

# Leptospirose canine : méthode de diagnostic indirect mise en œuvre au laboratoire.

## Synthèse du panel de tests disponibles et recommandations pratiques

A. KODJO, DV, HDR, Professeur  
de Microbiologie  
Laboratoire des Leptospires  
Campus Vétérinaire  
VetAgro Sup  
1 avenue Bourgelat  
69280 Marcy-l'Etoile

### OBJECTIFS PÉDAGOGIQUES

Être capable de connaître :

- connaître le test de micro-agglutination microscopique ;
- connaître son interprétation ;
- faire la synthèse des méthodes afin d'adopter une démarche pertinente pour le diagnostic de la leptospirose clinique.

**Déclaration publique d'intérêts sous la responsabilité du ou des auteurs :** L'auteur travaille dans un laboratoire effectuant des tests de diagnostic de leptospirose.

### CRÉDITS DE FORMATION CONTINUE

La lecture de cet article ouvre droit à 0,05 CFC. La déclaration de lecture, individuelle et volontaire, est à effectuer auprès du CFCV (cf. sommaire).

Pour la leptospirose, le test de micro-agglutination microscopique ou MAT peut être effectué dès l'admission du patient ; l'identification du sérovar est possible bien que délicate. A l'issue de cette série consacrée à la leptospirose, des recommandations pratiques d'approche diagnostique sont proposées.

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale causée par un spirochète du genre *Leptospira*, famille des *Leptospiraceae*. Chez le Chien, cette maladie qui présente un taux de mortalité élevé est une cause fréquente d'urgence vétérinaire pour laquelle un diagnostic précis est nécessaire de manière à mettre en place l'antibiothérapie [1].

Quel que soit le test auquel on se réfère, son interprétation doit toujours s'inscrire dans le cadre de l'encours de l'infection et de son évolution. L'objet de cet article est de présenter la méthode de diagnostic indirect de référence mise en œuvre au laboratoire et de faire la synthèse de l'ensemble des méthodes actuellement disponibles pour le diagnostic de la leptospirose canine. □

Trois types d'approche directs ou indirects sont actuellement disponibles au laboratoire pour le diagnostic de la leptospirose. Ils sont diversement mis en œuvre en fonction d'objectifs particuliers qu'il convient de bien identifier.

Ainsi, la prescription de l'analyse peut être réalisée afin de répondre aux objectifs suivants :

- *diagnostic de l'infection* (prescription habituelle) ;
- *test rapide négatif* chez un animal à clinique évocatrice ;
- *demande de confirmation du diagnostic*, après un test rapide positif sur un chien récemment vacciné (tous les tests) ;
- *demande de typage du sérovar infectant*, après un test rapide positif ;
- *contrôle de guérison*, après traitement ;
- *détection de l'excrétion potentielle de leptospire par un animal*.

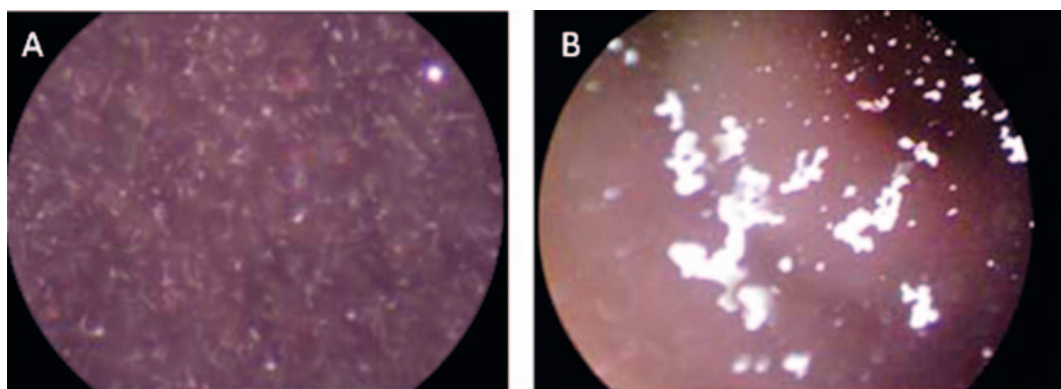
Après avoir abordé dans l'article précédent les méthodes du diagnostic direct, nous évoquons dans cet article la méthode de référence du diagnostic indirect mise en œuvre au laboratoire qui est le test de micro-agglutination microscopique ou MAT (*Micro-agglutination test*) en précisant son apport dans le panel des tests disponibles.

### Le test de micro-agglutination microscopique ou MAT

#### Principe

C'est la technique de référence qui détermine le titre sérique des anticorps antileptospires sans distinction entre IgM et IgG, en conséquence sans distinction entre anticorps d'origine vaccinale et anticorps postinfectieux.

La technique consiste à confronter différentes



**Photo 1 :** Test de microagglutination. A réaction négative ; B agglutination des leptospires.

dilutions de sérum du chien malade avec des cultures vivantes de différents sérovars leptospires puis à évaluer le degré d'agglutination au microscope à fond noir. Si le sérum contient des anticorps, ceux-ci provoquent une agglutination des leptospires.

La positivité réactionnelle est affirmée dès lors qu'au moins 50 % des leptospires présentes dans la réaction sont agglutinées (PHOTO 1).

Le matériel biologique à prélever est constitué par le sérum (le plasma, le sang hépariné ou sur EDTA ne sont pas recommandés).

Cet examen repose donc essentiellement sur la capacité de l'œil de l'expert à juger du niveau d'agglutination.

Il est donc réservé à des laboratoires spécialisés capables de manipuler des souches vivantes potentiellement virulentes et ayant l'expérience suffisante pour interpréter les résultats.

Pour un laboratoire de référence, la gamme est composée d'une vingtaine de souches, comprenant si possible des souches isolées localement et qui sont en général plus sensibles.

En France, un panel de 9 à 20 souches est utilisé en routine. Elles représentent les sérogroupes prépondérants au plan épidémiologique sur le territoire, plus des sérovars connus dans les pays limitrophes et qui pourraient être introduits en France, ces derniers étant inclus dans le panel