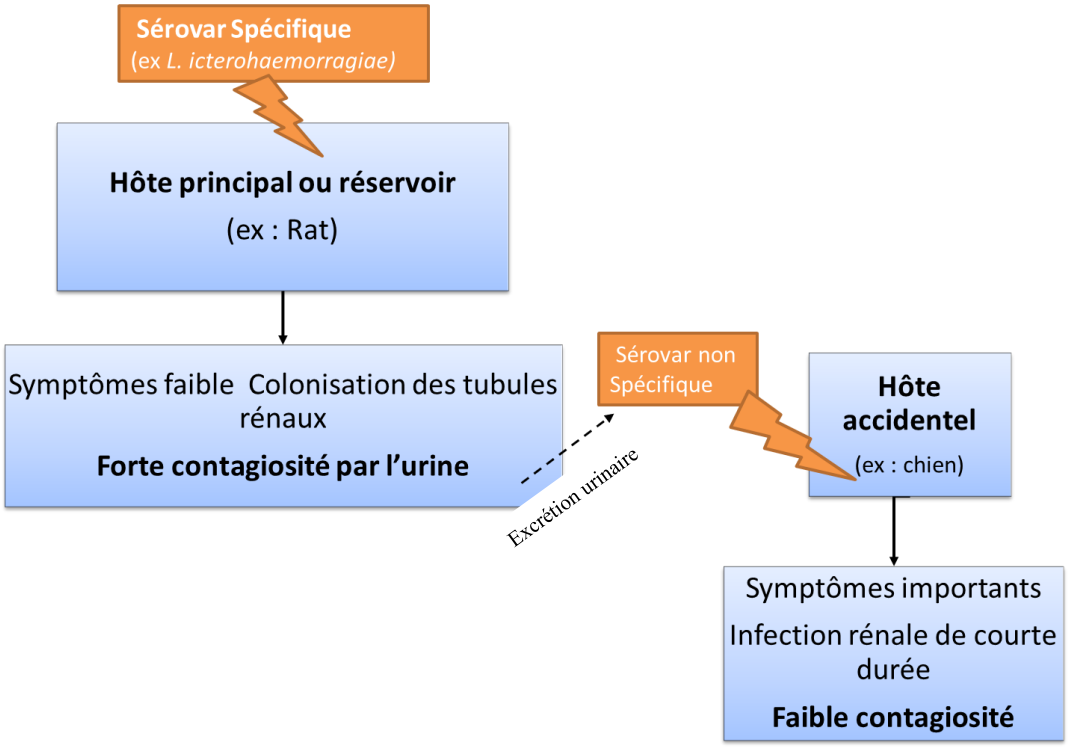

Figure 6 : Hypothèse quant à l'incidence de la nature du sérovar sur l'expression et la transmission de la leptospirose chez le chien [75]

B. Schéma pathogénique général

Après pénétration au travers de la barrière cutanéo-muqueuse, grâce à leur motilité et à leur finesse, les leptospires se dispersent dans l'organisme jusqu'au secteur vasculaire où elles s'y multiplient (cf. Figure 7). La phase d'invasion ou phase de dissémination systémique dure entre 3 et 7 jours après l'exposition ; les bactéries sont décelables entre le 4ème et le 10ème jour dans le sang, période durant laquelle une hémoculture est réalisable. Branger et al. a montré que sur une population de chiens infectés expérimentalement, les PCR réalisées sur sang étaient toutes positives à partir du quatrième jour post infection et les PCR réalisées sur urines étaient toutes positives à partir du huitième jour post infection [22]. Lors de l'invasion vasculaire, certaines toxines bactériennes provoquent des lésions endothéliales à l'origine d'hémorragie et de thrombopénie [4, 63, 83].

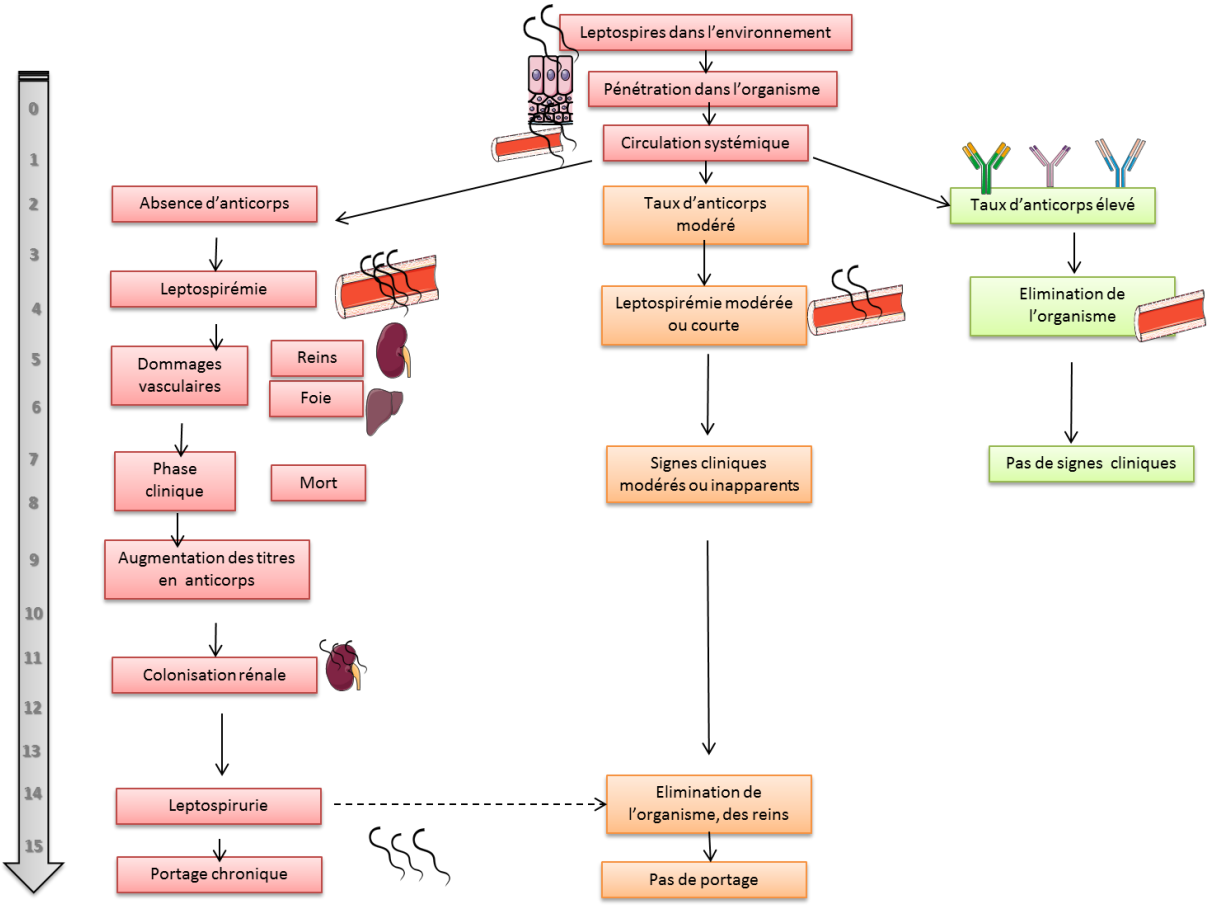

Figure 7 : Schéma pathogénique général de la leptospirose d'après [42]

A partir de cette phase de leptospirémie, les bactéries diffusent par voie sanguine jusqu'aux organes cibles tels que les reins, le foie, la rate, le système nerveux central, les poumons, les yeux ou encore le tractus génital [60]. Si l'animal survit à cette phase aiguë, il peut soit garder des séquelles de la maladie comme une insuffisance rénale chronique, soit présenter une rémission totale. Dans les deux cas un portage rénal asymptomatique avec excrétion de

leptospires dans les urines peut être observé et perdurer plusieurs années. Toutefois le schéma pathogénique théorique est à moduler selon la réponse immunitaire de l'hôte. En théorie, si le taux d'anticorps est important, les bactéries sont éliminées rapidement de l'organisme et l'hôte ne présentera pas de signes cliniques. A l'inverse un animal ne présentant pas d'anticorps, non vacciné, n'ayant pas eu de contact ancien avec la bactérie, peut présenter une phase de leptospirémie très précoce. Enfin, chez un animal présentant un taux d'anticorps modéré, la leptospirémie serait plus courte et les signes cliniques modérés ou inapparents avec absence de phénomène de portage asymptomatique [42]. Toutefois certains animaux vaccinés peuvent présenter des formes cliniques importantes ce qui remet en cause cette hypothèse théorique, la réalité biologique de la pathogénie de la leptospirose étant non encore totalement élucidée. Tout dépend néanmoins du sérogroupe infectant.

C. Réponse immunitaire de l'hôte

La dose minimale infectieuse expérimentale nécessaire au déclenchement de l'infection chez le hamster varie entre 10^3 et 10^8 bactéries. Elle dépendrait de l'hôte, du sérovar et de la souche en question [97].

Face à l'infection, une réaction immunitaire apparaît chez l'hôte. Cette réaction fait intervenir deux types d'anticorps, les anticorps agglutinants mis en évidence dans le test de dépistage sérologique de micro agglutination et les anticorps neutralisants conférant à l'hôte l'immunocompétence induite soit par des antigènes vaccinaux, soit par des antigènes de leptospires infectants de l'environnement.

Sept à neuf jours après infection, le test de micro agglutination permet ainsi la détection d'anticorps agglutinants, la réponse sérologique maximale correspondant à trois semaines post infection (cf. figure 8). Les anticorps produits sont spécifiques du sérogroupe infectant [6]. Toutefois le titre en anticorps agglutinants n'est pas proportionnel au niveau de protection de l'individu [32].

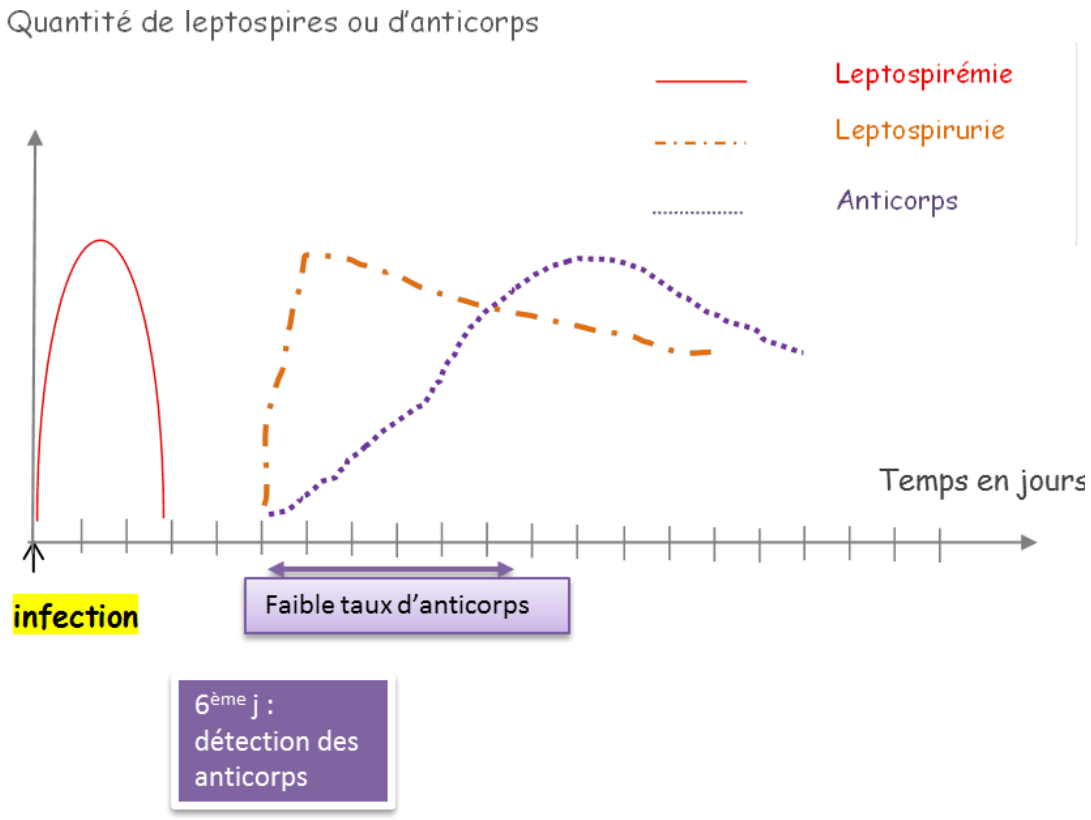

Figure 8 : Evolution de la quantité de leptospires ou d'anticorps par rapport à la date d'infection [51]

Parmi les anticorps, différentes classes d'immunoglobulines sont détectables après une stimulation antigénique. Les anticorps de type immunoglobuline M (IgM) sont détectables dès le cinquième, sixième jour : ils constituent la réponse primaire de courte durée suivant l'exposition à l'antigène ; ces anticorps retardent la multiplication des leptospires sans les inhiber totalement. En revanche, les immunoglobulines G (IgG) ne sont détectées qu'à partir de deux à trois semaines, pendant une plus longue durée, à la faveur d'une seconde stimulation antigénique. Les IgG lysent les leptospires circulants [49].

Selon le sérogroupe incriminé et les capacités de défense de l'animal infecté, la leptospirose est une maladie protéiforme pouvant prendre quatre grandes formes d'expression clinique, suraiguë, aiguë, subaiguë ou chronique, caractérisées par leur durée d'évolution et la gravité de leurs symptômes.

III. Présentations cliniques de la maladie

A. Différentes formes cliniques

1) *Formes suraiguës*

Une forme suraiguë avec une phase de leptospirémie intense mène à une mort brutale en 48h, accompagnée de très peu de signes cliniques. Des troubles de la coagulation à l'origine de phénomènes de coagulation intra vasculaire disséminés peuvent être observés. Les sujets de jeune âge sont plus touchés que les sujets âgés [9].

2) *Formes aiguës et subaiguës*

Les formes aiguës de leptospirose sont presque toujours accompagnées de symptômes généraux. On distingue fréquemment des signes d'abattement (81 à 97% des cas), d'anorexie (25 à 94 % des cas), de fatigabilité (20 à 52%), de déshydratation (6 à 54% des cas), de perte de poids (8 à 44% des cas) associés à une hyperthermie (8 à 36% des cas) ou une hypothermie (3 à 32% des cas) [20, 39, 51, 59, 74].

Etudes / **Signes observés**		**GEISEN V. et al. (2007) sur 42 chiens**	**MILLER R.I. et al. (2007) sur 40 chiens**	**KOHN B. et al. (2010) sur 50 chiens**	**BIRNBAUM et al. (1998) sur 36 chiens**	**HAZART G. et al. (2010) sur 37 chiens**
Symptômes généraux	Hyperthermie	36%	10%	8%	11%	27%
	Hypothermie	17%	3%	6%		32%
	Abattement	81%		90%	58%	97%
	Fatiguabilité	52%	27%	20%		
	Déshydratation	31%	20%	6%	36%	54%
	Perte de poids	17%	8%		44%	
	Anorexie	76%	25%	84%	67%	94%
Symptômes spécifiques	Vomissements	57%	52.5%	72%	50%	81%
	Polyuro Polydispie			8%	50%	16%
	Oligo-anurie				6%	49%
	Ictère	45%	65%	10%	11%	19%
	Muqueuses pâles		2.5%	10%		
	Diarrhée	40%	10%	50%	33%	
	Douleur abdominale	19%	13%	36%	33%	
	Ecchymoses/pétéchies		3%			
	Epistaxis		3%			
	Hématurie	31%		2%	6%	
	Dyspnée			62%	3%	

Tableau 3: Tableau récapitulatif de la fréquence des signes cliniques associés aux formes aiguës de leptospirose selon les études [20, 39, 51, 59, 74]

i. Formes typiques

a) Forme rénale

Les reins sont les organes cibles les plus touchés lors de la migration tissulaire des leptospires. Une étude menée en 1976 a permis de démontrer les étapes de colonisation rénale par des leptospires du sérogroupe Pomona, inoculées expérimentalement à des souris. Ainsi deux jours post inoculation, les bactéries se trouvaient dans la lumière des capillaires sanguins rénaux, quatre à huit jours post inoculation, elles étaient retrouvées dans le parenchyme rénal avant d'être mise en évidence au dixième jour post inoculation dans les cellules tubulaires proximales, puis dans la lumière tubulaire [66].

La migration des leptospires des capillaires sanguins aux tubules rénaux associée à la présence de toxines et des produits de lyse qu'elles élaborent constituent les principaux facteurs à l'origine de l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë [114].

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est le syndrome le plus fréquemment rencontré lors d'une infection leptospirosique. Cinquante-sept à 100% des chiens atteints par la leptospirose développent une forme aiguë d'insuffisance rénale [3, 20, 39].

L'IRA se manifeste par l'association de symptômes généraux, de troubles urinaires et de vomissements. L'IRA se déclare le plus souvent par une polyuro-polydipsie (8 à 50% des cas selon les études) pouvant évoluer vers une oligo-anurie (6 à 49% des cas) [51]. Les vomissements observés dans 50 à 81% des cas s'expliquent en partie par la présence d'un syndrome urémique. Une glucosurie sans hyperglycémie peut être observée, induite par les lésions tubulaires.

Ces atteintes rénales aiguës peuvent être réversibles, entrainer la mort de l'individu, ou évoluer en forme chronique chez les individus survivant à l'infection [50].

b) Forme hépatique

Le foie est l'organe le plus fréquemment affecté par les leptospires après les reins. Les leptospires sont à l'origine d'une nécrose centrolobulaire associée à une atteinte des hépatocytes et des canaux biliaires par action des toxines leptospirosiques [45]. La cholestase intra-hépatique et la nécrose hépatique peuvent alors entrainer un ictère présent dans 10 à 65% des cas [74, 51]. Une anorexie associée à des troubles digestifs tels que de la diarrhée, des vomissements et des saignements digestifs peuvent également être expliqués par une atteinte hépatique [42].

ii. Formes atypiques

a) Forme respiratoire

Des formes respiratoires sont décrites essentiellement chez l'Homme, peu de données étant disponibles sur ces formes atypiques chez le chien [20, 59].

Chez l'Homme 20 à 85% des formes aiguës de leptospirose se traduisent par une atteinte pulmonaire. Une toux (3 à 20% des cas), une dyspnée (3 à 35% des cas), des douleurs thoraciques et une hémoptysie sont les symptômes les plus fréquemment rencontrés [60].

Une étude parue en 2010 menée par Konh B. et al. en Allemagne sur 50 chiens a mis en évidence les anomalies respiratoires cliniques et radiographiques présentes chez des chiens atteints de leptospirose. Trente-et-un chiens (62%) montraient des signes cliniques respiratoires, se traduisant par de la dyspnée présente à l'admission pour 19 d'entre eux ou se manifestant dans les quatre premiers jours suivant l'admission pour les quatre autres. Trente-cinq chiens (70%) présentaient des lésions pulmonaires radiographiquement visibles, dont les 31 chiens présentant une dyspnée. Parmi les 31 chiens dyspnéiques, sept (23%) avaient présenté un épisode d'hémoptysie fatal. Une thrombopénie serait en partie à l'origine des hémorragies pulmonaires. Cette étude met en avant une corrélation entre le pronostic vital et la sévérité de la dyspnée [59].

b) Syndrome hémorragique

Les saignements se traduisent par des ecchymoses, des pétéchies (3% des cas), de l'épistaxis (15% des cas), de l'hématémèse (14% des cas), de l'hémochésie ou du méléna (3 à 15% des cas) [20, 39, 68, 74]. De l'hématurie est rapportée dans 2 à 31% des cas [39, 20]. Ces hémorragies peuvent également siéger au niveau des muqueuses pulmonaires et rénales [45]. Des troubles de l'hémostase peuvent être la conséquence d'une thrombopénie associée ou non à un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Les lésions endothéliales toxiques causées par les leptospires entrainant des vascularites sont à l'origine d'une CIVD [45].

c) Forme nerveuse

Les leptospires pénétrant le système nerveux central par le liquide céphalo rachidien peuvent être à l'origine d'une inflammation se traduisant par une méningite ou une encéphalite, associées à des convulsions et des parésies. Ces formes nerveuses sont associées à la leptospirose chez l'homme mais peu décrites chez le chien [45]. Une étude publiée en 1998 a montré la présence d'ADN de leptospires dans du liquide céphalorachidien de patients

humains atteints de méningite aseptique [91]. Un rapport récent effectué en Inde présente la nécessité d'inclure la leptospirose dans le diagnostic étiologique de la méningoencéphalite chez l'homme [56].

d) Forme oculaire

Peu décrite chez le chien, cette forme est bien connue chez l'homme, à l'origine d'une congestion oculaire pouvant évoluer vers une kératite. La mise en évidence de leptospires dans l'humeur aqueuse a par ailleurs été décrite [45]. Plusieurs études ont rapporté des cas d'uvéites chez des chiens atteints de leptospirose [3, 104].

e) Forme cardiaque

Les hommes atteints de leptospirose présentent fréquemment des myocardites, des endocardites et des péricardites [1]. Le syndrome urémique, très fréquent lors de leptospirose, est considéré comme l'une des causes de lésions cardiaques [34]. La forme myocardique est peu décrite chez le chien. Une étude menée en 2007 a montré une élévation de la concentration sanguine en troponine cardiaque I (cTnI) chez des chiens atteints de leptospirose, indépendamment du taux d'urée plasmatique. Les lésions cardiaques pourraient donc exister chez le chien et seraient directement liées à l'infection leptospirosique [68].

3) Formes chroniques

Ces formes se rencontrent en général sous forme de séquelles chez les chiens qui survivent aux formes aiguës de leptospirose.

Le foie et les reins sont les deux principaux organes lésés dans cette forme, chez le chien. On distingue des insuffisances rénales chroniques et des hépatites chroniques.

Un animal ayant survécu à la phase aiguë ou subaiguë de la maladie est susceptible de présenter une évolution de la maladie avec une progression d'une IRA en insuffisance rénale chronique. L'atteinte rénale chronique se traduit généralement par une polyuro-polydipsie s'accompagnant de diarrhée et de vomissements, d'anorexie et de perte de poids [51, 60].

Les hépatites leptospirosiques chroniques se caractérisent par des lésions de fibrose divisant les lobules du foie, associées à une cholestase [2]. Ces lésions hépatiques se manifestent par une perte de poids, une anorexie chronique, une hypoalbuminémie à l'origine d'ascite, une hyperglobulinémie et un défaut de synthèse des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. Des signes d'encéphalose hépatique peuvent être observés dans les cas avancés [60].

Plus rarement, des formes oculaires chroniques peuvent être observées. Des uvéites chroniques et des cataractes engendrées par les réactions entre les antigènes leptospirosiques et les tissus oculaires peuvent se développer. Cette forme chronique oculaire est particulièrement décrite chez l'homme et le cheval [45].

4) Formes subcliniques

Les formes subcliniques sont des infections leptospirosiques sans répercussions cliniques chez l'individu infecté. Plusieurs études menées sur des chiens cliniquement sains ont permis de supposer l'existence de formes subcliniques de leptospirose. Des études de séroprévalence ont été menées [93, 101] ainsi que des études de mise en évidence directe de la bactérie sur urines de chiens apparemment sains [48, 90, 108]. Celles-ci seront détaillées dans la deuxième partie, paragraphe VI.

B. Corrélation entre le sérogroupe et la forme clinique

Des études ont tenté d'établir une corrélation entre le sérogroupe infectant et la présentation clinique de la maladie [39, 41].

Aujourd'hui aucune corrélation significative entre le sérogroupe infectant et la manifestation clinique n'a pu être établie, lors d'infections naturelle par des leptospires pathogènes tant chez l'Homme que chez le chien. Des sérogroupes différents ont pu être mis en évidence pour une même forme clinique chez des patients humains [63].

Ceci peut s'expliquer par la faible capacité des tests sérologiques à déterminer le sérogroupe infectant d'une part, et par l'existence de transfert latéral de facteurs de virulence entre sérovars, d'autre part [58, 5]. L'isolement des souches pathogènes, la caractérisation moléculaire permise par les avancées génétiques devraient pouvoir apporter des réponses dans les années à venir [102].

C. Lésions tissulaires et organiques

1) Lésions rénales

L'infection des tubules rénaux par des leptospires est associée à des lésions de néphrite tubulo-interstitielle et de nécrose tubulaire [20, 59]. Les néphrites interstitielles et les glomérulonéphrites proliférative seraient corrélées à la séropositivité. Ces données sont issues d'une étude portant sur des chiens errants, de statut vaccinal inconnu, présentant des titres MAT élevés contre au moins un sérogroupe de L. interrogans [82].

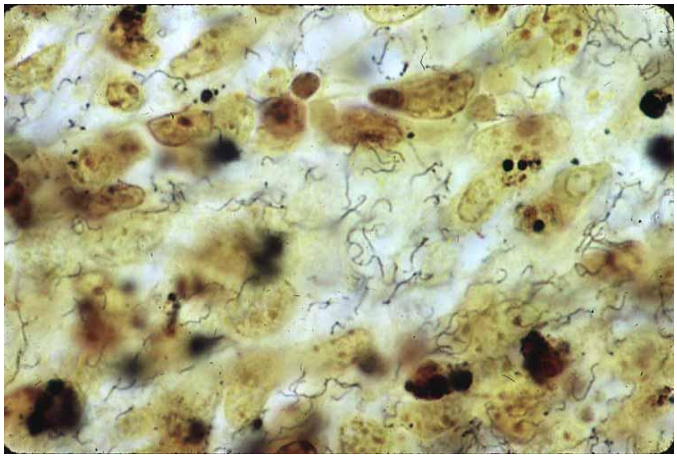

Figure 9 : Coupe histologique d'un rein de chien atteint de leptospirose montrant des leptospires (Coloration Warthin-Starry) (avec l'aimable autorisation du laboratoire d'histopathologie de VetagroSup Campus Vétérinaire de Lyon.)

2) Lésions hépatiques

Macroscopiquement, le foie peut apparaitre hypertrophié, décoloré et friable.

Les lésions histologiques sont celles d'une hépatite dégénérative avec présence de zones nécrosées entourées d'infiltration neutrophilique et lymphocytaire. Une congestion hépatique et une cholestase intra-hépatique sont alors mises en évidence [20, 59].

3) Lésions pulmonaires

Dans l'étude menée par Konh et al., sur 50 chiens atteints cliniquement de leptospirose, 35 montraient des modification radiographique pulmonaires. Dix chiens parmi ces derniers ont été autopsiés. Les dix chiens présentaient des hémorragies diffuses pulmonaires, alvéolaires et parenchymateuses avec des lésions nécrotiques multifocales des parois alvéolaires. A l'histologie, une congestion alvéolaire avec présence d'œdème était notée, ainsi que des infiltrations parenchymateuses lymphocytaires et neutrophiliques. Un chien présentait une pneumonie suppurée multifocale, deux chiens présentaient une pneumonie interstitielle lymphocytaire diffuse [59].

DEUXIEME PARTIE : DIFFERENTES METHODES DIAGNOSTIQUES DE LA LEPTOSPIROSE

I. Eléments de suspicion

A. Suspicion épidémiologique : facteurs de risques

Il est avéré que les mâles entiers présentent un risque supérieur significatif par rapport aux femelles non stérilisées en rapport possible avec un comportement exploratoire favorisant les contacts avec des milieux potentiellement contaminés [112, 51, 20, 111]. Le dernier rapport du consensus de l'ACVIM [102] souligne ce facteur de risque significatif.

L'activité et la race constituent des facteurs de risques significatifs rapportés dans plusieurs études. Un chien se baignant dans les eaux douces et/ou buvant dans les eaux stagnantes risque plus fortement d'être exposé aux leptospires [40]. De plus, si la zone d'habitation du chien est peuplée de faune sauvage (rongeurs) le taux d'exposition et par conséquent le risque infectieux augmente. Ainsi les races de chiens de chasse et d'eau de grande taille sont sensiblement plus à risque [3, 102].

L'âge ne semble pas constituer un facteur de risque significatif, les tranches d'âge à risque variant selon les études de jeunes adultes pour certaines [108], à chiens d'âges moyen [112] ou très âgés [40] pour d'autres. Toutefois, les chiens d'âge moyen auraient un mode de vie plus actif à l'extérieur à l'origine d'une augmentation de leur exposition potentielle aux leptospires [112].

La saisonnalité de la maladie est également très marquée, avec une recrudescence aux saisons chaudes et humides variant selon le climat du pays considéré [20, 74, 111]. La chaleur et l'humidité favorisent en effet le maintien des leptospires dans le milieu extérieur. En outre les zones fréquemment inondées constituent un milieu favorable à la survie des leptospires, développant une incidence plus forte de cas de leptospirose [112].

B. Suspicion clinique

La leptospirose peut se présenter, lorsqu'elle est cliniquement exprimée selon un mode suraiguë (mort brutale), chronique ou subaiguë. (cf. Première partie III.)

Lors de formes subaiguë à aiguë, des symptômes généraux peu spécifiques (abattement, anorexie, hyperthermie ou hypothermie) sont généralement associés à des symptômes hépatiques (ictères), rénaux (polyuro-polydipsie, oligo-anurie) ou digestifs (vomissements, diarrhée). Toutefois d'autres symptômes atypiques respiratoires (dyspnée), oculaires ou

nerveux doivent attirer particulièrement l'attention du clinicien, tout comme la présence de saignements d'origine cutanée, digestive ou respiratoire.

Devant la non spécificité du tableau clinique, le praticien est amené à réaliser des examens complémentaires pour préciser le diagnostic.

C. Eléments de suspicion para cliniques

1) Modification des paramètres hématologiques, biochimiques et urinaires

Le tableau suivant présente les fréquences des anomalies biologiques rencontrées lors de leptospirose selon les études.

Paramètres biologiques \ Etudes		**GEISEN V. et al (2007) sur 42 chiens**	**MILLER R.I. et al (2007) sur 40 chiens**	**KOHN B. et al.(2010) sur 50 chiens**	**BIRNBAUM et al.(1998) sur 36 chiens**	**HAZART G. et al. (2010) sur 37 chiens**
NFS	Anémie	45%	17%	50%	33%	
	Leucocytose	81%	61%	68%	31%	
	Thrombopénie	53%		58%		
Biochimie	PAL augmentées	81%	94%	90%	56%	51%
	AlAT augmentées	74%	61%	78%	33%	26%
	AsAT augmentées		50%		39%	
	Créatinine élevée	57%	100%	88%	83%	78%
	Urée élevée	57%	100%	88%	81%	78%
	Hyperphosphatémie		94%		50%	
	Hyper bilirubinémie	79%	94%	73%	17%	
Analyse urinaire	Hématurie	71%		68%	27%	79%
	Protéinurie	71%		94%	28%	76%
	Glucosurie sans hyperglycémie associée	71%		82%	9%	64%
iono-gramm	Hyperkaliémie		22%			
	Hypochlorémie		78%			
	Hyponatrénie		28%			

Paramètres biologiques \ Etudes		MASTRORILLI et al. (2007) sur 20 chiens	GOLDSTEIN et a. (2006) sur 55 chiens	BROWN et al.(1996) 11 chiens	ADIN et al. (2000) sur 36 chiens [3]	HARKIN et al. (1996) sur 17 chiens
NFS	Anémie	30%	53%			18%
	Leucocytose	50%	37%		55%	53%
	Thrombopénie		30%		55%	24%
Biochimie	PAL augmentées	50%	57%	30%		65%
	AlAT augmentées	55%	32%	11%		35%
	AsAT augmentées	55%	56%			
	Créatinine élevée	80%	93%	100%	100%	83%
	Urée élevée	80%	93%	100%	100%	83%
	Hyperphosphatémie	75%	78%			47%
	Hyperbilirubinémie	45%	41%	20%	22%	41%
Analyse urinaire	Hématurie	89%			83%	42%
	Protéinurie	90%	76%		83%	33%
	Glucosurie sans hyperglycémie associée	60%	30%		26%	
iono-gram	Hyperkaliémie	25%	41%			12%
	Hypochlorémie	20%	46%			
	Hyponatrénie	15%	17%			

Tableau 4: Fréquence des anomalies biologiques rencontrées selon les études [20, 24, 39, 41, 46, 51, 59, 68, 74]

Les analyses biochimiques sanguines réalisées dans les différentes études révèlent une azotémie dans 57% à 100% des cas, une augmentation plus fréquente des PAL (30% à 94% des cas) que des AlAT (11% à 78% des cas) [74, 24, 39, 59].
Une hyperphosphatémie est observée dans 47 à 94% des cas, et une hyperbilirubinémie dans 17% à 94% des cas [74, 46, 20].

Les analyses de la numération et formule sanguine révèlent une anémie dans 17% à 53% des cas [41, 74], une thrombopénie dans 24 à 58% des cas et une leucocytose dans 31% à 81% des cas [20, 39, 46, 59]. L'anémie peut être la conséquence d'hémorragies secondaires aux lésions de vascularites engendrées par les toxines leptospirosiques, ou encore la conséquence de processus immun. La thrombopénie peut résulter des hémorragies consécutives aux lésions de vascularites ou de phénomènes de CIVD.

Les analyses urinaires ont révélé une hématurie dans 27% à 89% des cas, une protéinurie dans 28% à 94% des cas et une glucosurie sans hyperglycémie associée dans 9% à 82% des cas [20, 59, 68].

Les modifications du ionogramme révèlent une hyperkaliémie (12% à 41% des cas), une hypochlorémie (26 à 78% des cas) et une hyponatrémie (15 à 28% des cas) [41, 46, 73, 74].

L'analyse biochimique et l'analyse urinaire se révèlent essentielles à l'orientation diagnostique du clinicien. En effet, la présence d'une azotémie ou l'augmentation des paramètres fonctionnels et/ou lésionnels hépatiques reflétant une insuffisance rénale et/ou une hépatopathie sont des signes d'appel forts. La présence d'une glucosurie sans hyperglycémie associée laisse suspecter une tubulopathie aiguë dont le diagnostic différentiel est très restreint, la leptospirose étant la cause la plus probable. La leptospirose provoque en effet l'excrétion de molécules de faible poids moléculaire à l'origine de lésions tubulaires, entrainant une fuite d'ions sodium, d'eau et de glucose.

2) Apport de l'imagerie dans le diagnostic de la leptospirose

i. Echographie abdominale

Plusieurs auteurs ont tenté de déterminer les lésions rénales visibles à l'examen échographique chez des chiens atteints de leptospirose [3, 20, 36, 51].

Une hyperéchogénicité du cortex rénal (8 à 75% des cas), une néphromégalie (50% des cas), une pyélectasie (17 à 45% des cas) sont des anomalies non spécifiques régulièrement observées [3, 20, 36, 51]. Dans l'étude de Forrest et al. menée en 1998 sur 20 chiens, un anneau médullaire hyperéchogène était observé dans 30% des cas, associé à un épanchement périrénal dans 25% des cas [36]. Cependant la spécificité de ce signe a été démentie par la suite [65].

L'étude menée par Hazart et al. a montré par ailleurs que 23% des chiens atteints présentaient une hyperéchogénicité hépatique et 12% des chiens atteints une hypoéchogénicité hépatique [51].

ii. Radiographie thoracique

Une étude menée par Baumann et al. sur 5 chiens atteints de leptospirose, dont un seul présentait des signes de dyspnée, a permis de mettre en évidence des anomalies radiographiques du parenchyme pulmonaire en région caudo-dorsale chez tous les chiens [17].

Dans une étude plus récente de Kohn et al. menée sur 50 chiens atteints de leptospirose, les radiographies thoraciques révèlent des modifications des champs pulmonaires chez 35 chiens

(70% des cas) dont 31 (62%) présentaient une dyspnée. Une opacification interstitielle était observée dans 14% des cas, une opacification généralisée faible à modérée de type réticulo-nodulaire interstitielle était observée dans 40% des cas et une opacification sévère de type réticulo-nodulaire associée à une opacification alvéolaire était observée dans 16% des cas. Les lésions étaient réparties majoritairement en région caudo-dorsale des poumons. Elles seraient compatibles avec des hémorragies diffuses engendrées par des lésions endothéliales, à l'origine d'une augmentation de la perméabilité capillaire pulmonaire, plus marquée en région pulmonaire caudo-dorsale [59].

Ainsi l'examen de radiographie thoracique révèle très fréquemment des opacifications pulmonaires chez les chiens atteints de leptospirose qu'ils présentent ou non des symptômes respiratoires.

II. Outils diagnostiques disponibles en routine

Compte tenu de la diversité du tableau clinique de la leptospirose, le recours à des tests de laboratoire spécifiques est indispensable pour confirmer une suspicion clinique d'infection. Les outils disponibles reposent sur des techniques de mise en évidence directe ou indirecte de la présence de leptospires dans les prélèvements biologiques.

A. Différentes méthodes diagnostiques

1) Diagnostic indirect

Les traces du passage de l'agent infectieux chez un individu peuvent être mises en évidence par différentes méthodes de diagnostic indirect par sérologie.

Les différentes techniques de diagnostic indirect regroupent principalement la sérologie par microagglutination (MAT) et par méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

La sérologie ELISA permet de mesurer les taux d'immunoglobuline M (IgM) et d'immunoglobuline G (IgG) produits contre les leptospires, à partir de préparations d'antigènes mis en présence du sérum à tester. Les IgM sont détectable dès la première semaine post infection de manière très fugace, les IgG ne sont détectables que deux à trois semaines post infection et persistent plusieurs mois post infection. Ainsi cette méthode permet de différencier un animal vacciné ou ayant eu un contact ancien avec l'agent infectieux (taux d'IgG élevé) d'un animal récemment infecté (taux d'IgM élevé), et ainsi de dater l'infection [39,60]. Le recours à cette méthode permet de s'affranchir d'une cinétique souvent

indispensable avec la méthode MAT pour parvenir à un diagnostic. Cependant cette méthode reste peu exploitée dans le diagnostic de la leptospirose car elle requiert des réactifs spécifiques de sérogroupe.

La technique de microagglutination, permettant la mise en évidence d'anticorps agglutinants contre différents sérogroupes à partir de sérum d'animaux suspects est la technique de référence utilisée pour le diagnostic de la leptospirose que nous développerons ci-après.

2) Diagnostic direct

Les leptospires et leurs composants peuvent également être détectés par des méthodes directes à partir des tissus ou de l'urine d'animaux suspects.

L'examen microscopique, réalisé sur sang ou urine est très peu sensible et n'est utilisable que sur des animaux présentant une leptospirurie ou une leptospirémie supérieure à cent mille germes par millilitre [7]. De plus cette technique peu spécifique ne permet pas la distinction entre leptospires saprophytes et pathogènes [63]. En outre cette technique nécessite un observateur expérimenté sous peine d'obtenir des résultats faux positifs. La faible utilisation en routine de cette méthode s'explique par son manque de spécificité et de sensibilité.

La mise en culture des leptospires permet un diagnostic de certitude mais tardif, très difficilement réalisable, donc très peu utilisé en pratique. De nombreux faux négatifs sont observés du fait de la fragilité des bactéries et des conditions particulières rigoureuses de mise en culture [48]. Cette technique n'est donc pas utilisée en routine.

Du fait de la difficulté du diagnostic bactériologique classique, des techniques moléculaires de détection d'ADN dans les échantillons suspects ont été proposées. La méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), consiste à amplifier *in vitro* le matériel génétique de l'agent infectieux. Cette technique très sensible, utilisée actuellement est détaillée ci-après.

B. Diagnostic indirect : sérologie par technique Microagglutination (MAT)

1) Principe

Cette technique consiste à évaluer avec un microscope à fond noir, le degré d'agglutination des cultures de leptospires par le sérum du malade.

Elle est actuellement le test de référence de diagnostic de la leptospirose.

Les antigènes sont composés des souches représentatives des principaux sérogroupes représentés dans la zone géographique considérée. Le laboratoire utilise en général une

vingtaine de souches de référence représentatives des sérogroupes ayant la plus forte séroprévalence dans la région.
Les anticorps agglutinants sont des IgM puis plus tardivement et inconstamment des IgG.
Le titre sérologique correspond à la plus haute dilution de sérum agglutinant 50% des leptospires [21, 113]. Le sérum est alors considéré positif pour la souche testée. Ainsi plus le taux d'anticorps présent dans le sérum est important, plus le titre sera élevé.
Les anticorps agglutinants sont présents une semaine à 15 jours après contamination, la sérologie par microagglutination reste donc une méthode diagnostique relativement tardive.

2) *Limites d'interprétation des résultats*

Le titre seuil de positivité (soit l'inverse de la dernière dilution pour laquelle on observe 50% d'agglutination) est fixé par le laboratoire en tenant compte de l'espèce et de la prévalence dans la zone géographique considérée. Cependant l'importance de l'élévation des titres dépend de la pression d'infection au sein d'une population donnée, le titre seuil de positivité varie donc selon le contexte épidémiologique régional. Plus la pression d'infection est élevée, plus le seuil de positivité est grand [63].
Concernant la détermination du sérogroupe infectant, il est supposé être celui qui a le plus fort titre en anticorps. [74]. Toutefois un titre positif unique élevé ne suffit pas à confirmer le diagnostic d'une leptospirose, un titre positif élevé pouvant être observé chez des animaux asymptomatiques [102].
Il est important, pour l'interprétation des résultats de se rappeler que les anticorps agglutinants mis en évidence par cette technique sont spécifiques du sérogroupe auquel appartient la souche bactérienne mise en contact, ils ne sont pas spécifiques du sérovar. Lors de réactions à titres multiples, le sérogroupe incriminé ne peut être déterminé que s'il existe un écart d'au moins trois dilutions avec les autres sérogroupes [102].

L'interprétation des résultats MAT est complexe et doit tenir compte du statut vaccinal de l'animal, de la cinétique de production des anticorps agglutinants et des éventuelles réactions croisées.

i. Prise en compte du statut vaccinal

L'interprétation des résultats reste délicate chez un animal vacciné, du fait du titre d'anticorps pouvant être induit par la vaccination.

Le seul vaccin actuellement disponible en Europe est un vaccin bivalent inactivé contenant les valences Canicola et Icterohaemorrhagiae. La vaccination entraine une augmentation spécifique des titres vaccinaux contre les sérogroupes vaccinaux avec des titres initiaux élevés parfois supérieurs à 1600, pouvant persister généralement durant une période de quatre mois. Une vaccination antérieure a tendance à engendrer des titres faibles [16, 60].
Pour un animal non vacciné, le seuil de positivité utilisé est le même pour tous les sérogroupes testés. Cette valeur seuil varie selon les études : un titre supérieur ou égal à 800 est retenu dans l'étude Brown et al. [23], d'autres auteurs fixent un seuil de positivité de 3200 pour les chiens non vaccinés [93, 20]. En règle générale, un titre inférieur à 80 est considéré comme non significatif [46].

Le seuil de positivité utilisé pour les sérogroupes vaccinaux chez les chiens vaccinés est ainsi généralement plus élevé que celui des sérogroupes non vaccinaux. Dans l'étude de Stokes et al., pour les chiens vaccinés, le seuil de positivité était fixé à 3200 pour Canicola, 1600 pour Icterohaemorrhagiae [101]. Un titre inférieur à 100 est souvent considéré comme résultat négatif, comme pour un individu non vacciné [46]. D'autres auteurs considèrent que face à un animal vacciné ayant un tableau clinique évocateur de leptospirose, un titre supérieur ou égal à 1600 pour un sérovar non vaccinal avec un titre inférieur à 800 pour les sérovars vaccinaux confirme le diagnostic de leptospirose [39].
Ainsi aucun consensus n'a été établi, les titres seuils de positivité variant selon le contexte régional et le statut vaccinal de l'animal.

Etudes / Titre seuil		GEISEN et al.	BIRNBAUM et al.	HARKIN et al.	SCANZIANI et al.	STOKES et al.	BROWN et al. (1991)
Animal non vacciné		≥1600	≥3200	≥100	≥ 3200	≥200	≥800
Animal vacciné	Sérovars non vaccinaux	1600	≥ 3200	≥ 800	≥3200	≥ 200	≥ 800
	Sérovars vaccinaux	≤ 800	≥ 3200	≤100	≥3200	≥1600 pour Icterohaemorrhagiae ≥3200 pour Canicola	≥ 800

Tableau 5: Définition du seuil de positivité selon les études [20, 23, 39, 46, 93, 101]

ii. Prise en compte de la cinétique de la production d'anticorps

Le test de microagglutination repose sur la détection d'anticorps agglutinants spécifiques d'un sérogroupe à partir de sérum d'individus suspects. Or, les anticorps agglutinants ne sont détectables dans le sang qu'à partir du sixième jour post contamination. Ainsi une première sérologie MAT peut s'avérer négative si elle n'est pas réalisée dans les six à sept jours post infection. Si le clinicien a une forte suspicion épidémio-clinique, une cinétique sérologique est indiquée.

De plus, le titre en anticorps est souvent faible les dix premiers jours de l'infection, c'est pourquoi un deuxième dosage des anticorps est parfois nécessaire à deux ou trois semaines d'intervalle, afin de mettre en évidence une séroconversion. L'augmentation de quatre fois la valeur initiale du sérogroupe infectant entre le premier prélèvement et le second confirme que les symptômes étaient bien en lien avec une infection leptospirosique [50]. Toutefois une antibiothérapie précoce peut retarder l'apparition des anticorps [60].

De même, si les résultats de la première sérologie MAT sont douteux malgré une forte suspicion clinique, il est indiqué de réaliser une cinétique sérologique. En effet, celle-ci est intéressante pour différencier une infection leptospirosique d'un profil vaccinal ou d'une éventuelle rémanence d'anticorps suite à une infection subclinique plus ancienne.

Lorsque plusieurs sérogroupes réagissent en raison de réactions croisées, une cinétique sérologique peut permettre de mettre en évidence le sérogroupe infectant. (cf. Deuxième partie II.B.2. iii.)

iii. Prise en compte des éventuelles réactions croisées

La première sérologie MAT ne permet pas toujours de préciser le sérogroupe infectant si plusieurs sérogroupes possèdent des titres élevés. En effet, en début d'évolution des symptômes, des réactions croisées dues à la présence d'épitopes communs entre plusieurs sérovars n'appartenant pas au même sérogroupe sont observées. Ces réactions croisées se produiraient moins de deux à quatre semaines post infection [92]. Ainsi une seconde sérologie MAT sur un sérum tardif permettrait de préciser le sérogroupe en cause, les réactions croisées intervenant majoritairement sur sérum précoce.

Miller et al. émettent cependant des réserves sur cette hypothèse dans un article publié récemment [73]. La première partie de l'étude concernait 18 chiens apparemment sains, parmi lesquels neuf ont reçu un vaccin sous-unité inactivé contenant les souches Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona et Grippotyphosa. Une sérologie a été effectuée avant et après la vaccination dans cinq laboratoires différents en parallèle. Avant la vaccination 17 chiens

étaient séronégatifs, il s'agissait de chiens Specific Pathogen Free (SPF) n'ayant pas de possibilités de contact avec l'environnement extérieur. Après la vaccination neuf chiens ne présentaient pas le même résultat selon le laboratoire. Ainsi seuls 11% des échantillons avaient des résultats concordants parmi les cinq laboratoires, montrant une grande variabilité entre les laboratoires, reflétant un manque de standardisation de la méthode. De plus des réactions paradoxales ont été mises en évidence avec obtention de titres maximaux pour des sérovars non vaccinaux, comme bratislava. La seconde partie de l'étude portait sur 17 chiens atteints cliniquement de leptospirose, tous soumis à une sérologie envoyée dans les cinq laboratoires. Seuls 31% des prélèvements présentaient des résultats concordants selon le laboratoire. Par ailleurs les sérogroupes présentant les titres les plus élevés différaient pour un même individu au cours du temps.

La sérologie MAT présente ainsi un intérêt dans le diagnostic de la leptospirose. Cette méthode est sensible, exceptée durant la première semaine post infection, et spécifique d'un contact avec des leptospires pathogènes. Toutefois une étude a montré, pour un titre MAT supérieur ou égal à 800 considéré comme diagnostic, une sensibilité variant de 22% à 67% selon les laboratoires et une spécificité variant de 69% à 100% [72]. Une importante variabilité des résultats entre différents laboratoires a ainsi été mise en évidence [72, 73]. L'absence de consensus fixant le titre seuil de positivité pourrait être mis en cause. Des résultats faux négatifs peuvent être observés lorsque le sérogroupe incriminé ne fait pas partie du panel de sérovars utilisé par le laboratoire. La connaissance des sérovars circulants au sein d'une population locale de chiens apparait alors indispensable à la sensibilité et à la spécificité du test de microagglutination [102].

C. Diagnostic direct : méthode Polymerase Chain Reaction (PCR)

1) Principe

A partir d'un échantillon de sang, d'urine, d'humeur aqueuse, de liquide céphalo rachidien ou de tissu, la PCR permet de mettre en évidence une séquence d'ADN spécifique aux leptospires par le biais d'un couple d'amorces s'hybridant spécifiquement sur cette séquence. A chaque couple d'amorce correspond un fragment amplifié de taille caractéristique, analysé par électrophorèse en gel d'agarose lorsqu'on pratique la technique de PCR en point final.
Cette technique nécessite uniquement du matériel génétique de l'agent infectieux, une infime quantité de matériel peut être détectée et l'intégrité bactérienne peut ne pas être conservée.

Cette méthode est très sensible. La présence de facteurs d'inhibition dans les tissus peut toutefois diminuer la sensibilité du test [21].

Le développement de techniques de PCR en temps réel, par marquage de l'ADN grâce à une molécule fluorescente, sonde Taqman [98] ou SYBR Green [64], permet de visualiser la quantité d'ADN amplifiée durant le cycle réactionnel, l'intensité de l'émission fluorescente étant proportionnelle à la quantité d'amplicons.

La spécificité du test repose sur le choix du couple d'amorces utilisées.
On peut amplifier spécifiquement un fragment d'ADN ribosimial 23S commun aux souches pathogènes et saprophytes de leptospires. La mise en présence des séquences amplifiées avec une endonucléase permet de distinguer les sérovars pathogènes, les fragments issus de ces derniers étant spécifiquement clivés par l'enzyme [47].
D'autres auteurs utilisent le gène *hap 1* (hemolysis associated protein), comportant 262 paires de bases, spécifiquement porté par les espèces génomiques pathogènes, et absent chez les espèces saprophytes, augmentant la spécificité du test [22].
Les amorces G1 et G2 amplifiant le gène secY, codant pour une protéine cytoplasmique des leptospires, peuvent être utilisées couplées aux amorces B64I et B64II, amplifiant un gène codant pour une protéine FlaB constitutive du flagelle, permettant de détecter les sérovars copenhagi, icterohaemorrhagiae, hardjo, pomona, grippotyphosa et bim [11].
Le gène codant pour les facteurs protéiques de virulence LigA et LigB sont la cible d'amorces spécifiques aux leptospires pathogènes [84].
Le gène LipL32 codant spécifiquement pour une lipoprotéine de la membrane externe des leptospires pathogènes a été utilisé lors de plusieurs études [64, 90].

2) Intérêts et limites de la méthode PCR

La PCR est une méthode reproductible, permettant la mise en évidence de séquences d'ADN de l'agent infectieux non nécessairement viable.
Cette méthode est sensible, détectant une infime quantité de matériel génétique, et spécifique selon le couple d'amorce choisi.
Par rapport au test de microagglutination, la PCR permet un diagnostic précoce pouvant être réalisé sur un échantillon de sang lors de la phase de leptospirémie [47, 102]. De plus les résultats obtenus par méthode PCR sont indépendants du statut vaccinal de l'individu [71].

La sensibilité du test peut être compromise par la congélation des échantillons [22], par l'interaction des prélèvements avec le milieu de conditionnement (tube hépariné) [64] ou par la présence d'antibiotiques dans le sang ou l'urine d'un animal suspecté atteint de leptospirose, ayant reçu un traitement précoce ou prolongé. De même un nombre seuil minimal de bactéries est nécessaire dans l'échantillon pour rendre un résultat PCR positif. En dessous de 10^3 leptospires par millilitre d'urine il y aurait un risque de faux négatif [11]. En outre le test PCR manque de précision dans le sens où il ne permet pas de distinguer le sérovar infectant. Certaines méthodes de typages moléculaires récentes pourraient cependant permettre de palier à ce manque [26].

III. Signification d'une sérologie positive

Chez le chien, un résultat de sérologie MAT doit être interprété avec attention dans son contexte médical en tenant compte :

- du statut vaccinal du chien
- du délai entre l'apparition des symptômes et la date des prélèvements, les anticorps agglutinants étant détectables à partir du septième jour post contamination
- du tableau clinique de l'animal suspect de leptospirose et de l'éventuelle mise en place d'une antibiothérapie préalable aux prélèvements.

Une étude récente a montré qu'il existait une discordance importante entre les résultats du test MAT selon les laboratoires, pour les chiens récemment vaccinés contre la leptospirose et pour les chiens cliniquement atteints de leptospirose, dont il faudrait également tenir compte [73].

Quatre types de résultats sérologiques peuvent être obtenus : absence d'anticorps leptospirosiques détectables, profil compatible avec les antécédents vaccinaux, profil douteux, profil en faveur d'une infection leptospirosique.

Une sérologie négative ou compatible avec la vaccination ne donne pas d'argument en faveur d'une infection leptospirosique. Aucun consensus n'a été établi à propos du titre seuil de positivité des titres vaccinaux, ceux-ci variant selon les études (cf. tableau 5). Il est important de rappeler qu'un résultat de sérologie MAT isolé peut mener à de faux négatifs, si l'individu suspect a été contaminé moins d'une semaine avant le prélèvement ou si le sérogroupe infectant n'est pas représenté dans le panel des sérovars du laboratoire. Ainsi lorsque la

suspicion clinique est forte, face à un résultat MAT négatif, il est recommandé d'effectuer une cinétique sérologique et/ou d'avoir recours à un autre test [102].

Une sérologie en faveur d'une infection leptospirosique est appelée sérologie positive.

- Une sérologie positive avec un titre isolé même très élevé peut renforcer la suspicion d'infection leptospirosique. Toutefois elle ne permet pas d'affirmer le diagnostic, d'autant plus chez les chiens vaccinés. Les titres vaccinaux ont tendance à être bas mais certains titres supérieurs à 1600 peuvent persister après la vaccination. Par ailleurs des réactions croisées à des sérogroupes non vaccinaux peuvent être observées [16, 102].
- Un animal vacciné présentant une sérologie positive avec des titres élevés pour un ou plusieurs sérogroupes non vaccinaux (titre seuil de positivité variant selon les études- cf. tableau 5) et des titres faibles pour les sérogroupes vaccinaux est considéré comme probablement infecté par un sérogroupe non vaccinal. Toutefois la présence de réactions croisées compromet souvent la détermination du sérogroupe infectant durant les six semaines suivant le début de la maladie [92].
- Un animal vacciné présentant des titres positifs pour les sérogroupes vaccinaux, pouvant correspondre à la vaccination, associés à des titres faibles pour les sérogroupes non vaccinaux est considéré comme présentant un profil douteux. De même un chien non vacciné présentant un ou plusieurs titres sérologique peu élevés présente un profil sérologique douteux. Un profil douteux correspondrait à un début d'infection leptospirosique ou à une infection ancienne, les anticorps pouvant persister plus d'un an après la contamination [92]. La réalisation d'une cinétique sérologique et/ou d'autres tests diagnostiques (PCR, ELISA) permettraient de lever le doute. Le degré de suspicion clinique et la prise en compte du délai entre la prise de sang et le début des symptômes, prennent ici toute leur importance dans l'interprétation des résultats.

IV. Signification d'une PCR positive

Une étude menée par Branger et al. sur une population de chiens infectés expérimentalement a montré que les PCR réalisées sur sang étaient toutes positives à partir du quatrième jour post infection et que les PCR réalisées sur urines étaient toutes positives à partir du huitième jour post infection [22].

Une PCR positive sur sang serait la traduction de la présence de leptospires dans le sang reflétant la phase d'invasion ou phase de dissémination systémique courte et précoce d'une durée de 3 à 7 jours après l'exposition. Ce résultat permettrait un diagnostic précoce de leptospirose, avant même que la sérologie MAT ne soit positive. Aucune étude PCR mettant en évidence du matériel génétique de leptospires pathogènes dans le sang de chiens apparemment sains ne semble avoir été réalisée à ce jour.

Une PCR positive sur urine serait la traduction d'une excrétion de leptospires, persistant et se multipliant dans les tubules rénaux. Ce résultat permettrait un diagnostic tardif de forme clinique de leptospirose ou la mise en évidence d'un état de portage asymptomatique [38, 90].
De plus une étude menée par Bal et al sur 29 patients humains atteints de leptospirose a établi la comparaison entre les résultats des PCR réalisées sur urines et ceux réalisés sur sang. Les prélèvements avaient été réalisés dans les huit premiers jours suivant l'apparition des symptômes. Il s'est avéré que les PCR sur urines étaient toutes positives alors que seules deux PCR sur sang étaient positives. Cette étude laisse présumer que l'excrétion urinaire peut être précoce, contrairement au schéma pathogénique classiquement décrit, offrant la possibilité d'un diagnostic précoce par PCR sur urines [11]. Ainsi la PCR sur urine offrirait aussi bien la possibilité d'un diagnostic précoce de leptospirose que celle d'un diagnostic tardif, à la différence des conclusions émises par Branger et al [22].
Actuellement peu de données sont disponibles quant à la validité du test PCR pour la détection des leptospires pathogènes, concernant les valeurs de sensibilité, spécificité et valeur prédictive positive et négative de ce test. Ainsi les résultats PCR tant positifs que négatifs devraient toujours être interprétés en corrélation avec le tableau clinique et les résultats des autres tests, comme le test de microagglutination par exemple. La sensibilité du test serait de 90% les cinq premiers jours post contamination à partir d'un échantillon sanguin, puis seulement de 50% ensuite [102].

V. Complémentarité du test sérologique d'agglutination et de la PCR

A. Comparaison MAT/PCR urines

Harkin et al. ont mené une étude en 2003 sur 145 chiens, dont 132 (91 %) présentaient des signes cliniques compatibles avec la leptospirose et 13 (8%) étaient apparemment sains. Une sérologie MAT et un test PCR sur urines ont été réalisés sur chaque chien [47]. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

MAT / PCR urine	Sérologie positive	Sérologie négative	Total
PCR urine positive	8	16	24
PCR urine négative	0	121	121
Total	8	137	145

Tableau 6: Corrélation des résultats PCR et de la sérologie MAT dans l'étude de Harkin et al. (2003) [47]

Parmi les 121 chiens qui avaient une PCR sur urine négative, tous avaient une sérologie MAT négative. Une sérologie positive est un critère diagnostic de leptospirose dans cette étude. Parmi les 24 chiens qui présentaient une PCR positive sur urine, huit présentaient une sérologie MAT positive et avaient une clinique prioritairement compatible avec une leptospirose. Dans cette étude, en utilisant le test MAT comme référence, la valeur prédictive négative de la PCR sur urine était de 100% et la valeur prédictive positive était de 33,3%. La sensibilité du test était de 100% car tous les chiens atteints de leptospirose présentaient une PCR positive sur urine. La PCR serait une méthode plus sensible que la sérologie MAT [47].

Une autre étude réalisée par les mêmes auteurs avait pour objectif la comparaison des résultats MAT et des résultats PCR sur urines sur une population de 500 chiens de provenance variée (apparemment sains, suspects de leptospirose ou d'une autre maladie) [48].

MAT / PCR urine	Sérologie positive	Sérologie négative	Total
PCR urine positive	9	32	41
PCR urine négative	95	364	459
Total	104	396	500

Tableau 7 : Corrélation des résultats des tests MAT et PCR sur urine dans l'étude de Harkin (2003) [48]

Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent une concordance des résultats pour neuf chiens qui avaient à la fois une PCR positive sur urine et une sérologie positive et pour 364 chiens qui avaient une MAT et une PCR sur urine négatives.
Parmi la population étudiée, seuls quatre chiens étaient diagnostiqués comme atteints de leptospirose cliniquement. Parmi eux, deux avaient des résultats MAT et PCR positifs, un ne présentait que la sérologie positive et le dernier ne présentait que la PCR sur urine positive.

Ainsi, en prenant le test MAT comme référence, la spécificité de la PCR dans cette étude était de 92 %, la sensibilité de 75%, la valeur prédictive positive de 7% et la valeur prédictive négative de 98%.
La faible valeur prédictive positive du test PCR en utilisant la sérologie MAT comme référence illustre que la PCR sur urine permet un diagnostic précoce, pouvant alors se révéler positive alors que la sérologie est encore négative.
En prenant le test PCR comme référence, la spécificité du test MAT dans cette étude était de 79 %, la sensibilité de 75% et la valeur prédictive négative de 99%. La valeur prédictive positive n'était que de 3%, la sérologie MAT ne permettant donc pas seule d'aboutir à un diagnostic d'infection leptospirosique.

Enfin sur les 41 chiens présentant une excrétion active de leptospires dans leurs urines, seuls trois étaient cliniquement atteints. Les 38 autres chiens pouvaient donc être considérés comme porteurs et excréteurs asymptomatiques.

Un résultat PCR positif isolé sur urine n'est donc pas une preuve suffisante d'infection en cours [48].

B. Comparaison MAT/PCR sur sang

Une étude menée par Brown et al. en 1995 sur 71 patients humains atteints de leptospirose a révélé que 18% des patients ont présenté une PCR sur sang positive avant toute séroconversion, les prélèvements étant effectués à des stades différents de la maladie.
La détection de génome bactérien par méthode PCR sur sang apparaitrait comme une méthode précoce de diagnostic de la leptospirose par rapport à la sérologie [25].

C. Conclusion

Les tests sérologiques MAT et PCR apparaissent être complémentaires pour le diagnostic de la leptospirose, en corrélation avec le degré de suspicion clinique de départ. Une étude rétrospective a été menée récemment par Hugonnard et al. sur 33 cas suspects de leptospirose canine. Dix cas sur 33 présentaient un tableau clinique fortement évocateur de leptospirose et tous les animaux s'étaient révélés séropositifs avec au moins une PCR positive dans huit cas sur dix. Pout 23 cas présentant une suspicion clinique faible à intermédiaire, quatre chiens étaient séropositifs et avaient des PCR positives sur sang et urine, 14 étaient séronégatifs avec au moins une PCR positive et cinq présentaient des résultats MAT et PCR négatifs. Ainsi lors de suspicion clinique forte de leptospirose, une bonne corrélation entre la clinique et les résultats des tests MAT et PCR est observée. Lors de suspicion clinique faible à modérée, de fortes variations sont observées pour les résultats PCR. Dans ce cas, une PCR positive pourrait correspondre à un statut de portage asymptomatique ou à une forme atypique de leptospirose [52].

VI. Etat des connaissances sur le statut de porteur sain

Le portage asymptomatique avec excrétion urinaire a été démontré chez l'Homme [99, 37, 11] ainsi que chez toutes les espèces domestiques sensibles à l'infection, y compris le chien [101, 93, 53, 108, 48, 90]. Cependant les études à ce sujet restent relativement restreintes.

A. Données chez l'homme

Une étude récente a été menée aux Etats-Unis sur 511 vétérinaires sans signes cliniques apparents. La plupart des vétérinaires rapportaient la possible exposition à la bactérie dans l'année précédant l'étude par piqûre iatrogène (74,2%), morsure (67,5%) ou griffure (88,3%). Chacun d'eux avait été soumis à un test MAT. Deux et demi pour cent des vétérinaires présentaient un profil sérologique compatible avec une exposition à la leptospirose. Toutefois aucune recherche d'une éventuelle excrétion urinaire n'avait été effectuée [99].

Une étude menée en 2010 a révélé le statut de porteur excréteur asymptomatique chez 314 individus apparemment sains, dans une région endémique de leptospirose en Amazonie [37]. Pour chaque individu une sérologie MAT, une sérologie ELISA et une PCR (amplification du gène codant l'ARN ribosomique 16S sur urine) a été réalisée. Sur les 314 sujets, 189 avaient présenté une infection récente, définie par un titre MAT strictement supérieur à 800 ou la présence d'IgM par sérologie ELISA. Treize personnes (4,1%) présentaient une PCR positive

sur urines, dont dix avaient une sérologie MAT ou ELISA négative. Dix échantillons parmi les treize ont pu être séquencés : six se sont révélés correspondre à une souche pathogène de leptospires et quatre à une souche intermédiaire, d'après la classification génomique. Parmi les 102 individus séronégatifs qui n'avaient pas présenté récemment de syndrome fébrile, six (5,9%) excrétaient des leptospires dans leurs urines avec une excrétion variant entre 75 leptospires/mL et 229 leptospires/mL. Cette étude met donc en évidence l'existence d'un portage asymptomatique et d'une excrétion urinaire de leptospires pathogènes et intermédiaires chez l'Homme, pouvant perdurer plusieurs années, après un épisode infectieux ancien dans une région endémique de leptospirose. Il serait intéressant de déterminer l'impact de ce portage asymptomatique sur la transmission interhumaine de la maladie. L'étude des sérovars infectant dans le portage asymptomatique serait également une donnée intéressante à approfondir, dans le but de connaitre l'éventuelle persistance spécifique de certains sérovars dans les tubules rénaux.

Une autre étude menée par Bal et al. a concerné 22 patients atteints de leptospirose. La présence de leptospires dans les urines par méthode PCR tout au long de la maladie et après guérison clinique a été suivie. Il s'est avéré que 6 individus (27,3%) présentaient une leptospirurie durant l'année suivant la guérison clinique, malgré un traitement antibiotique mis en place précocement. Deux ans post infection, deux d'entre eux présentaient encore une leptospirurie [11].

A. Données chez le chien

Des études ont cherché à mettre en évidence la séropositivité de chiens cliniquement sains.

Une étude menée en 2007 dans le Michigan sur 1241 chiens apparemment sains, vaccinés ou non a montré une séropositivité pour 309 des chiens, soit 24,9% de la population étudiée [101].

Ces résultats sont confortés par ceux d'une étude antérieure menée en 2002 en Italie sur 245 chiens apparemment sains. Les chiens étaient de provenance variée : chiens errants, chiens de chenil ou effectuant une visite de routine chez leur vétérinaire. Le statut vaccinal était inconnu pour les chiens errants. Un test de microagglutination a été réalisé sur chacun des chiens. Les résultats ont mis en évidence une séropositivité de 29,4%. Cependant le statut vaccinal inconnu des 33 chiens errants, considérés comme non vaccinés par défaut, pouvait entraîner des faux positifs à l'origine d'une surestimation du pourcentage de séropositivité [93].

Une étude a été menée entre 2003 et 2010 aux Pays Bas sur 212 chiens apparemment sains vaccinés ou non. Leur sérum a été soumis au test de microagglutination. Le sérum de 186 chiens errants apparemment sains de statut vaccinal inconnu a été collecté ainsi que celui de 26 chiens de chasse non vaccinés. Les chiens de statut vaccinal inconnu présentant des titres élevés pour les sérogroupes vaccinaux Canicola et Icterohaemorrhagiae ont été considérés comme vaccinés récemment et leur résultats ont été retirés des données. Après cette correction, parmi les 186 chiens de statut vaccinal inconnu, 172 sont considérés comme non vaccinés et parmi eux 87 (51%) possèdent un titre d'anticorps contre un ou plusieurs sérogroupe(s). Parmi les chiens de chasse non vaccinés, une séroprévalence de 87% est observée. Les résultats montrent une prédominance des titres contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae résultant de formes subcliniques [53].

Certains auteurs ont mis en évidence la présence d'ADN de leptospires dans les urines de chiens apparemment sains, en parallèle de la détection d'anticorps dans le sérum des chiens par MAT.

Dans une étude réalisée en Ecosse par Van den Broek et al. en 1991, 511 chiens non vaccinés apparemment sains ont été soumis à un test de microagglutination. Cent trente sérologies sont revenues positives soit 25,4%. Par ailleurs, une leptospirurie a été mise en évidence chez sept individus (8%) par mise en culture bactérienne. Cette prévalence pouvait être sous-estimée compte tenu des limites de sensibilité de la culture. Parmi les sept individus précédents, cinq ne présentaient pas de profil sérologique MAT en faveur d'une infection leptospirosique [108].

Plus récemment, dans une étude réalisée dans le Kansas par Harkin et al. en 2003, 500 chiens de statut vaccinal et sanitaire (sains ou malades) variables ont été soumis à des sérologies MAT et des tests PCR urinaires. Quarante et un chiens (8,2%) présentaient une PCR positive sur urines dont neuf avec une sérologie positive. Quatre chiens sur les 500 étaient cliniquement suspects de leptospirose dont seuls trois avaient présenté une PCR positive. Les 37 autres chiens (7,4%) apparemment sains présentant une PCR positive sur urine pouvaient être considérés comme porteurs asymptomatiques. Une PCR sur urine a été réalisée deux semaines plus tard sur les 41 chiens qui avaient présenté une PCR positive sur urine, et quatre se sont révélés négatifs. Cette observation permet de s'interroger sur le caractère transitoire ou intermittent et récurrent de la leptospirurie [48].

Une étude a été menée en 2010 sur 525 chiens ne présentant pas de signes cliniques compatibles avec une leptospirose en Irlande dont 498 provenaient de l'hôpital universitaire

de Dublin et 27 de refuges. Une recherche de leptospires par PCR sur urine a été réalisée. Une PCR positive a été observée sur 34 échantillons (6,8%) du premier groupe et trois du deuxième (11,1%). Il en résulte que tous cas confondus, 7 % des chiens apparemment sains excrétaient des leptospires pathogènes dans leurs urines. La quantification de cette excrétion a été évaluée et variait de 35,5 leptospires/mL d'urine à 1 330 000 leptospires/mL [90].

L'existence de portage asymptomatique et d'excrétion urinaire des leptospires par des individus apparemment sains n'est pas négligeable, tant chez l'Homme et que chez le chien. Elle semble faire suite à une forme subclinique de la maladie ou à une infection ancienne cliniquement exprimée, malgré la mise en place d'un traitement antibiotique. Ce portage asymptomatique peut être associé ou non à une séropositivité. Ces études soulignent l'importance quantitative de la leptospirurie dans certains cas et soulèvent la question de la durée d'excrétion, semblant pouvoir perdurer plusieurs années. Ces porteurs asymptomatiques constitueraient de nouveaux réservoirs de la maladie représentant un facteur de risque supplémentaire pour l'homme et l'animal.

TROISIEME PARTIE : ETUDE PROSPECTIVE: PROFIL SEROLOGIQUE ET RECHERCHE D'ADN DE LEPTOSPIRES PATHOGENES SUR URINE ET SANG DE 30 CHIENS APPAREMMENT SAINS

I. Objectif

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le profil sérologique et la présence de leptospires pathogènes chez des chiens apparemment sains.

Les seules études actuellement publiées chez le chien sain visaient à déterminer le profil sérologique et à rechercher une leptospirurie par PCR sur urine [101, 93, 53, 108, 48, 90]. En revanche la recherche d'ADN de leptospires pathogènes dans le sang de chiens apparemment sains n'a jamais été menée. De plus, la valeur prédictive d'une PCR positive a très peu été étudiée [47, 48].

L'objectif de notre étude était de déterminer, sur une population de 30 chiens apparemment sains, le nombre d'individus présentant une PCR positive sur sang et urines ainsi que le profil sérologique de chacun d'entre eux. Nous nous proposions également comparer les résultats des PCR avec ceux des sérologies.

Ainsi, dans cet objectif, nous avons sélectionné une population de 30 chiens, indépendamment du statut vaccinal, ayant un mode de vie susceptible de favoriser des contacts avec un milieu potentiellement contaminé. Deux critères d'inclusion ont été choisis pour l'inclusion les chiens de cette étude :

- Le sexe mâle. En effet, les mâles sont naturellement plus exposés à l'infection leptospirosique, peut-être en raison de leur comportement d'exploration plus développé [112, 102, 51, 20, 111].
- La fréquence des promenades près des points d'eau et/ ou des baignades. En effet, l'exposition à des points d'eau représente un risque de contamination [40, 112].

II. Matériel et Méthodes

A. Population d'étude

Les chiens des étudiants vétérinaires ont un contact régulier et varié avec un environnement à risque. Ce risque de contamination est d'autant plus élevé que le site du campus vétérinaire de Lyon et sa périphérie comportent différents points d'eau et zones marécageuses. Certains chiens sont emmenés en balade fréquemment vers ces points d'eau.

Le recrutement de la population étudiée s'est fait, par mailing, sur la base du volontariat auprès des étudiants vétérinaires. Le questionnaire adjoint en annexe n°1 a permis la sélection de la population selon les critères d'inclusion définis précédemment.

B. Méthodes

1) Evaluation du statut vaccinal de l'animal

Le statut précis vaccinal de l'animal devait être connu et une photocopie du carnet de vaccination a été systématiquement faite.

2) Enquête épidémiologique

Les données concernant le statut épidémiologique de chaque l'animal ont été notifiées selon le formulaire présenté en annexe n°2.

Les principaux renseignements concernaient :

- **Le lieu de vie de l'animal**
- Habitation principale : ville/campagne/zone péri-urbaine
- Le type de point d'eau fréquenté :
    - Eau stagnante : marais, étang, lac, bassin/abreuvoir, autre (flaque, ornière,…)
    - Eau courante : source, autre type de cours d'eau (ruisseau, rivière, fleuve, …)
- Proximité de rongeurs sauvages et/ou de vaches laitières
- **Le mode de vie de l'animal**
- milieu de vie principal : intérieur/extérieur/mixte
- le nombre de congénères
- l'activité principale : chiens de troupeau/chien de travail/chien d'eau/chien de chasse/chien reproducteur/chien de compagnie
- baignade dans les 15 derniers jours oui/non
- abreuvement ornière/points d'eau dans les 15 derniers jours oui/non
- **Les antécédents pathologiques**

3) *Evaluation du statut clinique de l'animal*

Pour chaque animal, un examen clinique complet était réalisé et orienté sur la recherche de symptômes digestifs, urinaires, nerveux ou oculaires pouvant exister lors d'infection leptospirosique.

Pour chacun des syndromes suivants, nous nous sommes attachés à rechercher la présence d'un ou de plusieurs symptômes :

- syndrome « hyperthermie » : abattement, tremblements, anorexie, déshydratation, douleurs musculo-squelettiques, cervicalgie, congestion des muqueuses, pâleur des muqueuses, ictère, pétéchies/ecchymoses, lésions cutanées, adénomégalie externe

- syndrome « urinaire » : polyuropolydipsie, oligurie/anurie, oedèmes périphériques, glucosurie, abattement, tremblements, anorexie, déshydratation, hypothermie, congestion muqueuses, pâleur des muqueuses, pétéchies/ecchymoses

- syndrome « digestif » : vomissement, diarrhée, hématémèse, hémochésie, méléna, douleur abdominale, ictère, anorexie, amaigrissement, déshydratation, abattement, pétéchies/ecchymoses, épanchement abdominal

- syndrome « nerveux » : altération de la conscience, comas, convulsions, ataxie, parésie/paralysie

- syndrome « oculaire » : cécité, congestion, hémorragie chambre antérieur, myosis, perte de transparence des milieux

La présence d'au moins un symptôme appartenant aux syndromes décrits ci-dessus entraînait une exclusion du protocole (Annexe 2).

4) *Nature et méthodologie des prélèvements biologiques*

Les urines étaient recueillies par miction spontanée, dans un flacon stérile, lors de la première émission matinale. Le propriétaire réalisait lui-même ce prélèvement.

L'échantillon d'urine était ensuite apporté au SIAMU, 1 mL était prélevé stérilement et placé dans un tube sec pour l'analyse PCR. Par ailleurs une analyse urinaire (densité urinaire lue au réfractomètre et bandelette urinaire (BU)) était réalisée sur l'échantillon d'urine pour chacun des chiens. [Bandelettes Combur[10]Test (Roche Diagnostics 6mbH, Mannheim, Germany)]

Le prélèvement sanguin était effectué au SIAMU pour chacun des 30 chiens de l'étude.
Le protocole comprenait une prise de sang sur tube sec pour la sérologie MAT (1mL) et une prise de sang sur tube EDTA pour la PCR (1mL).

5) PCR sur sang et urine

Les analyses PCR étaient effectuées par le Laboratoire des Leptospires du Campus Vétérinaire de Lyon. Les prélèvements de sang et d'urine étaient traités séparément. La technique utilisée était la même pour l'urine et le sang. Il s'agissait d'une technique de PCR en temps réel qui détectait l'ensemble des souches de leptospires pathogènes. Elle utilisait le kit TaqVet ™ Pathogenic leptospira (LSI, co-développé avec le Campus Vétérinaire de Lyon). Le seuil de détection était 10^3 microorganismes/ml de liquide biologique. L'étape d'extraction d'ADN sur les 30 échantillons de sang et sur les 30 échantillons d'urine était réalisée dans les heures suivant le prélèvement, à l'aide du kit d'extraction d'ADN de leptospires (TaqVet Patholept™ LEPT/50, LSI, Lissieu, France). Les échantillons étaient ensuite placés à -20°C pour conserver l'ADN.

6) Sérologie MAT et critères d'interprétation

Les tests sérologiques étaient réalisés par le Laboratoire des Leptospires du Campus Vétérinaire de Lyon selon la méthode de référence qui est la sérologie par technique de microagglutination (MAT). Les sera des chiens de l'étude étaient préparés à différentes dilutions et mis en présence de souches vivantes de leptospires pathogènes représentatives de 19 sérovars, maintenues en culture au laboratoire (tableau 8). La présence d'anticorps agglutinants dirigés contre les antigènes d'un sérogroupe de leptospires se traduit par une réaction d'agglutination. La réaction d'agglutination, spécifique de sérogroupe, indique un contact infectieux de l'individu suspect avec des leptospires de ce sérogroupe. Les différentes souches testées sont présentées dans le tableau 8. La dilution seuil employée est de 1/40.

Sérogroupes	Sérovars	Abréviations
AUSTRALIS	australis	AUS
	bratislava	BRAT
	372(Munchen)	MUN
AUTUMNALIS	akiyami	AKI
	bim	BIM
CANICOLA	canicola	CAN
GRIPPOTYPHOSA	grippotyphosa	GRIP
	vanderhoedoni	VAN
ICTEROHAEMORRHAGIAE	copenhageni	COP
	19 (Icterohaemorrhagiae)	19
PANAMA	374 (Panama)	PAN
	mangus	MAN
POMONA	Pomona	POM
	mozdok	MOZ
PYROGENES	pyrogenes	PYR
SEJROE	sejroe	SJ
	hardjo	HJ
	wolffi	WOLF
	saxkoebing	SAX

Tableau 8 : Différentes souches testées

L'interprétation des résultats tenait compte du statut vaccinal de l'animal. Le titre seuil pris en compte était de 160.

<u>Pour un animal dont le rappel vaccinal datait de moins d'un an</u>

- La présence de titres compris entre 160 et 640 pour un ou plusieurs sérogroupe(s) vaccinal(aux) était interprétée comme un profil vaccinal en l'absence de réactions pour les sérogroupes non vaccinaux.
- La présence de titres supérieurs ou égaux à 160 pour un ou plusieurs sérogroupes non vaccinaux et/ou la présence de titres vaccinaux strictement supérieurs à 640 étaient interprétées comme compatibles avec une infection leptospirosique.

<u>Pour un animal non vacciné ou dont le rappel vaccinal datait de plus d'un an</u>

- La présence d'au moins un titre supérieur à 160 était interprétée comme compatible avec une infection leptospirosique.

Lorsque des titres à plusieurs sérogroupes étaient observés pour un chien, la détermination du sérogroupe infectant n'était permise que s'il y avait un écart d'au moins trois dilutions entre deux sérogroupes.

7) Contribution personnelle

J'ai personnellement réalisé la sélection de la population d'étude, recueilli les commémoratifs, réalisé l'examen clinique, les prélèvements de sang, l'analyse des urines et l'extraction d'ADN en vue des PCR.

III. Résultats

A. Présentation de la population d'étude

Vingt-sept chiens (90%) étaient des chiens de compagnie. Un chien (3%) était un mâle reproducteur. Deux chiens (7%) étaient des chiens guides pour handicapés (Handichiens) et considérés comme des chiens de travail. Aucun chien n'était utilisé pour la chasse.

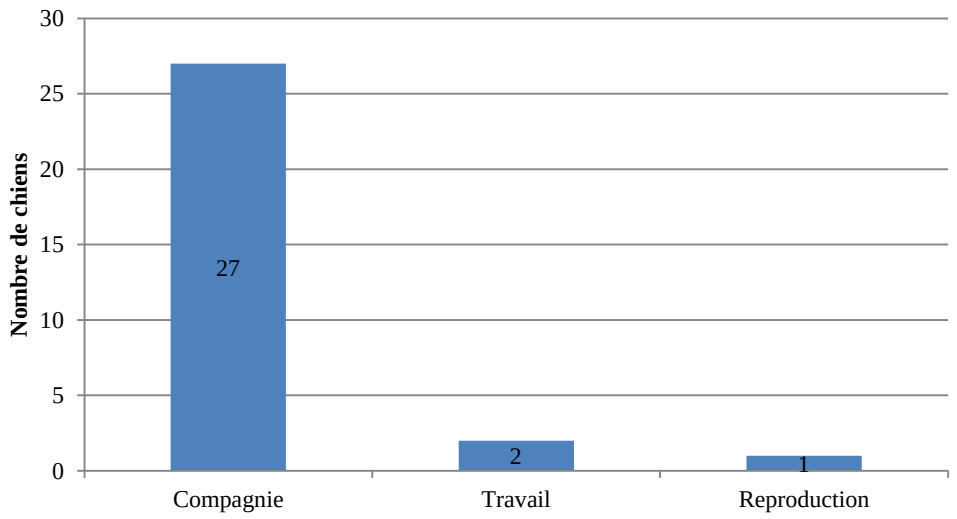

Figure 10 : Fonction de vie des chiens de l'étude

1) Données épidémiologiques

i. Sexe

L'étude incluait 30 chiens mâles dont 14 étaient castrés (47%).

ii. Races

Deux chiens (6%) étaient de petite race (<10kg), 20 (67%) étaient de races moyennes (entre 10 et 30 kg), et huit (27%) étaient de grande races (>30kg).

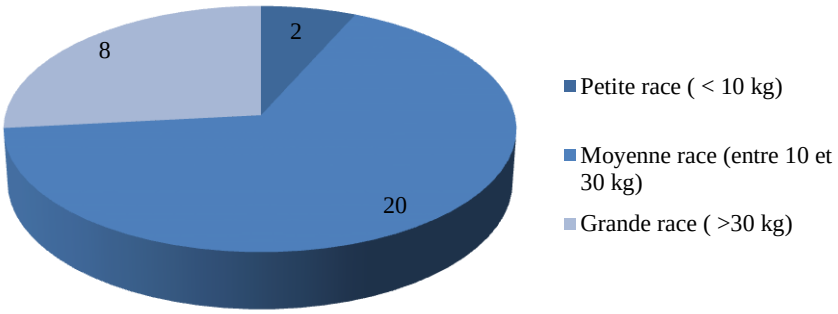

Figure 11 : Gabarit des chiens de l'étude

Des chiens de 19 races ont été inclus dans l'étude. Les Border Collie et les Bergers Australiens étaient les plus représentés.

Tableau 9 : Races des chiens de l'étude

Races	Nombre de chiens
Border Collie	4
Berger Australien	4
Samoyède	2
Labrador	2
Golden retriever	2
Croisé labrador	2
Beagle	2
Manchester Terrier	1
Flat Coated retriever	1
Epagneul breton	1
Croisé fox	1
Croisé braque	1
Croisé berger Pyrénées	1
Croisé berger australien	1
Croisé beauceron	1
Colley	1
Bouvier de l'Entlebuch	1
Bouvier Bernois	1
Berger des Pyrénées	1

iii. Âge

Quatre catégories d'âge ont été définies :

-âge inférieur ou égal à un an

-âge strictement supérieur à un an et inférieur ou égal à quatre ans

-âge strictement supérieur à quatre ans et inférieur ou égal à huit ans

-âge strictement supérieur à huit ans.

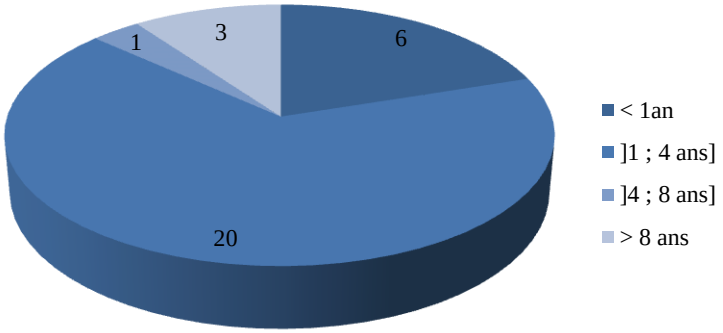

Figure 12 : Age des chiens de l'étude

L'âge des chiens inclus dans l'étude variait de huit mois à 14,5 ans. Trois chiens (10%) avaient plus de huit ans, un chien (3%) avait un âge compris entre quatre et huit ans, 20 chiens (67%) avaient un âge compris entre un et quatre ans (67%), six chiens avaient moins d'un an (20%). L'âge moyen était de deux ans et 10 mois +/- 35 mois.

N°	Age	Race	Sexe	Castration oui/non
1	3 Ans 11 mois	Manchester Terrier	M	0
2	3 Ans 0 mois	croisé braque	M	1
3	2 Ans 9 mois	Bouvier bernois	M	0
4	3 Ans 11 mois	Beagle	M	1
5	1 Ans 9 mois	Samoyède	M	0
6	1 Ans 9 mois	croisé berger australien	M	0
7	5 Ans 5 mois	croisé berger pyrénée	M	1
8	2 Ans 11 mois	Samoyède	M	0
9	2 Ans 9 mois	Golden retriever	M	1
10	0 Ans 9 mois	Border Collie	M	0
11	0 Ans 10 mois	Berger des pyrénés	M	0
12	1 Ans 11 mois	croisé beagle	M	1
13	10 Ans 1 mois	Epagneul breton	M	1
14	0 Ans 8 mois	Golden retriever	M	0
15	0 Ans 11 mois	croisé labrador	M	0
16	1 Ans 6 mois	berger australien	M	1
17	1 Ans 3 mois	Colley	M	1
18	0 Ans 8 mois	Labrador	M	0
19	2 Ans 4 mois	Bouvier de l'entlebuch	M	0
20	2 Ans 1 mois	Berger australien	M	0
21	2 Ans 10 mois	Border collie	M	0
22	1 Ans 3 mois	Labrador	M	0
23	14 Ans 9 mois	Flat coated retriever	M	1
24	0 Ans 10 mois	Border collie	M	1
25	10 Ans 7 mois	croisé fox	M	1
26	1 Ans 11 mois	Berger australien	M	0
27	1 Ans 3 mois	Border collie	M	1
28	3 Ans 6 mois	x beauceron	M	1
29	3 Ans 8 mois	croisé labrador	M	1
30	2 Ans 9 mois	berger australien	M	0

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des données épidémiologiques âge, race, sexe

iv. Lieu et mode de vie

Deux chiens (7%) vivaient avec plus de trois congénères (chiens), 16 chiens (53%) vivaient avec un à trois congénères, 12 (40%) n'avaient pas de congénère.

Tous les chiens avaient accès au campus vétérinaire de Lyon et côtoyaient des zones de vie de vaches laitières et de rongeurs sauvages.

Vingt (67%) s'étaient baignés dans les 15 jours précédant l'étude. Tous les chiens (100%) avaient bu dans une ornière et/ou un point d'eau dans les 15 jours précédant l'étude.

Tous les chiens de l'étude présentaient un mode de vie mixte en zone périurbaine avec accès à un ou plusieurs types de points d'eau lors des promenades.

Tous les chiens avaient accès régulièrement au site du campus vétérinaire et à ses alentours (parc Lacroix Laval) comportant principalement des eaux stagnantes type étang, marais, bassin/abreuvoir, flaques ou ornières. Certains chiens avaient également accès à des eaux

stagnantes type lac et/ou à des eaux courantes (rivière, torrent, fleuve, source, …) en dehors de la zone géographique de Marcy l'étoile.

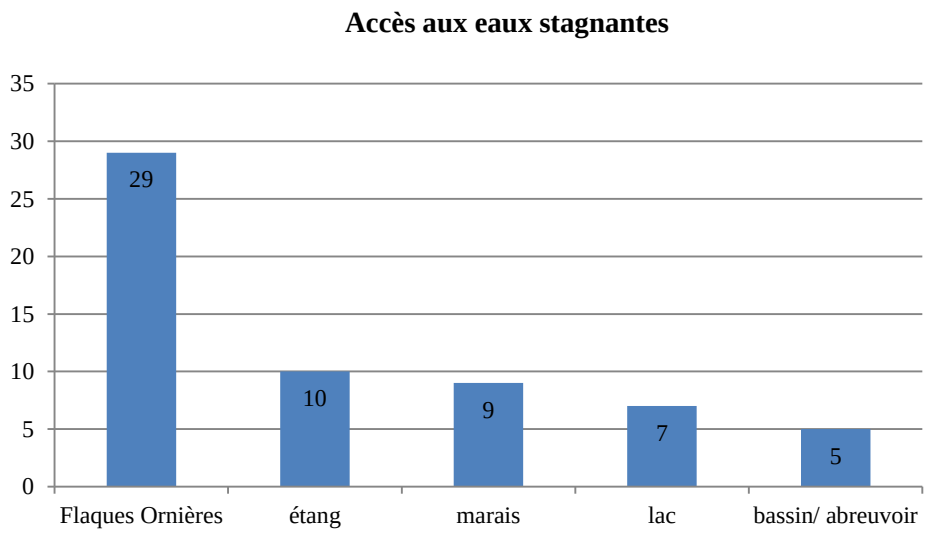

Figure 13 : Répartition des chiens de l'étude par type d'eaux stagnantes

Tous les chiens avaient accès à des eaux stagnantes tout type confondus : cinq chiens (17%) avaient accès à des bassins/abreuvoir, sept (23%) avaient accès à des lacs, neuf (30%) avaient accès à des marais et dix (33%) avaient accès à des étangs. Vingt-neuf chiens (97%) accédaient aux flaques et/ou ornières.

2) Statut vaccinal

Tous les chiens était vaccinés avec un rappel annuel contre les valences maladie de Carré, Hépatite de Rubarth, Parvovirus canin, Leptospirose.

Tous les chiens de l'étude avaient reçu leur dernier rappel vaccinal il y a moins d'un an.

Cinq chiens (17%) avaient été vaccinés contre la leptospirose moins de trois mois avant l'étude, neuf chiens (30%) avaient été vaccinés entre trois et six mois avant l'étude, onze chiens (37%) entre six et neuf mois avant l'étude, cinq chiens (17%) entre neuf et 12 mois avant l'étude.

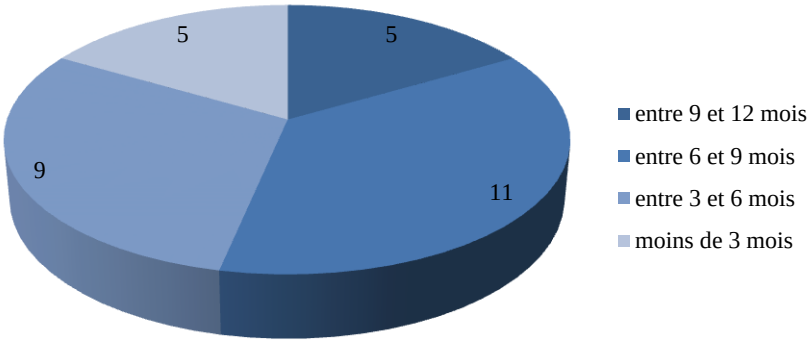

Figure 14: Intervalle entre le dernier rappel vaccinal pour la valence leptospirose et la date de collecte du sérum

Le vaccin utilisé contenait les valences Canicola et Icterohaemorrhagiae. Il s'agissait dans tous les cas de vaccins inactivés (tableau 11).

Seize chiens (53%) avaient reçu la valence leptospirose associée aux valences Carré, Rubarth, Parvovirose et Rage (Eurican®CHPLR, MERIAL) ; cinq chiens (17%) avaient reçu la valence leptospirose associée aux valences Carré, Rubarth, Parvovirose, Parainfluenza et Rage (Eurican®CHPPi2-LR, MERIAL) ; quatre chiens (13%) avaient reçu la valence leptospirose associée aux valences Carré, Rubarth et Parvovirose (Eurican®CHPL, MERIAL) ; deux chiens (7%) avaient reçu la valence leptospirose associée à la valence rage (Enduracell®LR, PFIZER), trois chiens (10%) avaient reçu la valence leptospirose seule (Nobivac® L, INTERVET ; Canigen® L, VIRBAC).

n°	Délai du dernier rappel de vaccination					Vaccin utilisé
	date	moins de 3 mois	3 à 6 mois	6 à 9 mois	9 à 12 mois	
1	10/06/11	✓				Eurican®CHPPi2-L (MERIAL)
2	21/10/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
3	24/02/11		✓			Eurican®CHPLR (MERIAL)
4	01/10/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
5	01/11/10			✓		Eurican®CHPL (MERIAL)
6	01/03/11		✓			Eurican®CHPLR (MERIAL)
7	01/03/11		✓			Enduracell®LR (PFIZER)
8	22/09/10				✓	Eurican®CHPLR (MERIAL)
9	26/01/11		✓			Eurican®CHPLR (MERIAL)
10	01/01/11		✓			Eurican®CHPL (MERIAL)
11	03/12/10			✓		Eurican®CHPPi2-L(MERIAL)
12	01/11/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
13	10/06/11	✓				Eurican®CHPLR (MERIAL)
14	03/01/11		✓			Eurican®CHPPi2-L (MERIAL)
15	29/10/10			✓		Eurican®CHPL (MERIAL)
16	01/11/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
17	24/07/10				✓	Eurican®CHPPi2-L (MERIAL)
18	01/01/11		✓			Eurican®CHPL(MERIAL)
19	10/06/11	✓				Eurican®CHPLR (MERIAL)
20	21/08/10				✓	Eurican®CHPPi2-L (MERIAL)
21	22/09/10				✓	Canigen® L (VIRBAC)
22	01/07/10				✓	Canigen® L (VIRBAC)
23	01/11/10			✓		Nobivac®L (INTERVET)
24	01/12/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
25	01/10/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
26	01/01/11		✓			Enduracell®LR (PFIZER)
27	27/05/11	✓				Eurican®CHPLR (MERIAL)
28	01/05/11	✓				Eurican®CHPLR (MERIAL)
29	01/10/10			✓		Eurican®CHPLR (MERIAL)
30	01/01/11		✓			Eurican®CHPLR (MERIAL)

Tableau 11 : Vaccin utilisé et date du dernier rappel de vaccination

3) Antécédents pathologiques et données cliniques

Aucun chien ne présentait d'anomalies à l'examen clinique ni de comportement urinaire ou dypsique suspect, justifiant son exclusion de l'étude selon les critères symptomatologiques définis dans « Matériel et Méthodes ». La température rectale des chiens était comprise entre 37.8°C et 38.8°C, elle était en moyenne de 38.4°C +/- 0,1. Aucun chien ne présentait d'antécédents pathologiques rénal et/ou hépatique.

B. Analyse macroscopique des urines

Tous les chiens ont fait l'objet d'une analyse d'urine le jour des prélèvements. Les urines avaient systématiquement été récupérées par miction spontanée, le matin, par les propriétaires.

1) Densité urinaire mesurée au réfractomètre

La densité urinaire variait entre 1.012 et 1.050. Elle est en moyenne de 1.041+/- 0.014.

2) Anomalies de la bandelette urinaire

Le pH urinaire était en moyenne de cinq et variait entre cinq et huit. Deux chiens (7%) présentaient une hématurie et neuf (30%) présentaient une leucocyturie. Une bilirubinurie et une protéinurie ont été mises en évidence respectivement chez quatre (13%) et 19 (63%) chiens.

Un (3%) chien présentait une glucosurie (1+). La glycémie de ce chien a été vérifiée et mesurée à 0,8g/dL. (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics, Meylan, France)

Pour dix-huit chiens (60%) aucune plage ne réagissait.

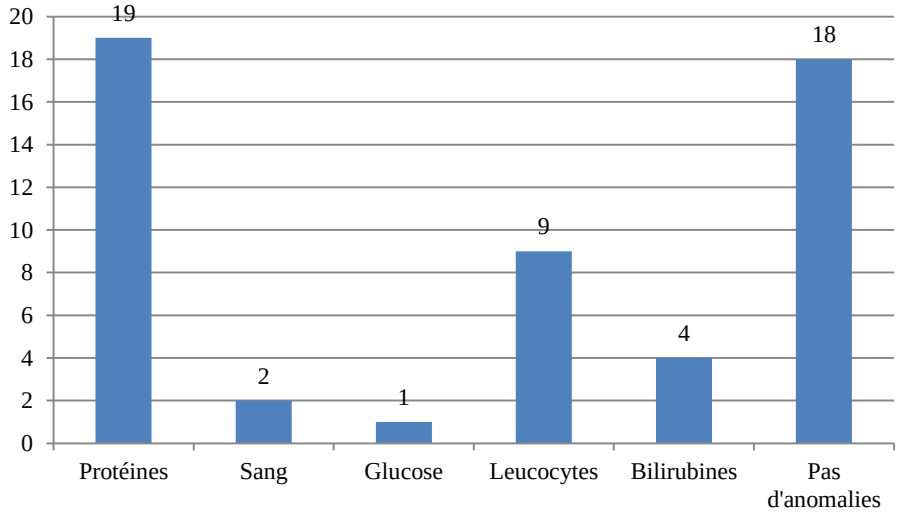

Figure 15 : Résultats de la bandelette urinaire des trente chiens le jour des prélèvements

Une discrète bilirubinurie a pu être notée pour une densité supérieure à 1.025 chez un chien sain [100]. Ainsi quatre chiens présentaient une bilirubinurie non pathologique (tableau 12) variant entre 1+ pour deux chiens (50%) et 2+ pour deux chiens (50%).

Densité	**≤ 1.025**	**>1.025**
Protéinurie	3 chiens	16 chiens
Bilirubinurie	0 chien	4 chiens

Tableau 12 : Nombre de chiens présentant une protéinurie et une bilirubinurie à la BU en fonction de la densité urinaire.

Seize chiens (53%) présentaient une protéinurie variant de 1 + pour 14 chiens (87%) à 2 + pour deux chiens (13%).

C. Résultats sérologiques

Le tableau 13 présente les résultats des sérologies MAT effectuées sur le sérum de chacun des 30 chiens de l'étude.

Réf. Laboratoire	Sérovars testés															
serogroupe	eroheamorragi		Australis			Autumnalis		canicola	Grippotyphosa		Panama		Pomona		Pyrogenes	Sejroe
Num. du prélèvement	19	COP	MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	MOZ	PYR	SJ
1	80	320	40	40	80			2560				40			160	
2	80	160				40	80	80								
3	40	40						80								
4	160	320	40		40			160								
5	40	40			40			80								
6								1280								
7	80	80			40	40	80	80								
8	80	160	40		80			80							80	
9	40	40			40			80							80	
10	80	80						160								
11	80	80						160								
12	40	80	40		40			80								
13	640	1280	2560	1280	1280	320	320	2560	40	40	1280	2560				
14	40	40														
15	40	40	40		40											
16	80	160	40		40	40	40	160							80	
17	80	40	40		40			40								
18	40	40	40		40											
19	320	640	640	40	160			640	1280	320		1280	80	40	40	
20	160	80	80		40			160	40							
21	640	640	1280	1280	640	640	1280					80				
22	40	40	40	40	40										40	
23															80	
24	80	80			80				160	160			40	40		
25	80	80			40	40	80	2560					40	40	160	
26	40	40				40	40	160								
27	640	1280	40		1280			640							320	
28	80	640	40		40			640								
29	160	320						640	640	160				80	40	
30	40	80	40	40	40			640								

titre compris entre 0 et 80
titre compris entre 160 et 640
titre strictement supérieur à 640

Tableau 13 : Résultats des sérologies MAT

1) *Etude des profils sérologiques*

En considérant les critères d'interprétation préalablement définis, onze chiens (37%) n'avaient présenté aucun anticorps, dix chiens (33%) avaient des résultats compatibles avec un profil vaccinal. Pour neuf chiens (30%), la sérologie MAT étaient en faveur d'une infection leptospirosique.

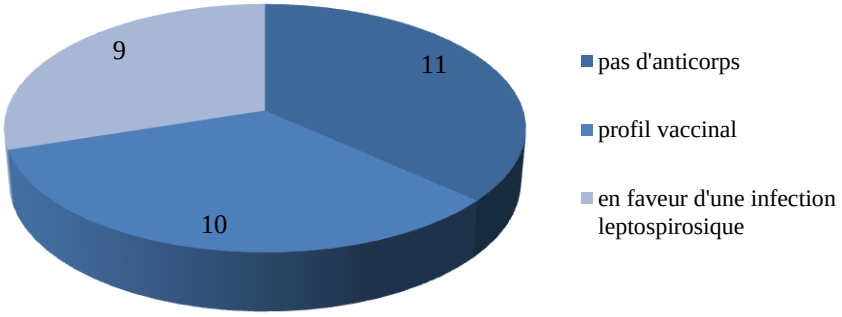

Figure 16 : Profils sérologiques

i. Groupe ne présentant pas d'anticorps (n=11)

Dans ce groupe de 11 chiens ne présentant pas d'anticorps, cinq (46%) avaient été vaccinés entre trois et six mois auparavant, quatre (36%) entre six et neuf mois auparavant, deux (18%) entre neuf et douze mois auparavant. Aucun chien de ce groupe n'avait reçu d'injection de rappel de vaccination dans les trois mois précédant les prélèvements.

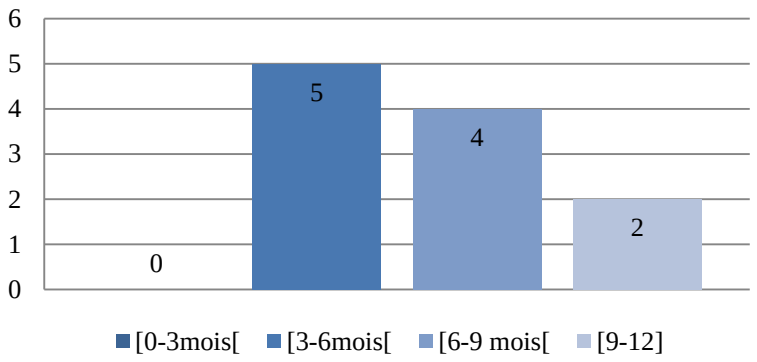

Figure 17 : Antériorité du dernier rappel vaccinal dans le groupe sans anticorps

ii. Groupe présentant un profil sérologique compatible avec la vaccination (n=10)

Le tableau 14 présente les titres des dix chiens de ce groupe.

Réf. Laboratoire	Sérovars testés															
serogroupe	Icteroheamorragiae		Australis			Autumnalis		canicola	Grippotyphosa		Panama		Pomona		Pyrogenes	Sejroe
Num. du prélèvement	19	COP	MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	MOZ	PYR	SJ
2	80	160				40	80	80								
4	160	320	40		40			160								
8	80	160	40		80			80							80	
10	80	80						160								
11	80	80						160								
16	80	160	40		40	40	40	160							80	
20	160	80	80		40			160	40							
26	40	40				40	40	160								
28	80	640	40		40			640								
30	40	80	40	40	40			640								

Tableau 14 : Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec la vaccination

Pour un même chien, la présence simultanée de titres compris entre 160 et 640 pour le sérogroupe Canicola d'une part et pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae d'autre part est définie comme une positivité simultanée pour les sérogroupes vaccinaux.

Dans le groupe de dix présentant un profil sérologique compatible avec la vaccination, un chien (10%) avait été vacciné il y a moins de trois mois et présentait une positivité simultanée des sérogroupes vaccinaux Icterohaemorrhagiae et Canicola. Trois chiens (30%) avaient été vaccinés entre trois et six mois auparavant et aucun n'était positif pour plusieurs sérogroupes simultanément. Quatre chiens (40%) avaient été vaccinés entre six et neuf mois auparavant dont deux présentaient une positivité simultanée pour les sérogroupes vaccinaux. Deux chiens (20%) avaient été vaccinés entre neuf et 12 mois auparavant dont un chien présentait une positivité simultanée pour les sérogroupes vaccinaux.

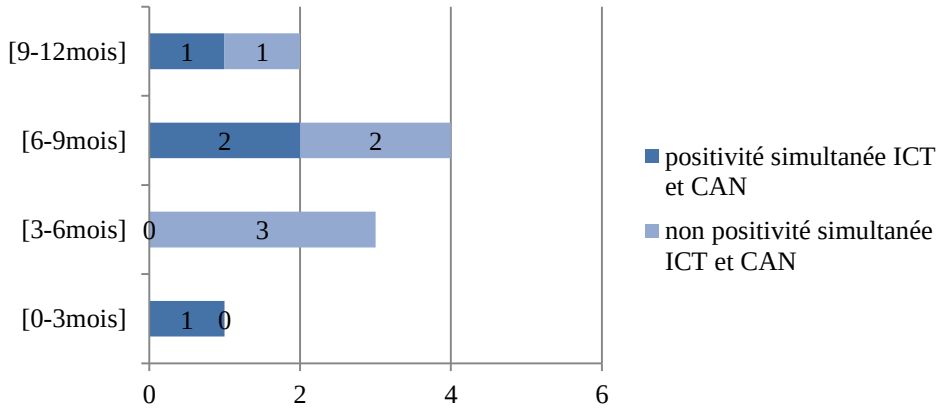

Figure 18 : Antériorité du dernier rappel vaccinal pour les 10 chiens avec un profil vaccinal

Parmi les six chiens présentant des anticorps pour un seul des sérogroupes vaccinaux, quatre présentaient une positivité pour Canicola et avaient le dernier rappel trois à neuf mois auparavant, deux présentaient une positivité pour Icterohaemorrhagiae et avaient reçu le rappel six à 12 mois auparavant.

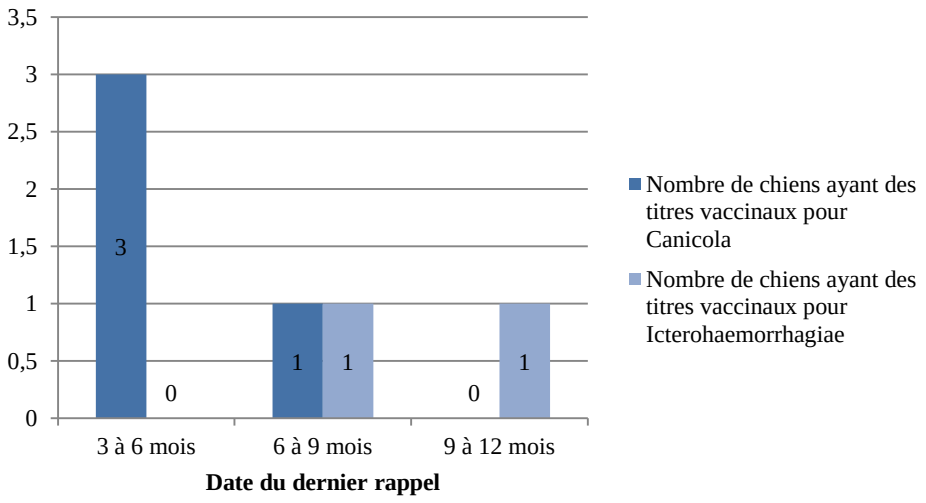

Figure 19 : Antériorité du dernier rappel vaccinal pour les 6 chiens présentant un profil vaccinal et une réaction à un seul sérogroupe.

iii. Groupe présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique (n = 9)

Parmi les neufs chiens présentant des résultats MAT compatibles avec une infection leptospirosique, trois chiens (33%) présentaient un profil compatible avec une infection par Canicola, un chien (11%) présentait par Grippotyphosa et cinq chiens (56%) présentaient des titres positifs pour plusieurs sérogroupes.

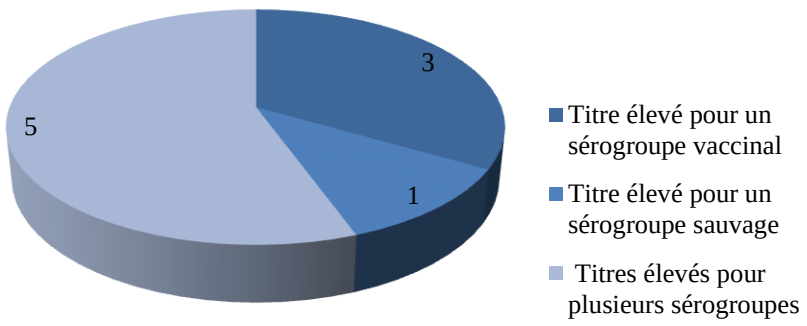

Figure 20: Profil sérologique des chiens présentant une sérologie compatible avec une infection leptospirosique

a) *Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique imputable à un sérogroupe vaccinal (n = 3)*

Les chiens n° 1, n° 6 et n° 25 présentaient un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe vaccinal Canicola (tableau 15). Les titres variaient entre 1280 et 2560.

Réf. Laboratoire	Sérovars testés															
serogroupe	Icteroheamorragiae		Australis			Autumnalis		canicola	Grippotyphosa		Panama		Pomona		Pyrogenes	Sejroe
Num. du prélèvement	19	COP	MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	MOZ	PYR	SJ
1	80	320	40	40	80			**2560**				40			160	
6								**1280**								
25	80	80			40	40	80	**2560**					40	40	160	

Tableau 15: Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptopirosique imputable au sérogroupe Canicola

La dernière vaccination du chien n°1 datait de moins de trois mois avant le prélèvement. Un titre de 320 a été détecté pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

La dernière vaccination du chien n°6 datait de trois à six mois avant le prélèvement. Aucun anticorps n'a été détecté contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae

La dernière vaccination du chien n°25 datait de six à neuf mois avant le prélèvement. Un titre de 80 a été détecté pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, considéré comme non significatif.

b) *Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique imputable à un sérogroupe sauvage (n=1)*

Le chien n°24 présentait un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe sauvage Grippotyphosa avec un titre de 160 (tableau 16).

Réf. Laboratoire	Sérovars testés															
serogroupe	Icteroheamorragiae		Australis			Autumnalis		canicola	Grippotyphosa		Panama		Pomona		Pyrogenes	Sejroe
Num. du prélèvement	19	COP	MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	MOZ	PYR	SJ
24	80	80			80				**160**	**160**			40	40		

Tableau 16 : Profil compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe Grippotyphosa

La dernière vaccination de ce chien datait de six à neuf mois par rapport à la date du prélèvement. Aucun anticorps n'a été détecté contre les sérogroupes vaccinaux.

c) *Profil sérologique en faveur d'une infection leptospirosique avec titres positifs multiples (n = 5)*

Cinq chiens (n°13, n° 19, n°21, n° 27, n°29) présentaient un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique dont on ne pouvait déterminer le sérogroupe responsable car on observait des titres positifs multiples (tableau 17).

Réf. Laboratoire	Sérovars testés															
serogroupe	Icteroheamorragiae		Australis			Autumnalis		canicola	Grippotyphosa		Panama		Pomona		Pyrogenes	Sejroe
Num. du prélèvement	19	COP	MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	MOZ	PYR	SJ
13	640	1280	2560	1280	1280	320	320	2560	40	40	1280	2560				
19	320	640	640	40	160			640	1280	320		1280	80	40	40	
21	640	640	1280	1280	640	640	1280					80				
27	640	1280	40		1280			640							320	
29	160	320						640	640	160				80	40	

Tableau 17: Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptospirosique avec titres positifs multiples

Le chien n°13 présentait des réactions multiples au sérogroupe Panama (titre de 2560), au sérogroupe Canicola (titre de 2560), au sérogroupe Australis (titre de 2560) et au sérogroupe Icterohaemorrhagiae (titre de 1280). La dernière vaccination datait de moins de 3 mois avant le prélèvement.

Le chien n°19 présentait des réactions multiples au sérogroupe Australis (titre de 640), au sérogroupe Grippotyphosa (titre de 1280), au sérogroupe Panama (titre de 1280). La dernière vaccination datait de moins de trois mois avant le prélèvement. Un titre de 640 a été détecté pour le sérogroupe Canicola.

Le chien n°21 présentait des réactions multiples au sérogroupe Australis (titre de 640), au sérogroupe Autumnalis (titre de 1280). La dernière vaccination datait de neuf à 12 mois avant le prélèvement. Un titre de 640 a été détecté pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, aucun titre n'a été détecté pour le sérogroupe Canicola.

Le chien n°27 présentait des réactions multiples au sérogroupe Icterohaemorrhagiae (titre de 1280) et au sérogroupe Australis (titre de 1280). La dernière vaccination datait de moins de trois mois avant le prélèvement. Un titre de 640 a été détecté pour le sérogroupe Canicola.

Le chien n°29 présentait des réactions multiples au sérogroupe Grippotyphosa (titre de 640) et au sérogroupe Canicola (titre de 640). La dernière vaccination datait de moins de trois mois avant le prélèvement. Un titre de de 320 a été détecté pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

Le tableau 18 récapitule les profils sérologiques compatibles avec une infection leptospirosique avec réaction à titres multiples.

N° chien	Sérogroupes : titres MAT compatibles avec une infection leptospirosique						Date dernière vaccination
	Icterohaemorrhagiae	Australis	Autumnalis	Canicola	Grippotyphosa	Panama	
13	1280	2560		2560		2560	< 3mois
19		640			1280	1280	< 3mois
21		640	1280				9-12 mois
27	1280	1280		640			< 3 mois
29	320			640	640		< 3 mois

Tableau 18 : Récapitulatif des profils sérologiques compatibles avec une infection leptospirosique avec réaction à titres multiples

2) *Etude des titres anticorps contre les sérogroupes vaccinaux en fonction de la date du dernier rappel vaccinal*

La répartition des titres contre les sérogroupes vaccinaux en fonction de la date du dernier vaccin est présentée dans le tableau 19.

Sérogroupes	**CANICOLA Titre**			**ICTEROHAEMORRHAGIAE Titre le plus élevé de Copenhageni ou de 19**			Total
Titres / Délai dernier vaccin	0 ;40 ; 80	160 ;320 ; 640	>640	0,40,80	160 ;320 ; 640	>640	
[0-3mois]	0	3	2	0	3	2	5
[3-6mois]	5	3	1	9	0	0	9
[6-9mois]	6	4	1	7	4	0	11
[9-12mois]	4	1	0	2	3	0	5
Total	15	11	4	18	10	2	30

Tableau 19: Répartition des titres en anticorps contre les sérogroupes vaccinaux en fonction du dernier rappel vaccinal

La figure 21 illustre la répartition des titres contre le sérogroupe Canicola en fonction de la date du dernier vaccin

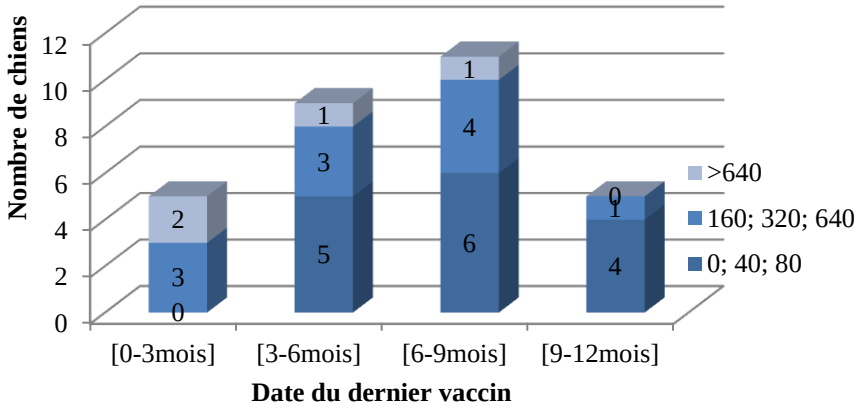

Figure 21: Répartition des titres contre le sérogroupe Canicola en fonction de la date du dernier vaccin

Concernant les titres dirigés contre le sérogroupe Canicola :

- parmi les cinq chiens ayant reçu une vaccination dans les trois mois précédant le prélèvement, trois (60%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, deux (40%) avaient un titre strictement supérieur à 640. Deux chiens présentaient en plus des titres vaccinaux pour Icterohaemorrhagiae. Trois chiens présentaient des titres élevés pour d'autres sérogroupes : Australis (titre de 640 à 2560), Autumnalis (titre de 320 à 1280), Grippotyphosa (titre de 160 à 1280), Panama (titre de 1280 à 2560).
- parmi les neuf chiens ayant reçu une vaccination trois à six mois avant le prélèvement, cinq (55,6%) présentaient un titre strictement inférieur à 160, trois (33,3%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, un (11,1%) présentait un titre strictement supérieur à 640. Aucun de ces chiens ne présentait de titres vaccinaux pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, ni n'était séropositif à d'autres sérogroupes.
- parmi les onze chiens ayant reçu une vaccination six à neuf mois avant le prélèvement, six (54,5%) présentaient un titre strictement inférieur à 160, quatre (36,4%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, un (9,1%) présentait un titre strictement supérieur à 640. Deux chiens présentaient en plus des titres vaccinaux pour Icterohaemorrhagiae. Deux chiens présentaient également une séropositivité à Grippotyphosa (titre de 160 à 640)
- parmi les cinq chiens ayant reçu une vaccination neuf à douze mois avant le prélèvement, quatre (80%) présentaient un titre strictement inférieur à 160, un (20%) présentait un titre compris entre 160 et 640, aucun ne présentait un titre strictement supérieur à 640. Un chien présentait en plus un titre vaccinal pour

Icterohaemorrhagiae. Un chien présentait des titres élevés pour Australis (titre de 640 à 1280) et Autumnalis (titre de 640 à 1280).

Le graphique suivant illustre la répartition des titres contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae en fonction de la date du dernier vaccin.

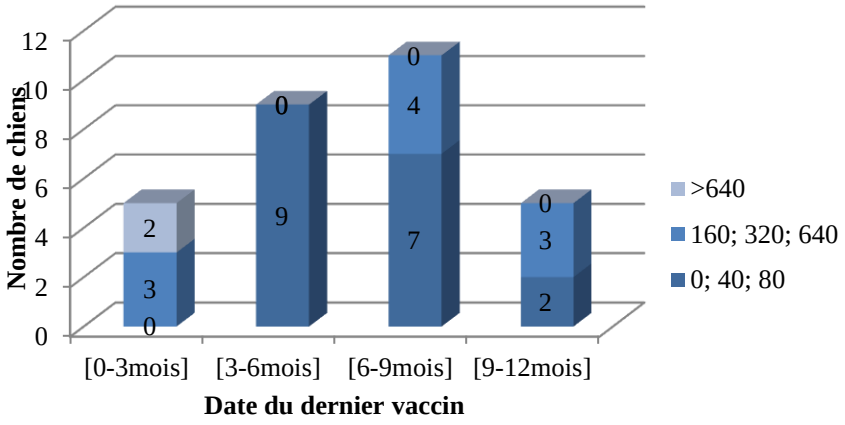

Figure 22 : Répartition des titres contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae en fonction de la date du dernier vaccin

Concernant les titres dirigés contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae:

- parmi les cinq chiens ayant reçu une vaccination dans les trois mois précédant le prélèvement, trois (60%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, deux (40%) avaient un titre strictement supérieur à 640.
- parmi les neuf chiens ayant reçu une vaccination trois à six mois avant le prélèvement, tous (100%) présentaient un titre strictement inférieur à 160.
- parmi les onze chiens ayant reçu une vaccination six à neuf mois avant le prélèvement, sept (63.6%) présentaient un titre strictement inférieur à 160, quatre (36.4%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, aucun ne présentait un titre strictement supérieur à 640.
- parmi les cinq chiens ayant reçu une vaccination neuf à douze mois avant le prélèvement, deux (40%) présentaient un titre strictement inférieur à 160, trois (60%) présentaient un titre compris entre 160 et 640, aucun ne présentait un titre strictement supérieur à 640.

3) *Critères épidémiologiques et résultats MAT*

Dans le groupe des neuf chiens ayant une sérologie MAT positive, c'est-à-dire compatible avec une infection leptospirosique, l'âge était compris entre 10 mois et 10 ans et sept mois, la moyenne d'âge était de quatre ans et deux mois +/- 38 mois.

Cinq chiens (56%) étaient castrés, trois chiens (33%) vivaient sans congénères, cinq chiens (56%) vivaient avec un à trois congénères et un chien (11%) vivait avec plus de trois congénères.

Un chien (11%) avait uniquement accès aux eaux stagnantes, un chien (11%) avait uniquement accès aux eaux courantes, sept chiens (78%) avaient accès aux eaux stagnantes et aux eaux courantes. Plus précisément parmi les types d'eaux stagnantes fréquentés, trois chiens (33%) fréquentaient les marais, trois chiens (33%) fréquentaient les étangs, un chien (11%) fréquentait les lacs, trois chiens (33%) fréquentaient les bassins ou abreuvoirs et huit chiens (89%) avaient accès aux flaques et ornières. Huit chiens (89%) s'étaient baignés dans les 15 jours précédant les prélèvements.

Pour quatre chiens (45%) la dernière vaccination datait de moins de trois mois, pour un chien (11%) de trois à six mois, pour trois chiens (33%) de six à neuf mois et pour un chien (11%) la dernière vaccination datait de neuf à 12 mois.

Les données épidémiologiques des chiens ayant un profil sérologique MAT compatible avec une infection leptospirosique sont présentées dans le tableau 20.

N° prélève-ment	**Classe d'âge**	**Castration**	**Nombre de congénères**	**Accès aux eaux stagnantes**	**Accès aux eaux courantes**	**Baignade dans les 15 jours avant prélèvement**	**Date dernier vaccin**
1	[1 et 4 ans]	non	1 à 3	oui	non	non	< 3 mois
6	[1 et 4 ans]	non	0	oui	oui	oui	3 à 6 mois
13	>8 ans	oui	0	oui	oui	oui	< 3 mois
19	[1 et 4 ans]	non	non	oui	oui	oui	<3 mois
21	[1 et 4 ans]	non	> 3	oui	oui	oui	9 à 12 mois
24	< 1 an	oui	1 à 3	oui	oui	oui	6 à 9 mois
25	<1 an	oui	1 à 3	oui	oui	oui	6 à 9 mois
27	[1 et 4 ans]	oui	1 à 3	non	oui	oui	< 3 mois
29	[1 et 4 ans]	oui	1 à 3	oui	oui	oui	6 à 9 mois

Tableau 20 : Profil épidémiologique des chiens avec un profil sérologique MAT compatible avec une infection leptospirosique

Concernant le groupe des 21 chiens ayant une sérologie MAT négative, c'est-à-dire ne présentant pas d'anticorps, ou compatible la vaccination, l'âge était compris entre huit mois et cinq ans et cinq mois, la moyenne d'âge était de deux ans et un mois +/- 14 mois.

Neuf chiens (43%) étaient castrés, neuf chiens (43%) vivaient sans congénères, onze chiens (52%) vivaient avec un à trois congénères et un chien (5%) vivait avec plus de trois congénères.

Un chien (5%) avait uniquement accès aux eaux courantes, vingt chiens (95%) avaient accès aux eaux stagnantes et aux eaux courantes. Plus précisément parmi les types d'eaux stagnantes fréquentés, six chiens (29%) fréquentaient les marais, six chiens (29%) fréquentaient les étangs, six chiens (29%) fréquentaient les lacs, deux chiens (10%) fréquentaient les bassins ou abreuvoirs et 20 chiens (95%) avaient accès aux flaques et ornières. Douze chiens (57%) s'étaient baignés dans les 15 jours précédents les prélèvements.

Pour un chien (5%) la dernière vaccination datait de moins de 3 mois, pour huit chiens (38%) la dernière vaccination datait de trois à six mois, pour huit chiens (38%) la dernière vaccination datait de six à neuf mois et pour quatre chiens (19%) la dernière vaccination datait de neuf à 12 mois.

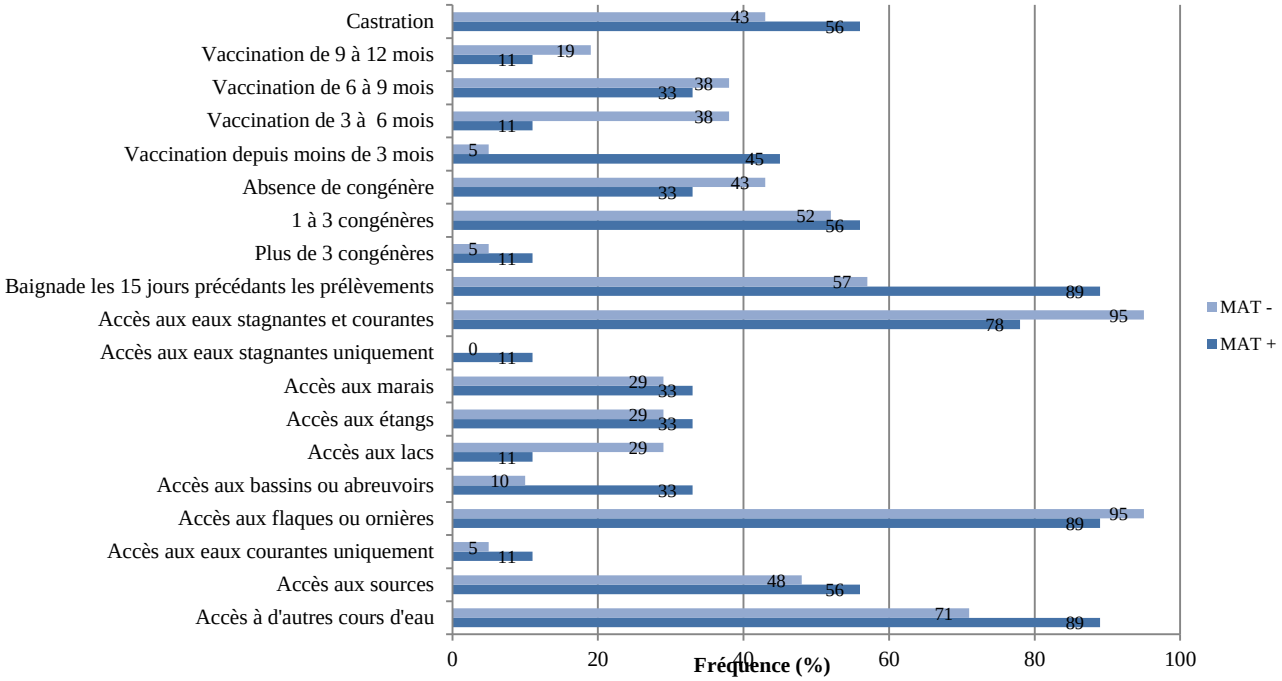

Figure 23: Fréquence des sérologies MAT selon différents critères épidémiologiques

D. Résultats des PCR

Deux chiens (6,7%) présentaient une PCR positive sur sang (n°7, n°11).

Quatre chiens (13,3%) présentaient une PCR positive sur urine (n°12, n°13, n°24, n°26).

Aucun chien ne présentait à la fois une PCR positive sur sang et urine.

	PCR sang +	**PCR sang -**	**Total**
PCR urine +	0	4	4
PCR urine -	2	24	26
Total	2	28	30

Tableau 21 : Résultats comparés des tests PCR sur sang et urine

E. Critères épidémiologiques et résultats PCR

Six chiens présentaient une PCR positive sur sang ou sur urine. Pour ces chiens, l'âge était compris entre 10 mois et 10 ans et un mois, la moyenne d'âge était de trois ans et six mois +/- 44 mois. Dans ce groupe, quatre chiens (67%) étaient castrés, trois chiens (50%) vivaient sans congénères, deux chiens (33%) vivaient avec un à trois congénères et un chien (17%) vivait avec plus de trois congénères. Un chien (17%) avait uniquement accès aux eaux stagnantes, les cinq autres chiens (83%) avaient accès aux eaux stagnantes et aux eaux courantes. Plus précisément parmi les types d'eaux stagnantes fréquentés, deux chiens (33%) fréquentaient les marais, trois chiens (50%) fréquentaient les étangs, deux chiens fréquentaient les lacs, un chien (17%) fréquentait les bassins ou abreuvoirs et tous les chiens avaient accès aux flaques et ornières.

Quatre chiens (67%) s'étaient baignés dans les 15 jours précédents les prélèvements.

Pour un chien (17%) la dernière vaccination datait de moins de trois mois, pour deux chiens (33%) la dernière vaccination datait de trois à six mois, pour trois chiens (50%) la dernière vaccination datait de six à neuf mois.

La figure 25 résume la fréquence des résultats PCR selon différents critères épidémiologiques.

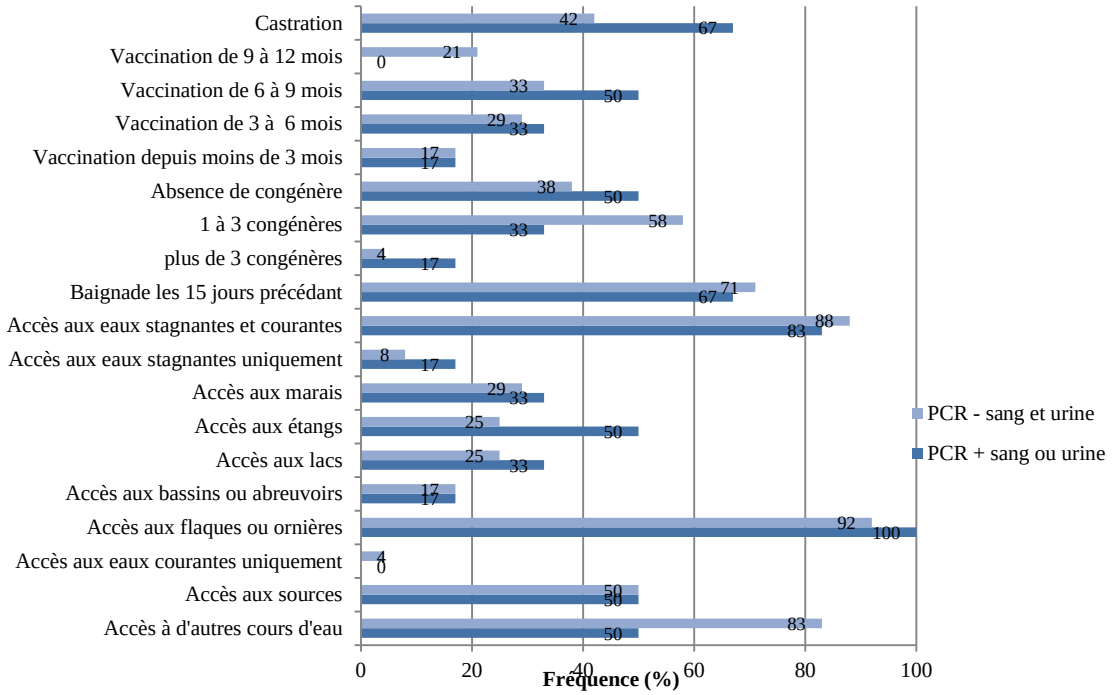

Figure 24 : Fréquence des résultats PCR selon différents critères épidémiologiques

Vingt-quatre chiens présentaient une PCR négative sur sang et sur urine. Dans ce groupe, l'âge était compris entre huit mois et 14 ans et neuf mois, la moyenne d'âge était de trois ans et un mois +/- 38 mois.

Dix chiens (42%) étaient castrés, neuf chiens (38%) vivaient sans congénères, 14 chiens (58%) vivaient avec un à trois congénères et un chien (4%) vivait avec plus de trois congénères.

Un chien (4%) avait uniquement accès aux eaux courantes, deux chiens (8%) avaient uniquement accès aux eaux stagnantes, 21 chiens (88%) avaient accès aux eaux stagnantes et aux eaux courantes. Plus précisément parmi les types d'eaux stagnantes fréquentés, sept chiens (29%) fréquentaient les marais, six chiens (25%) fréquentaient les étangs, six chiens (25%) fréquentaient les lacs, quatre chiens (17%) fréquentaient les bassins ou abreuvoirs et 22 chiens (92%) avaient accès aux flaques et ornières.

Dix-sept chiens (70%) s'étaient baignés dans les 15 jours précédents les prélèvements.

Pour quatre chiens (17%) la dernière vaccination datait de moins de trois mois, pour sept chiens (29%) de trois à six mois, pour huit chiens (33%) de six à neuf mois et pour cinq chiens (21%) de neuf à 12 mois.

F. Corrélation PCR/Sérologie

Le tableau 22 récapitule les résultats comparés des tests MAT et PCR pour les chiens de l'étude.

	PCR + **(sang et/ou urine)**	**PCR –** **(sang et/ou urine)**	**Total**
MAT +	2	7	9
MAT –	4	17	21
Total	6	24	30

Tableau 22: Résultats comparés des tests MAT et PCR

Neuf chiens (30% de l'effectif total) présentaient une sérologie compatible avec une infection leptospirosique. Parmi eux :

- Le chien n°13 (11%) présentait une PCR positive sur urine, une PCR négative sur sang et un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique avec réactions à titres multiples au sérogroupe Panama (titre de 2560), au sérogroupe Canicola (titre de 2560), au sérogroupe Australis (titre de 2560) et au sérogroupe Icterohaemorrhagiae (titre de 1280).
- Le chien n°24 (11%) présentait une PCR positive sur urine, une PCR négative sur sang et un profil sérologique compatible avec une infection imputable au sérogroupe Grippotyphosa (titre de 160). Ce chien présentait également une glucosurie à la bandelette urinaire (1+).
- Sept chiens (78%) présentaient des PCR négatives sur sang et urine. Les chiens n°1, n°6 et n°25 présentaient un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe vaccinal Canicola. Les titres variaient entre 1280 et 2560. Le chien n°19 présentait des réactions multiples au sérogroupe Australis (titre de 640), au sérogroupe Grippotyphosa (titre de 1280) et au sérogroupe Panama (titre de 1280). Le chien n°21 présentait des réactions multiples au sérogroupe Australis (titre de 640) et au sérogroupe Autumnalis (titre de 1280). Le chien n°27 présentait des réactions multiples au sérogroupe Icterohaemorrhagiae (titre de 1280) et au sérogroupe Australis (titre de 1280). Le chien n°29 présentait des réactions multiples au sérogroupe Grippotyphosa (titre de 640) et au sérogroupe Canicola (titre de 640).

Dix-sept chiens (56,7%) avaient une sérologie négative ou compatible avec la vaccination et aucune PCR positive, ni sur sang, ni sur urine.

Quatre chiens (13,3%) avaient une sérologie négative ou compatible avec la vaccination et une PCR positive sur sang ou sur urine. Parmi eux deux (n°7, n°11) (50%) avaient une PCR positive sur sang et une PCR négative sur urine, et deux (n°12, n°26) (50%) avaient une PCR positive sur urine et une PCR négative sur sang.

IV. Discussion

A. Population d'étude

Les chiens inclus dans cette étude étaient exclusivement des chiens mâles. La restriction d'inclusion aux mâles est justifiée par le fait que les mâles sont naturellement plus exposés à l'infection leptospirosique peut-être en raison de leur comportement d'exploration plus développé que les femelles [112, 102, 51, 20, 111]. L'objectif de l'étude était en effet de mettre en évidence l'existence de portage sain de leptospires pathogènes chez le chien et non de faire une étude de prévalence.

Dans notre population d'étude, une surreprésentation des animaux de compagnie est observée, alors que les activités de chasse ou de travail sont considérées comme facteurs de risque [111].

L'âge moyen des chiens de l'étude est de deux ans et 10 mois avec une surreprésentation de la classe d'âge un à quatre ans, ce qui n'est pas représentatif de l'ensemble de la population canine. Les chiens d'âge moyen sont plus actifs à l'extérieur par rapport à leurs congénères plus âgés, ce qui augmenterait leur exposition naturelle à l'agent infectieux [112].

Tous les chiens de l'étude étaient à jour dans leur vaccination c'est-à-dire que le dernier rappel datait de moins d'un an, ce qui constitue un biais de recrutement. Il est admis que le vaccin utilisé actuellement en Europe comportant les souches inactivées de L. canicola et L. icterohaemorrhagiae ne protège pas totalement contre la maladie. Toutefois la vaccination limite ou empêche l'excrétion de l'agent pathogène [76]. En effet il n'existe pas de protection croisée entre les sérogroupes, l'infection peut donc être due à un sérogroupe non vaccinal. D'autre part, les chiens vaccinés peuvent occasionnellement être infectés par des sérogroupes vaccinaux en raison d'une immunité vaccinale insuffisante ou incomplète pour certains sérovars des sérogroupes vaccinaux. Il existe en effet des cas documentés de chiens vaccinés infectés par des sérogroupes vaccinaux [4, 10, 59].

Tous les chiens de l'étude avaient un mode de vie mixte à l'extérieur et à l'intérieur, vivant à proximité de divers points d'eau stagnante et/ou courante. Ce critère est un critère d'inclusion constituant un facteur de risque prédisposant à une infection par des leptospires [40].

Aucun chien n'avait présenté d'antécédents pathologiques rénaux et/ou hépatiques. L'interrogation précise du propriétaire sur le comportement dipsique et urinaire du chien ainsi qu'un examen clinque complet de chaque chien n'avaient mis en évidence aucun symptôme

évocateur d'une infection leptospirosique clinique en cours. Tous les chiens de l'étude étaient donc apparemment sains et n'avaient jamais présenté de forme clinique de leptospirose par le passé à la connaissance des propriétaires.

B. Apport des résultats de la bandelette urinaire

1) Cas du chien présentant une glucosurie

Un chien présentait une glucosurie (1+) à la bandelette urinaire avec une densité urinaire de 1.024. Cependant ce résultat doit être exploité en tenant compte de la glycémie. Une glycémie supérieure à 1,8g/dL entraine une glucosurie par saturation du mécanisme de réabsorption rénale du glucose [81]. Suite à ce résultat, la glycémie avait alors été mesurée à 0,8 g/dL pour ce chien, ce qui est dans les valeurs usuelles.

La glucosurie observée pour ce chien, ne présentant par ailleurs aucun symptôme clinique évocateur de la leptospirose, témoignerait donc d'une atteinte tubulaire non spécifique mais potentiellement évocatrice d'un portage rénal asymptomatique de leptospires. Ce chien présentait un profil compatible avec une infection imputable au sérogroupe Grippotyphosa avec un titre faible de 160 et une PCR positive sur urine, appuyant d'avantage l'hypothèse de statut de porteur asymptomatique pour ce chien.

2) Interprétation de la protéinurie et de la bilirubinurie en fonction de la densité urinaire

Concernant la protéinurie, le consensus établi au congrès de l'ACVIM 2005 [61] indique que toute protéinurie devrait être prise en compte indépendamment de la densité urinaire et par conséquent quantifiée. Néanmoins tous les chiens de l'étude étant des mâles, la présence de sperme ou de liquide séminal peut entrainer une légère protéinurie [86]. Dans l'absolu, une mesure du rapport protéine sur créatinine urinaire aurait dû être réalisée sur chaque chien, idéalement sur urine prélevée par cystocentèse. Le caractère invasif de cet acte nous y a fait renoncer.

C. Analyse des résultats sérologiques MAT

1) Groupe ne présentant pas d'anticorps

Onze chiens vaccinés depuis plus de trois mois avant le prélèvement n'avaient présenté aucun anticorps. Ces résultats concordent avec le fait que l'élévation des titres vaccinaux est transitoire, généralement détectée dans les trois mois suivant la vaccination [16].

2) Groupe présentant un profil sérologique compatible avec la vaccination

Dix chiens présentaient un profil sérologique compatible avec la vaccination. La majorité des chiens de ce groupe avaient reçu leur dernier rappel depuis plus de trois mois. Dans six cas sur dix, on n'observait pas de positivité simultanée au sérogroupe Canicola et au sérogroupe Icterohaemorrhagiae, avec le plus souvent un titre vaccinal pour Canicola seul. Ainsi le pouvoir immunogène agglutinant des souches vaccinales canicola et icterohaemorrhagiae ne seraient pas identiques entre elles pour un même individu à un temps donné.

Parmi les quatre chiens de ce groupe qui présentaient une positivité simultanée aux deux sérogroupes vaccinaux, trois (75%) étaient vaccinés depuis plus de six mois

Il semblerait que les anticorps agglutinants contre le sérogroupe Canicola soient détectés majoritairement trois à neuf mois après la vaccination alors que les anticorps agglutinant contre le sérogroupe Icterohaemorrhagiae soient détectés majoritairement plus tard six à 12 mois après la vaccination. Or 3 à 6 mois après la vaccination les anticorps agglutinants post-vaccinaux ne sont pratiquement plus détectables. Ainsi cette observation pourrait s'expliquer par des contacts environnementaux réguliers avec les sérogroupes Canicola et Icterohaemorragiae à l'origine d'une relance anamnestique.

3) Groupe présentant un profil compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe vaccinal Canicola

Les chiens n°1, n°6 et n°25 présentaient respectivement des titres de 2560, 1280 et 2560 pour le sérogroupe vaccinal Canicola. L'hypothèse d'une infection leptospirosique imputable au sérogroupe Canicola est discutable pour ces trois chiens. Le chien étant en effet l'hôte principal du sérogroupe Canicola, suite à l'inoculation du vaccin bivalent inactivé contenant les sérogroupes Canicola et Icterohaemorrhagiae, le titre d'anticorps agglutinant induit par la vaccination pourrait être supérieur pour ce sérogroupe que celui induit par Icterohaemorrhagiae [76]. Ces titres élevés pourraient alors correspondre à des titres vaccinaux pour ces trois chiens, d'autant plus que les individus n°1 et n°6 étaient vaccinés

depuis moins de six mois. Le seuil des titres vaccinaux pris en compte pour Canicola mériterait peut-être d'être relevé, comme cela a été fait dans de précédentes études [20, 23, 39, 46].

Pour le chien n°25, vacciné depuis plus de six mois, l'hypothèse d'un contact ancien avec des leptospires du sérogroupe Canicola est plus probable, la persistance des anticorps agglutinants vaccinaux étant limitée dans le temps.

Sur les dernières années, le laboratoire des leptospires du Campus Vétérinaire de Lyon rapporte que les sérogroupes Canicola et Icterohaemorrhagiae figurent parmi les plus représentés, y compris après exclusion des profils vaccinaux [51]. Toutefois, pour l'espèce canine, hôte principal du sérogroupe Canicola, la définition du seuil de séropositivité au sérogroupe Canicola reste un problème majeur, notamment en absence de symptômes évocateurs de leptospirose.

4) Cas du chien n° 24 présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique imputable au sérogroupe Grippotyphosa

Ce chien présentait un titre de 160 pour le sérogroupe Grippotyphosa et une PCR positive sur urine associée à une glycosurie. Les titres étant très faibles, il est plus probable qu'il s'agisse d'une réaction croisée non spécifique avec les sérogroupe vaccinaux qu'un contact récent avec des souches pathogènes de leptospires du sérogroupe Grippotyphosa. Toutefois la prévalence du sérogroupe Grippotyphosa chez le chien reste faible mais non négligeable [51]. Dans les rapports annuels de l'activité diagnostic « leptospirose » établis entre 2007 et 2009, sur respectivement 120, 244 et 224 sérums de chiens déclarés infectés, trois (2,5%), sept (2,8%) et 18 cas (8%) ont respectivement été imputés au sérogroupe Grippotyphosa (titre ≥ 320) [116]. A nouveau la question du seuil de positivité peut être posée. Une cinétique sérologique aurait été intéressante dans ce cas pour étayer notre hypothèse. En outre, comme nous l'avons détaillé précédemment, la positivité de la PCR sur urine couplée à la présence d'une glycosurie appuient l'hypothèse d'un statut de porteur asymptomatique pour ce chien.

5) *Cas présentant un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique avec positivités multiples*

Cinq chiens présentaient une positivité simultanée pour plusieurs sérogroupes, tous avaient des PCR négatives sur sang et urine.

Les chiens n°13, n°19, n°21 présentaient des profils similaires compatibles avec une infection leptospirosique, avec des titres très élevés pour de nombreux sérogroupes. Ces chiens ont très probablement eu un contact antérieur avec une souche pathogène non vaccinale. La détermination du sérogroupe infestant reste ici un problème majeur.

Le chien n° 27 présentait des titres de 1280 pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae et pour le sérogroupe Australis. Ce résultat peut être celui d'une réaction croisée aux sérogroupes vaccinaux, la vaccination datant de moins de trois mois, ou celui d'une infection leptospirosique. Une cinétique sérologique aurait été intéressante. Cependant les résultats ne permettent pas de conclure quant au sérogroupe infectant

Le chien n°29 présentait une positivité à 640 pour le sérogroupe Canicola et une positivité à 640 pour le sérogroupe Grippotyphosa. Ce résultat peut être celui d'une réaction croisée avec les sérogroupes vaccinaux, la vaccination datant de moins de trois mois, ou celui d'une infection leptospirosique. Une cinétique sérologique aurait été intéressante. Cependant les résultats ne permettent pas de conclure quant au sérogroupe infectant.

D. Critères influençant les résultats MAT

1) *Vaccination*

Les chiens vaccinés depuis moins de trois mois ont tendance à présenter majoritairement une sérologie MAT positive. Ce résultat peut s'expliquer par l'immunité vaccinale, notamment pour le sérogroupe Canicola dont le titre seuil de positivité en faveur d'une infection leptospirosique pourrait être ré-évalué d'autant plus dans les trois mois suivant la vaccination. Des réactions croisées avec les sérogroupes vaccinaux peuvent également être observées, les anticorps agglutinants persistant en moyenne jusqu'à trois mois après la vaccination.

Autant de chiens vaccinés depuis plus de trois mois présentent des sérologies MAT positives que des sérologies MAT négatives. Ainsi face à un chien asymptomatique vacciné depuis plus de trois mois présentant un profil douteux, il est difficile de trancher entre l'hypothèse d'un

portage asymptomatique et l'hypothèse d'un contact ancien avec une souche de leptospires pathogènes ou enfin l'hypothèse d'une réaction croisée avec des sérogroupes vaccinaux.

2) *Influence de la vaccination sur les titres vaccinaux*

Parmi les cinq chiens vaccinés depuis moins de trois mois, trois (60%) présentaient des titres élevés pour des sérogroupes non vaccinaux (Autumnalis, Australis, Grippotyphosa et Panama) variant entre 160 et 2560, et deux chiens (40%) des titres élevés (supérieurs à 640) pour les sérogroupes vaccinaux Canicola et Icterohaemorrhagiae. Parmi les 15 chiens vaccinés depuis plus de trois mois, trois (20%) présentaient une séropositivité pour des sérogroupes non vaccinaux (Australis, Autumnalis, Grippotyphosa) avec des titres variant entre 160 et 1280, et deux (13,3%) présentaient des titres supérieurs à 640 pour le sérogroupe Canicola.

Ces résultats illustrent la difficulté d'interprétation des résultats pour des animaux vaccinés depuis moins de trois mois, lorsque le sérogroupe suspecté est vaccinal. Ainsi il est probable que des titres élevés correspondant aux valences vaccinales détectés dans les trois mois suivant la vaccination soient plutôt dus à la vaccination qu'à une infection [16]. En outre, la protection vaccinale est spécifique de sérogroupe. Des titres élevés pour les sérogroupes non vaccinaux sont compatibles avec une infection leptospirosique chez les chiens vaccinés.

3) *Facteurs de risque*

Parmi les neuf chiens qui présentaient une sérologie compatible avec une infection leptospirosique, huit avait eu accès aux eaux stagnantes ou aux eaux courantes exclusivement et s'étaient baignés dans les 15 jours précédant le prélèvement. Parmi les neuf chiens qui ne s'étaient pas baignés dans les 15 jours, huit présentaient une sérologie MAT compatible avec la vaccination ou une absence d'anticorps. Ainsi le facteur baignade apparait comme un facteur de risque pour l'infection leptospirosique, en accord avec les données retrouvées dans les publications [102]. Toutefois ces résultats ne sont pas significatifs compte tenu de la taille de notre population d'étude et de l'absence de population contrôle sans contact absolu avec l'eau.

E. Analyse des résultats PCR

Six chiens (20%) présentaient une PCR sur sang ou urine positive. Tous étaient cliniquement sains, ils peuvent ainsi être considérés comme porteurs asymptomatiques. Il est nécessaire de rappeler que la PCR est une méthode très sensible qui ne détecte que des fragments du génome des leptospires, ne reflétant ni leur intégrité, ni leur viabilité.

Parmi eux deux chiens (6,7%) présentaient une PCR positive sur sang avec une PCR négative sur urine. Ainsi parmi une population de 30 chiens apparemment sains ayant un mode de vie susceptible de favoriser le contact avec un milieu contaminé par des leptospires pathogènes, 6,7 % d'entre eux présentent une leptospirémie non associée à une leptospirurie au moment du prélèvement. Aucune donnée ne semble disponible à ce sujet dans la bibliographie. Il est fort probable que les PCR positives sur sang soient ici le reflet d'un portage asymptomatique pour ces deux chiens avec potentiellement une leptospirurie intermittente. D'après le schéma pathogénique théorique (figure 7), les leptospires sont d'abord présentes dans le sang où elles sont détectables par PCR puis dans les urines. Les anticorps apparaissent entre une semaine et 10 jours après le contact infectieux et sont titrés par MAT [42]. Cependant cette chronologie n'est probablement pas aussi stricte en réalité et reste assez floue lors de portage asymptomatique. En effet suite à un contact ancien avec des leptospires pathogènes, il pourrait subsister dans le sang des fragments de leptospires associés ou non à une excrétion urinaire intermittente. Aucune publication n'est disponible à ce sujet.

Pour quatre autres individus (13,3%), la PCR sur urine était positive tandis que la PCR sur sang était négative. Ainsi, parmi une population de 30 chiens ayant un mode de vie susceptible de favoriser le contact avec un milieu contaminé par des leptospires pathogènes, 13,3 % d'entre eux présentent une leptospirurie. Ces chiens ont probablement été en contact ancien avec des leptospires pathogènes puis ont développé une infection ancienne asymptomatique à l'origine de l'excrétion urinaire de leptospires, qui peut perdurer des mois voire des années après une infection chez l'homme [11, 37]. Ce sont très probablement des porteurs asymptomatiques, excréteurs de leptospires pathogènes. Bien que notre résultat soit à confirmer sur un plus grand effectif, le taux de leptospirurie semble supérieur à ceux retrouvés dans les données de la bibliographie, très probablement à cause de nos critères d'inclusion qui sont des facteurs de risque. En Irlande, 7,05% des chiens domestiques présenteraient une leptospirurie [90]. Une leptospirurie a aussi été mise en évidence chez 8,8% des chiens aux Etats-Unis [48].

F. Critères influençant les résultats PCR

1) Vaccination

Le délai de vaccination ne semble pas interférer avec les résultats PCR dans notre étude. Parmi les chiens vaccinés depuis moins de trois mois, autant de PCR positives que de PCR négatives étaient observées. Ce résultat est en accord avec une étude récente menée sur 20 chiens, qui a démontré qu'une vaccination récente n'interférait pas avec la méthode PCR pour le diagnostic de chiens atteints de leptospirose [71].

2) Facteurs de risque

La majorité des chiens présentant une PCR positive sur sang ou urine étaient castrés, contrairement aux données de la bibliographie [102], ne vivaient pas avec d'autres congénères, et avaient accès principalement à des flaques ou ornières et à des étangs. [102]. Toutefois ces résultats ne sont pas significatifs compte tenu de la taille de notre population d'étude et des critères de sélection.

G. Concordance des résultats MAT et PCR

1) Résultats concordants

Parmi les neuf chiens présentant une sérologie compatible avec une infection leptospirosique, deux chiens (n°13 et n°24) présentaient une PCR positive sur urine associée à une PCR négative sur sang, et aucun sur sang.

Le chien n°13 présentait un profil sérologique compatible avec une infection leptospirosique avec réactions à titres multiples au sérogroupe Panama (titre de 2560), au sérogroupe Canicola (titre de 2560), au sérogroupe Australis (titre de 2560) et au sérogroupe Icterohaemorrhagiae (titre de 1280). Ce chien a très probablement été en contact avec une souche pathogène non déterminable à l'origine d'un portage asymptomatique et d'une excrétion urinaire de leptospires pathogènes.

Le chien n°24 présentait un profil compatible avec une infection imputable au sérogroupe Grippotyphosa avec un titre faible de 160. Ce chien présentait également une glucosurie sur la bandelette urinaire (1+) sans hyperglycémie en faveur d'une tubulopathie rénale. Ce chien est donc vraisemblablement porteur, excréteur asymptomatique de leptospires pathogènes avec forte suspicion de tubulopathie rénale. Il est difficile de conclure quant au sérogroupe responsable car le titre MAT observé reste faible. Une cinétique sérologique aurait été intéressante.

Dix-sept chiens avaient une sérologie négative ou compatible avec la vaccination et des PCR négatives sur sang et urine. Ces chiens peuvent être considérés comme sains, non porteurs ni excréteurs de leptospires pathogènes. Ils n'ont pas été en contact avec une souche pathogène malgré un mode de vie susceptible de privilégier l'exposition aux leptospires pathogènes.

2) Résultats non concordants

Sept chiens présentaient une sérologie compatible avec une infection leptospirosique avec des PCR sang et urine négatives. Pour ces chiens, soit ils n'ont jamais été en contact avec une souche pathogène, les résultats MAT étant des « faux positifs », dus à des réactions croisées avec les sérogroupes vaccinaux ou à un seuil de positivité trop bas ; soit ils ont eu un contact ancien réel avec une souche pathogène à l'origine d'une réaction immunitaire silencieuse efficace, débarrassant leur sang et leurs reins de tout fragment d'ADN de leptospire détectable par méthode PCR ; soit ils sont effectivement porteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes mais avec une excrétion de leptospires intermittente non retrouvée le jour du prélèvement.

Quatre chiens avaient une sérologie négative ou compatible avec la vaccination avec une PCR positive sur sang ou sur urine.

Parmi eux deux avaient une PCR positive sur sang et une PCR négative sur urine. Ces deux chiens pouvaient être en phase préclinique et avoir eu un contact récent avec une souche de leptospires pathogènes moins de sept jours avant le prélèvement : les résultats PCR positifs sur sang correspondraient alors à la phase de leptospirémie précoce avant que les anticorps agglutinants ne soient détectables. Ces deux chiens pouvaient aussi avoir eu un contact ancien avec des leptospires pathogènes, à l'origine d'une infection asymptomatique et d'une réaction immunitaire, sans anticorps agglutinants, non totalement efficace car laissant dans le sang des fragments de leptospires pathogènes détectables par PCR sur sang. Ces chiens sont donc potentiellement des porteurs asymptomatiques et des excréteurs intermittents de leptospires pathogènes.

Deux autres avaient une PCR positive sur urine et une PCR négative sur sang. Ces deux chiens sont des porteurs asymptomatiques excréteurs de leptospires pathogènes suite à un contact ancien avec des leptospires pathogènes dont on ne retrouve plus de traces sérologiques.

H. Conclusion quant à l'utilisation des tests MAT et PCR pour l'identification de porteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes

La sérologie MAT est considérée comme la méthode de référence pour le diagnostic de la leptospirose, lorsque le clinicien est en présence de symptômes évocateurs de la maladie. Cependant, plusieurs limites à cette méthode apparaissent dans notre étude ayant pour objectif la recherche de chiens porteurs et/ou excréteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes.

D'une part les titres vaccinaux sont difficilement distinguables avec certitude des titres induits par une exposition à la bactérie. La définition du seuil de positivité des titres, clé de l'interprétation des résultats, varie en effet considérablement selon les études en fonction du statut vaccinal de la population étudiée, du sérogroupe et de la pression d'infection dans la zone considérée. Aucun consensus n'a en effet été établi concernant les seuils à prendre en compte. Dans notre étude tous les chiens étaient vaccinés depuis moins d'un an, le seuil de positivité était fixé à 1/640 pour les titres vaccinaux, et à 1/160 pour les titres non vaccinaux. Dans l'étude de Stokes et al, le seuil de positivité est fixé à 1/3200 pour Canicola, 1/1600 pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae et 1/200 pour les sérogroupes non vaccinaux [101]. Le chien étant l'hôte principal du sérogroupe Canicola, il semble justifié de fixer un seuil de positivité supérieur à 1/640 pour le sérogroupe Canicola sous peine d'obtenir des résultats faussement en faveur d'une infection leptospirosique.

D'autre part les réactions croisées entre les sérovars, dues à une certaine communauté antigénique, constitue la deuxième difficulté inhérente au test sérologique MAT. Il est alors impossible de conclure quant au statut infectieux du chien et à la détermination du sérogroupe infectant sans avoir recours à d'autres tests, notamment à une cinétique sérologique.

L'analyse rétrospective de la prévalence des sérogroupes non vaccinaux permettrait d'orienter l'interprétation du test sérologique MAT. Par exemple le sérogroupe Autumnalis présenterait des réactions croisées connues à titres élevés avec les sérogroupes Grippotyphosa et Pomona [16]. L'absence de circulation des sérogroupes Panama et Bataviae est mentionnée dans les rapports établis par le laboratoire des leptospires entre 2007 et 2009 [116]. Enfin il est important de mentionner l'incidence croissante des souches du sérogroupe Australis et la prévalence non négligeable des sérogroupes Grippotyphosa et Autumnalis depuis trois ans [24, 43, 116].

Ainsi sans signes cliniques évocateurs, face à un individu présentant un profil sérologique MAT compatible avec une infection leptospirosique, il est difficile de conclure à un statut de

portage asymptomatique. Il peut s'agir d'un contact ancien, d'un portage asymptomatique ou d'une réaction croisée avec les sérogroupes vaccinaux. En outre une étude récente menée aux Etats-Unis a montré une grande variabilité entre les résultats MAT selon les laboratoires pour des chiens récemment vaccinés contre la leptospirose et pour des chiens ayant des signes cliniques évocateurs de leptospirose, rendant l'indentification du sérogroupe infectant par la MAT délicate voire impossible [73].

La méthode PCR semble mieux adaptée à la recherche de porteurs asymptomatiques de leptospires que la MAT. Elle permet en effet de mettre en évidence directement la présence de fragments de génome de leptospires dans le sang ou dans les urines, et de conclure à un statut de porteur et /ou excréteur asymptomatique. Toutefois cette méthode ne reflète ni l'intégrité ni la viabilité des leptospires excrétées.

La confrontation des résultats PCR avec ceux de la MAT présente un intérêt certain, illustré par les chiens n°13 et n°24.

CONCLUSION

La leptospirose est une zoonose mondialement répandue. Avec 500 000 cas humains par an répertoriés dans le monde, elle représente un enjeu de santé publique. L'excrétion de la bactérie dans les urines des animaux réservoirs est à l'origine de la contamination du milieu extérieur. L'environnement contaminé permet la transmission indirecte de la maladie aux hôtes accidentels et participe au cycle épidémiologique de la leptospirose. Les hôtes réservoirs n'expriment pas la maladie à la différence des hôtes accidentels qui représentent des espèces sensibles. Certains individus appartenant à des espèces sensibles sont néanmoins occasionnellement susceptibles d'héberger le pathogène sans exprimer de symptômes. Ainsi, l'existence d'un portage asymptomatique avec excrétion urinaire associée ou non à une séropositivité a été démontrée chez l'homme et chez le chien. Cet état semble faire suite à une forme subclinique de la maladie ou à une infection ancienne cliniquement exprimée malgré la mise en place d'un traitement antibiotique. L'excrétion urinaire de leptospires peut perdurer plusieurs années chez l'homme après guérison. Cette question reste peu étudiée chez le chien. Ces porteurs excréteurs asymptomatiques se comportent comme des réservoirs et pourraient représenter une source de contamination.

Le dépistage d'un état de portage asymptomatique repose idéalement sur la culture bactérienne, plus couramment sur la PCR éventuellement couplée à une sérologie. La technique sérologique de microagglutination est la méthode de référence actuellement utilisée pour le diagnostic de la leptospirose en médecine humaine et vétérinaire. Une séropositivité peut néanmoins refléter un contact ancien avec des leptospires. Chez le chien, le statut vaccinal doit également être pris en compte pour l'interprétation sérologique. La PCR met quant à elle directement en évidence le génome bactérien dans le sang ou les urines de l'individu suspect sans renseigner sur la viabilité du pathogène.

L'objectif de notre étude prospective était de déterminer le nombre d'individus présentant une PCR leptospirose positive sur sang et urine dans une population de 30 chiens apparemment sains et d'étudier leur profil sérologique. Seuls des chiens mâles ayant un mode de vie susceptible de favoriser des contacts avec des milieux potentiellement contaminés par accès à divers types de points d'eau ont été inclus. Tous étaient vaccinés. Une sérologie par technique de microagglutination et une PCR sur sang et urine ont été réalisées pour chaque animal. Onze chiens étaient séronégatifs, dix chiens avaient un profil sérologique vaccinal, neuf

chiens présentaient un profil compatible avec une infection leptospirosique dont trois en lien avec le sérogroupe Canicola et un avec le sérogroupe Grippotyphosa. Cinq présentaient des réactions à titres multiples. Ces résultats confirment qu'une séropositivité ne fait pas la preuve d'une infection cliniquement exprimée. Dans le contexte de notre étude, ils témoigneraient davantage d'un contact ancien avec l'agent pathogène, voire pour certains chiens de profils vaccinaux inhabituels que d'un réel portage asymptomatique. Deux chiens sur 30 présentaient une PCR positive sur sang non associée à une PCR positive sur urine au moment du prélèvement. L'un était séronégatif et l'autre avait un profil sérologique compatible avec la vaccination. Quatre chiens présentaient une PCR positive sur urine non associée à une PCR positive sur sang. Parmi eux deux étaient séropositifs, l'un au sérogroupe Grippotyphosa, l'autre présentait des titres multiples. Ces résultats traduiraient l'existence d'un nombre non négligeable de chiens porteurs et/ou excréteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes parmi une population ayant un mode de vie susceptible de favoriser une contamination. Toutefois la méthode PCR ne permet pas de préjuger de l'intégrité ni de la viabilité de la bactérie. Un taux de portage asymptomatique plus faible a été observé dans les études antérieures : une PCR positive sur urine a été mise en évidence chez 7,4% des chiens cliniquement sains dans l'étude de Harkin [48], 7% des chiens sains excrétaient des leptospires pathogènes dans leurs urines dans l'étude de Rojas [90].

De nouvelles techniques moléculaires actuellement disponibles pourraient permettre d'identifier les sérovars incriminés dans le portage asymptomatique afin de préciser l'épidémiologie de la maladie et d'en adapter les stratégies préventives.

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 25 MAI 2012
Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

Le Directeur général
VetAgro Sup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

BIBLIOGRAPHIE

(1) ABGUEGUEN P. et al. (2008) Clinical aspects and prognostics factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. J. Infect., 57, 171-178

(2) ADAMUS C. et al. (1997) Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. J. Comp. Pathol., 117 (4), 311-328

(3) ADIN C.A. et al. (2000) Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). J. Am. Vet. Med. Assoc., 216 (3), 371-375

(4) ADLER B., DE LA PENA MOCTEZUMA A. (2009) Leptospira and leptospirosis. Vet. Microbiol, 140, 287-296

(5) AHMED N. et al. (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 5:28.

(6) ALEXANDER AD. (1976) Immunity in Leptospirosis. In Johnson PC editor, The biology of parasitic spirochetes. New York : Academic Press, 339-349

(7) ANDRE FONTAINE G, J.GARNIERE (1992) Leptospirose canine. In : Encyclopédie Vétérinaire : Médecine générale et Technique (ed) Paris 1-7

(8) ANDRE FONTAINE G. et al. (2001) Leptospirose canine : actualités épidémiologiques. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., 36, 565-5707

(9) ANDRE FONTAINE G. (2006), Canine leptospirosis do we have a problem? , Veterinary microbiology 117, 19-24.

(10) ANDRE FONTAINE G. et al. (2007) Update on epidemiology and microbiological diagnosis of canine leptospirosis In : 17th ACVIM-CA Congress, Budapest.

(11) BAL AE. et al. (1994) Detection of leptospires in urines by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol., 32, 1894-1898

(12) BARBOSA AS. et al. (2006) A newly identified leptospira adhesion mediates attachment to laminin. Infect. Immun., 11, 6356-6364

(13) BARBOSA AS. et al. (2009) Immune evasion of Leptospira species by acquisition on human Complement regulator C4BP. Infect. Immun., 77, 1137-1143

(14) BARMETTLER R. (2011) Assessment of exposure to leptospira serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 238, (2), 183-188

(15) BAROCCHI MA. et al (2002) Rapid translocation of polarized MD-CK cells monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but non intracellulaire pathogen. Infect. Immun., 70, 6926-6932

(16) BARR S.C. et al. (2005) Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against Leptospira interrogans serovar pomona and Leptospira kischneri serovar grippotyphosa. Am. J. vet Res., 66, (10), 1780-1784

(17) BAUMANN D., FLÜCKIGER M. (2001) Radiographic findings in the thorax of dogs with leptospiral infection. Veterinary Radiology & Ultrasound, 42, (4), 305-307

(18) BERCHE P. Leptospires (1989) In : Bactériologie médicale, 2eme ed, Flammarion Médecine et Sciences, 49, 722-729

(19) BHARTI et al. (2003) Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance, Lancet Infect. Dis., 3, 757-771

(20) BIRNBAUM N. et al. (1998) Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs : serological and clinicopathological features. J. Small. Anim. Pract, 39, (5), 231-236

(21) BOLIN C.A. (1996) Diagnosis of leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. Semin.Vet. Med.Surg.,11 (3), 166-171
(22) BRANGER C. et al. (2005) Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiology Letters 243 437-445
(23) BROWN JA et al. (1991) Protein and antigen profiles of Prevalent Serovars of Leptopsira interrogans. Infect. Immun., 59 (5), 1772-1777
(24) BROWN C.A. et al (1996) Leptospira interrogans serovar grippotyphosa infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 209, (7), 1265-1267
(25) BROWN PD. et al. (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for the early diagnosis of leptospirosis. J. Med. Microbiol., 43, 110-114
(26) CAI CS, ZHU YZ, ZHONG Y, et al. (2010) Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of leptospira in China. BMC Microbiol.,10, 67.
(27) CHARON N. et al., (2002), Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria, The Spirochetes Annual Review of Genetics, 36: 47-73
(28) CHOY HA. et al. (2007) Physiological osmotic induction of Leptospira interrogans adhesion: LigA and LigB extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect. Immum., 75, 2441-2450
(29) CINCO et al. (1996) Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes, FEMS Microbiol. Lett. 138, 211-214
(30) CINCO M. (1981) Culture des leptospires, Med. Mal. Inf. 11, (2), 57-59
(31) CINCO M. et al (1983) Activation and Bactericidal activity of Complement by leptospires. Zbl Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.,254, 261-265
(32) COYNE M.J. et al. (2001) Duration of immunity in digs after vaccination or naturally acquired infection. Vet. Rec., 149, (17), 509-515
(33) CULLEN P. et al. (2002) Global analysis of outer membrane proteins from Leptospira interrigans serovar Lai. Infect. Immum., 70, 2311-2318
(34) DE ZOYSA J.R. (2004) Cardiac troponins and renal disease. Nephrol., 9, (2), 83-88
(35) FAINE S. et al. (1999) Leptospira and leptospirosis, Medici 2nd Edition, Melbourne, Australia.
(36) FORREST et al. (1998) Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis. Vet. Radio. Ultrasound 1998;39(4):337-340
(37) GANOZA C.A. et al (2010) Asymptomatic renal colonization of Humans in the Peruvian Amazon by Leptospira, PLoS Negl. Trop. Dis., 4, (2)
(38) GASCHEN F. (2008) Canine leptospirosis. Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association World Congress, Dublin, Ireland, August 20–24, 2008.
(39) GEISEN V., STENGEL C., BREM S. (2007) Canine leptospirosis infections- clinical signs and outcome with different suspected Leptopira serogroups (42 cases) J. of small anim. Pract., 48, 324-328
(40) GHNEIM G.S. (2007) Use a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. Vet. Res., 38 (1), 37-50
(41) GOLDSTEIN RE, Lin RC, LANGSTON CE, et al. (2006) Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs, J. Vet. Intern. Med., 20, 489–494.
(42) GREENE C.E. et al. (2006) Leptospirosis In : Infectious diseases of dog and cat, GREENE CE Editor, Third Edition 402-417

(43) GREENLEE J.J et al. (2005) Experimental canine leptospirosis caused by Leptospira interrogans serovars pomona and bratislava, Am. J. Vet. Res., 66, (10), 1816-1822
(44) HAAKE DA.et al. (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun., 68 (4), 2276-2285
(45) HANSON L.E. (1976) Pathogenesis of leptospirosis In : C.J. RUSSELL, The biology of parasitic spirochetes, 295-306
(46) HARKIN K.R. et al (1996) Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan : 17 cases (1990-1995). J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 32, 495-501
(47) HARKIN K. R. et al. (2003) Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 222, (9), 1224-1228
(48) HARKIN K.R. ROSHTO Y.M. et al. (2003) Comparaison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 222, (9), 1230-1233
(49) HARTMAN E.G. et al. (1984) Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG specific ELISA, Veterinary immunology and immunopathology, 7, 245-254
(50) HARTMANN K. et al. (2005) Diseases caused by systemic bacterial infections In : S.J.ETTINGER and E.C.FELDMAN, Textbook of veterinary internal medicine 6th edition, 616-618.
(51) HAZART.G.et al. (2010) La leptospirose canine en France : étude rétrospective de 37 cas. Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie, 45, 59-64
(52) HUGONNARD M. et al. (2011) Evaluation of polymerase chain reaction in the diagnosis of canine leptospirosis : comparison with serologic testing in 33 dogs. 21th ECVIM-CA Congress, 2011 September 8-10, Seville, Spain (oral presentation).
(53) HOUWERS D.J. (2010) Agglutinating antibodies against pathogenic Leptospira in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. Vet. Microbiol.,10.1016
(54) HOVIND-HOUGEN K. (1981) Morphologie des leptospires, Méd Mal Infect,11, 60-70
(55) INSTITUT PASTEUR : (page consultée le 10 août 2011). http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html
(56) JHA S et al. Leptospirosis presenting as acute meningoencephalitis. J Infect Dev Ctries. 2010 Mar 29;4 (3),179-82.
(57) JOHNSON R. C., FAINE S. (1984) Leptospira, In: KRIEG NR. et al., Bergey's manual of systematic bacteriology, 62-67
(58) KO AI, GOARANT C, PICARDEAU M. (2009) Leptospira: The dawn ofthe molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat. Rev. Microbiol., 7, 736–747.
(59) KOHN B. et al. (2010) Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis J. Vet. Intern. Med.,10, 1-6
(60) LANGSTON C.E., HEUTER K.J. (2003) Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. Vet. Clin. North Am. Small anim. Pract. 33, 791-807
(61) LEESET G.E. et al, (2005) Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal) al, J. Vet. Intern. Med., 19, 377–385
(62) LEFEBVRE R.B. (2004) Spiral curved organisms, Leptospira in D.C. HIRSH et al Veterinary microbiology Blackwell publishing, 148-152
(63) LEVETT P N (2001) Leptospirosis Clin Microbiol Rev, 14, (2), 296-326
(64) LEVETT PN et al. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J. Med. Microbiol., 54, 45-49

(65) MANTIS P. LAMB C.R. (2000) Most dogs with medullary rim sign on ultra sonography have no demonstrable renal dysfunction. Vet. Radiol. Ultrasound, 41, 164-166
(66) MARSHALL R.B. (1976) The route of entry of leptospires into the kidney tubule. J. Med. Microbiol. , 9, 149-152
(67) MARTIN L. et al. (1919) In : MASSON et al, Spirochètose ictérohémorragique
(68) MASTRORILLI et al. (2007) Clinicopathologic features ant outcome of Leptospira interrogans Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004), J. Vet. Med., 21, (1), 3-10
(69) MERIEN F. et al (1997) Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic Leptospira interrogans are correlated with virulence. Infect. Immum., 65, 729-738
(70) MERIEN F. et al (1998), In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with Leptospira interrogans serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol. Lett., 169, 95-102
(71) MIDENCE JN. et al. (2012) Effects of Recent Leptospira Vaccination on Whole Blood Real-Time PCR Testing in Healthy Client-Owned Dogs, J. Vet. Intern. Med., 26, 149–152
(72) MILLER MD. Et al. (2008) Sensitivity and specificity of the microscopic agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in dogs. J. Vet. Intern. Med., 22, 787 (abstract)
(73) MILLER MD. (2011) Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. J. Vet. Intern. Med., 25 (3), 426-432
(74) MILLER R.I et al. (2007) Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland Australian Veterinary Journal, 85, (1&2), 13-19
(75) MILLET AS. (1998) La leptospirose du chien. Prat Méd Chir Anim Comp., 33, 19-23
(76) MINKE J.M. et al (2009) Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by bi-valent inactivated leptospirosis vaccine Vet. Microbiol., 137, 137-145
(77) MOREY ER. et al. (2006) Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing, J. Clin. Microbiol.,10, (44), 3510-3516
(78) MURRAY GL. et al. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans. Infect. Immum., 77, 952-958
(79) NALLY JE. et al (2005) Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of Leptspira interrogans sérovar Copenhageni. Proteomics, 5, 144-152
(80) NASCIMENTO AL. et al (2004), Comparative genomics of two leptospira interrogans sérovars reveals novel insight into physiology and pathogenesis, J. Bacteriol., 186, (7), 2164-2172
(81) NELSON R.W. (2003) Disorders of endocrine pancreas In R.W. NELSON and C.G. COUTO, Small animal internal medicine, Third edition, 729-777
(82) ORTEGA-PACHECO A. et al. (2008) Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with leptospira species. Ann. NY Acad. Sci. ;1149:270–274.
(83) PAGES J.P. (2001) Leptospirose canine : actualités cliniques. Prat.Méd.Chir.anim.Com., 36, 573-579
(84) PALANIAPPAN R.U. et al. (2002) Cloning and molecular Charcterization of an immunogenic LigA protein of Leptospira interrrogans. InfectImmun, 70, 5924-5930
(85) PALANIAPPAN R.U. et al. (2007) Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis. Curr. Opin. Infect. Dis. Jun, 20 (3) 73-80

(86) PROBER L.G. et al. (2010) Effect of semen in urine specimens on urineprotein concentration determined by means of dipstick analysis, AJVR, 71 ,(3), 288-292
(87) QUE-GEWIRTH N.L. et al. (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipidA. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activate TLR2, J. Biol. Chem., 279, 25420-25429
(88) RAMADASS P et al. (1992) Genetic characterization of pathogenic leptospira species by DNA hybridation. Int. J. Syst. Bacterial., 42, 215-219
(89) RISTOW P. et al. (2009) Biofilm formation by pathogenic and saprophytic Leptospira. Microbiology, 154, 1309-1317
(90) ROJAS P. et al. (2010) Detection and qualification of leptospires in urine of dogs : a maintenance host for zoonotic disease leptospirosis. Eur. J. Clin .Microbiol. Infect. Dis, 29, 1305-1309
(91) ROMERO EC et al. (1998) Detection of Leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. J. Clin. Microbiol, 36, 1453-1455
(92) SCANZIANI E. et al. (1994) Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. J. of Small Animal Practice, 35, 257-260
(93) SCANZIANI E. et al. (2002) Serological survey of leptospiral infection in kenelled dogs in Italy. J. of Small Animal Practice, 43, 154-157
(94) SCHWARZ-LINEK U. et al (2004), The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. Mol. Microbiol., 52, (3), 631-641
(95) SCOCCHI D. Antimicrobial activity of two bactenecins against Spirochètes: L interrogans, L bifleca and Borrelia burgdorferi. Infect. Immun., 61, 3081-3083
(96) SEGERS R.P. et al. (1990) Molecular analysis a sphingomyelinase C gene from leptospira interrigans serovar hardjo. Infect. Immum., 57, 2177-2185
(97) SILVA EF. et al. (2008) Characterization of virulence of Leptospira isolates in hamster model. Vaccine, 29, (31), 3892-3896
(98) SLACK AT et al. (2006) Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subnit B encoding gene. BMC Microbiol., 6, 95-105
(99) SPOTTS WHITNEY E.A., AILES E. et al. (2009) Prevalence of and risk factors for serum antibodies against Leptospira serovars in US veterinarians J. Am. Vet. Med. Assoc., 234, (7), 938-944
(100) STOCKHAM S.L., SCOTT M.A. (2008), Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, second edition, Blackwell Publishing, 467
(101) STOKES J.E. et al. (2007) Prevalence of serum antibodies against six leptopira serovars in healthy dogs J. Am. Vet. Med. Assoc., 230, (11), 1657-1664
(102) SYKES J.E., HARTMANN K., LUNN K.F. et al. (2011) 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis : Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Prevention. J. Vet. Intern. Med., 25, 1-13
(103) THOMAS DD et al. (1990) In vitro association of Leptospires with host cells. Infect. Immun., 58, 581-585
(104) TOWNSEND W.M. et al. (2006) Leptospirosis and panuveitis in dog Veterinary Ophtalmology,9,(3), 169-173
(105) TRAP.D. (1993) L'épidémiologie des leptospirosis animals Méd.Mal.Infect 23, 504-506
(106) TURNER LH. et al. (1974) Spirochetes In COWAN ST., Bergey's manual of determinative bacteriology 190-191
(107) TURNER LH. (1976), Classification of spirochaetes in general and in the genus leptopsira in particular. In : RC. JOHNSON, The biology of parasitic spirochetes

(108) VAN DEN BROEK A.H.M, et al. (1991), A serological and bacteriological survey of leptopsiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. J. Small Anim. Pract., 32, 118-124

(109) VERMA A. et al (2006). LfhA, a novel Factor H-binding protein of Leptospira interrogans. Infect. Immun., 74, 2659-2666

(110) VERMA A. et al (2010) Leptospiral endostatin-like protein Len A is a bacterial cell-surface receptor for human plasminogen. Infect. Immun., in press.

(111) WARD M.P. et al (2002) Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. Prev. Vet. Med., 56, 203-213

(112) WARD M.P. et al. (2004) Evaluation of environmental risk ractors for leptospirosis among dogs: 36 cases (1997-2002). J. Am. Vet. Med. Assoc., 225, (1), 72-77

(113) WOHL JS.et al. (1996) Canine leptospirosis. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet., 18, 1215-1225.

(114) YANG C.W. et al. (2001) Leptospirosis renal disease. Nephrol. Dial. Transplant.,16, (5), 73-77

(115) YOUNES I. et al (1995) Inhibition of Na, K-ATPase by an endotoxin extracted from Leptospira interrogans : a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. C.R Arcad Csi II, 318, 619-625

(116) Rapports d'activité 2007, 2008, 2009 (page consultée le 10 janvier 2012) http://www.vetagro-sup.fr/labolepto

ANNEXES

Annexe 1 : Mailing d'appel aux volontaires

Mailing : *Appel à volontaires dans le cadre d'une thèse*

Bonjour à tous,

Dans le cadre de ma thèse encadrée par les Drs Hugonnard, Goy-Thollot et Kodjo, je réalise une étude prospective sur les tests permettant de détecter l'ADN de leptospires dans les urines de chiens. Les chiens sains asymptomatiques appartenant à des particuliers représentent une population jamais investiguée à ce jour.

Pour notre étude, j'aurais besoin d'effectuer deux prélèvements sur votre chien : une prise de sang et une récolte d'urine par miction naturelle. Le sang est indispensable pour réaliser une sérologie de contrôle. Les prélèvements auront lieu au SIAMU. Cela ne devrait pas prendre plus de 15 min de votre temps.

Des chiens de tout âge et de toute race peuvent participer à l'étude. La seule condition est qu'ils aient des contacts réguliers avec l'environnement (promenades dans la nature, baignades etc.). Le carnet de vaccination vous sera demandé. Les résultats vous seront communiqués.

Pour vous remercier un sac de croquettes vous sera offert.

La date est à définir et sera communiquée prochainement aux participants.

Si vous êtes partant pour m'aider, remplissez le sondage ci-après en indiquant votre nom, numéro de téléphone, et en cochant la classe d'âge de votre chien. Ce sondage sera clos dans 15 jours.

Nom du propriétaire et N° tel	Nom du chien	Age				Sexe		Contact fréquent près de points d'eau ?	
		< 1 an	Entre 1 et 4 ans	Entre 4 et 8 ans	>8ans	M	F	oui	non

Toute question relative au protocole peut être adressée par mail à mes encadrants de thèse.

Merci d'avance.

Annexe 2 : Formulaire d'accompagnement des prélèvements

FORMULAIRE D'ACCOMPAGNEMENT des PRELEVEMENTS pour le DEPISTAGE de LEPTOSPIROSE CANINE

Programme de recherche «Profil sérologique et recherche d'ADN de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de chiens apparemment sains, étude prospective sur 30 cas»

Isabelle Goy-Thollot pour le SIAMU (0680007615), Marine Hugonnard pour la Médecine (0685701390)

Version du 17 Mai 2011

Date des prélèvements :

Clinicien en charge de la supervision des prélèvements : **Validation : MH ou IGT (paraphe)**

Etiquette :

PRELEVEMENTS TRANSMIS

Tube sec : ☐

Tube sang EDTA : ☐

Tube sec urines ☐

MODALITES DE RECUEIL DES URINES :

Miction naturelle ☐

ANALYSE DES URINES :

BU :

DU :

- **Un des prélèvements n'a pas pu être réalisé**.....(en rouge et pour quelle raison)
- **TOUS les échantillons sont à acheminer au « labo leptospirose » bâtiment des Contagieux, 2è étage.**

Statut vaccinal

Vacciné : oui, non

Photocopie du carnet de vaccination indispensable ☐

Date dernier vaccin leptospirose (mois/année) :

Type de vaccin leptospirose :

Lieu de vie de l'Animal (habitation et zones de promenade)

Habitation principale : ville, campagne, zone périurbaine

Département :

Accès possible à un point d'eau : oui, non

Si oui, type de point d'eau : marais, étang, lac, bassin/abreuvoir, autre type d'eau stagnante, source, cours d'eau

Proximité de rongeurs sauvages : oui, non, ne sait pas

Proximité de vaches laitières : oui, non

FORMULAIRE D'ACCOMPAGNEMENT des PRELEVEMENTS pour le DEPISTAGE de LEPTOSPIROSE CANINE

Programme de recherche «Profil sérologique et recherche d'ADN de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de chiens apparemment sains, étude prospective sur 30 cas»

Isabelle Goy-Thollot pour le SIAMU (0680007615), Marine Hugonnard pour la Médecine (0685701390)

Version du 17 Mai 2011

Mode de vie de l'Animal

Milieu de vie principal : intérieur, extérieur, mixte

Congénères (chiens) : absence, 1 à 3 congénères, plus de 3 congénères

Activités principales (2 réponses maximum) : chien de troupeau, chien de travail, chien d'eau, chien de chasse, reproducteur, chien de compagnie

Baignade dans les 15 derniers jours : oui/non

Abreuvement ornières/points d'eau dans les 15 derniers jours : oui/non

Antécédents pathologiques

Insuffisance rénale chronique : oui/non

Autre :

Examen clinique

Météorologie : temps chaud et sec, temps chaud et humide, temps froid et sec, temps froid et humide, temps doux et sec, temps doux et humide

Température rectale :

Anomalies relevées :

Ces anomalies constituent-elles un critère d'exclusion ?

Recherche de un ou plusieurs des syndrome suivants : hyperthermie, urinaire, digestif, nerveux, oculaire

Symptômes : Pour chaque syndrome identifié, entourer l'ensemble des symptômes présent

- **[syndrome « hyperthermie »] :** abattement, tremblements, anorexie, déshydratation, douleurs musculo-squelettiques, cervicalgie, congestion muqueuses, pâleur muqueuses, ictère, pétéchies/ecchymoses, lésions cutanées, adénomégalie externe
- **[syndrome « urinaire »] :** polyuropolydipsie, oligurie/anurie, oedèmes périphériques, glucosurie, abattement, tremblements, anorexie, déshydratation, hypothermie, congestion muqueuses, pâleur muqueuses, pétéchies/ecchymoses
- **[syndrome « digestif »] :** vomissement, diarrhée, hématémèse, hémochésie, méléna, douleur abdominale, ictère, anorexie, amaigrissement, déshydratation, abattement, pétéchies/ecchymoses, épanchement abdominal
- **[syndrome « nerveux »] :** altération de la conscience, comas, convulsions, ataxie, parésie/paralysie
- **[syndrome « oculaire »] :** cécité, congestion, hémorragie chambre antérieur,, myosis, perte de transparence des milieux

Conclusion :

- ✓ **Absence de syndrome → chien « apparemment sain » → inclusion**
- ✓ **Présence >_ 1 syndrome → exclusion**

Annexe 3 : Critères épidémiologiques des animaux de l'étude

Num prélèvement	épidémiologie										
	âge lors du prélèvement	Race	Code race	Sexe	castration	habitat			congenères		
						ville	campagne	zone périurbaine	aucun	1 à 3	>3
1	3 Ans 11 mois	Manchester Terrier	P	M	0	0	1	0	0	1	0
2	3 Ans 0 mois	croisé braque	M	M	1	0	1	0	0	1	0
3	2 Ans 9 mois	Bouvier bernois	G	M	0	0	1	0	0	1	0
4	3 Ans 11 mois	Beagle	M	M	1	0	1	0	0	1	0
5	1 Ans 9 mois	Samoyède	M	M	0	0	1	0	0	1	0
6	1 Ans 9 mois	croisé berger australien	M	M	0	0	1	0	1	0	0
7	5 Ans 5 mois	croisé berger pyrénée	M	M	1	0	1	0	1	0	0
8	2 Ans 11 mois	Samoyède	M	M	0	0	1	0	0	1	0
9	2 Ans 9 mois	Golden retriever	G	M	1	0	1	0	0	1	0
10	0 Ans 9 mois	Border Collie	M	M	0	0	1	0	1	0	0
11	0 Ans 10 mois	Berger des pyrénés	M	M	0	0	1	0	1	0	0
12	1 Ans 11 mois	croisé beagle	M	M	1	0	1	0	0	1	0
13	10 Ans 1 mois	Epagneul breton	M	M	1	0	1	0	1	0	0
14	0 Ans 8 mois	Golden retriever	G	M	0	0	1	0	1	0	0
15	0 Ans 11 mois	croisé labrador	G	M	0	0	1	0	1	0	0
16	1 Ans 6 mois	berger australien	M	M	1	0	1	0	0	1	0
17	1 Ans 3 mois	Colley	M	M	1	0	1	0	0	1	0
18	0 Ans 8 mois	Labrador	G	M	0	0	1	0	1	0	0
19	2 Ans 4 mois	Bouvier de l'entlebuch	M	M	0	0	1	0	1	0	0
20	2 Ans 1 mois	Berger australien	M	M	0	0	1	0	0	1	0
21	2 Ans 10 mois	Border collie	M	M	0	0	1	0	0	0	1
22	1 Ans 3 mois	Labrador	G	M	0	0	1	0	0	1	0
23	14 Ans 9 mois	Flat coated retriever	G	M	1	0	1	0	1	0	0
24	0 Ans 10 mois	Border collie	M	M	1	0	1	0	0	1	0
25	10 Ans 7 mois	croisé fox	P	M	1	0	1	0	0	1	0
26	1 Ans 11 mois	Berger australien	M	M	0	0	1	0	0	0	1
27	1 Ans 3 mois	Border collie	M	M	1	0	1	0	0	1	0
28	3 Ans 6 mois	x beauceron	M	M	1	0	1	0	1	0	0
29	3 Ans 8 mois	croisé labrador	G	M	1	0	1	0	0	1	0
30	2 Ans 9 mois	berger australien	M	M	0	0	1	0	1	0	0

Prélève-ment	épidémiologie													vaccination					
	milieu de vie			accès point d'eau	type point d'eau fréquenté							baignade dans 15 dern jours	abreuvement dans 15 derniers jours	date vaccin	délai du dernier rappel de vaccination				type vaccin
					Eaux stagnantes					eaux courantes									
	intérieur	extérieur	mixte		marais	étang	lac	bassin/ abreuvoir	autre type d'eau stagnante	source	autre cours d'eau				moins 3 mois	3 à 6 mois	6 à 9 mois	9 à 12 mois	
1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	10/06/11	1				Eurican LR
2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	21/10/10			1		Eurican LR
3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	24/02/11		1			Eurican LR
4	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	01/10/10			1		Eurican LR
5	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	01/11/10			1		Eurican LR
6	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	01/03/11		1			Eurican LR
7	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	01/03/11		1			Enduracell LR
8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22/09/10				1	Eurican LR
9	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	26/01/11		1			Eurican LR
10	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	01/01/11		1			Eurican LR
11	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	03/12/10			1		Eurican LR
12	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	01/11/10			1		Eurican LR
13	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	10/06/11	1				Eurican LR
14	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	03/01/11		1			Eurican LR
15	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	29/10/10			1		Eurican LR
16	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	01/11/10			1		Eurican LR
17	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	24/07/10				1	Eurican LR
18	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	01/01/11		1			Eurican LR
19	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	10/06/11	1				Eurican LR
20	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	21/08/10				1	Eurican LR
21	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	22/09/10				1	Canigen L
22	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	01/07/10				1	Canigen L
23	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	01/11/10			1		Nobivac
24	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	01/12/10			1		Eurican LR
25	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	01/10/10			1		Eurican LR
26	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	01/01/11		1			Enduracell LR
27	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	27/05/11	1				Eurican LR
28	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	01/05/11	1				Eurican LR
29	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	01/10/10			1		Eurican LR
30	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	01/01/11		1			Eurican LR

Annexe 4 : Résultats des analyses urinaires des animaux de l'étude

analyse urinaire							
Num. du prélèvement	pH	DU	protéinurie	Glucosurie	hématurie	bilirubinurie	leucocyturie
1	5	1,024					
2	5	1,048					
3	5	1,048	1+				2+
4	8	1,048	1+				3+
5	5	1,058					
6	5	1,036	1+				
7	6	1,028					
8	6	1,042	1+		1+		3+
9	5	1,052	1+			2+	
10	5	1,032					
11	5	1,036					
12	5	1,04				1+	
13	5	1,012	1+		1+		3+
14	5	1,058	1+				
15	5	1,032	1+				
16	5	1,05	1+				
17	5	1,066	1+				
18	6	1,042	1+				1+
19	6	1,050	2+				3+
20	6	1,046	1+			2+	1+
21	7	1,064	2+			1+	2+
22	6	1,056	1+				
23	8	1,022	1+				
24	5	1,024	1+	1+			
25	5	1,016					
26	5	1,024	1+				
27	5	1,054					
28	5	1,044					
29	5	1,028					
30	6	1,038	1+				3+

Annexe 5 : Résultats des tests MAT et PCR des animaux de l'étude

	sérologie						PCR urine		PCR sang	
Num. du prélèvement	pas Ac : titres 0, 40 ou 80	statut vaccinal [160-640[	compatible avec infection			positivité simultanée ICT et CAN	nég	pos	nég	pos
			sérougroupes vacc ≥640	sérogroupes sauvages ≥160	plusieurs sérogroupes					
1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
4	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
5	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
6	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
7	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
8	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
9	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
10	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
11	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
12	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
13	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
14	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
16	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
17	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
18	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
19	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
20	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
21	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
22	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
23	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
24	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
25	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
26	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
27	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
28	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
29	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
30	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0

NENNIG Marie

Profil sérologique et recherche de leptospires pathogènes par méthode PCR sur sang et urine de chiens apparemment sains : étude prospective sur 30 cas.

Thèse Vétérinaire : Vetagro Sup campus Vétérinaire de Lyon, *2012*

RESUME : Le caractère zoonotique de la leptospirose et son éventuelle gravité clinique font de cette maladie un réel enjeu tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Actuellement, la question du portage asymptomatique chez le chien reste peu explorée. Par sa proximité de milieu de vie avec l'homme, le chien pourrait représenter une sentinelle épidémiologique de la maladie et un potentiel vecteur, à l'origine d'un risque de contamination pour l'homme. Le dépistage d'un état de portage asymptomatique repose idéalement sur la culture bactérienne, plus couramment sur la PCR éventuellement couplée à une sérologie. L'objectif de notre étude prospective était de déterminer le nombre d'individus présentant une PCR leptospirose positive sur sang et urine dans une population de 30 chiens apparemment sains et d'étudier leur profil sérologique. Deux chiens sur 30 présentaient une PCR positive sur sang non associée à une PCR positive sur urine au moment du prélèvement. L'un était séronégatif et l'autre avait un profil sérologique compatible avec la vaccination. Quatre chiens présentaient une PCR positive sur urine non associée à une PCR positive sur sang. Parmi eux deux étaient séropositifs, l'un au sérogroupe Grippotyphosa, l'autre présentait des titres multiples. Ces résultats traduiraient l'existence d'un nombre non négligeable de chiens porteurs et/ou excréteurs asymptomatiques de leptospires pathogènes parmi une population ayant un mode de vie susceptible de favoriser une contamination.

MOTS CLES :

- **LEPTOSPIROSE**
- **CHIEN**
- **PORTAGE ASYMPTOMATIQUE**
- **SEROLOGIE**
- **REACTION EN CHAINE DE LA POLYMERASE**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur PEYRAMOND
1er Assesseur :	Madame le Docteur HUGONNARD
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur KODJO
Membre invité :	Madame le Docteur GOY-THOLLOT

DATE DE SOUTENANCE : 6 Juillet 2012

ADRESSE DE L'AUTEUR : 108 rue de la Grange de l'Ile
74970 MARIGNIER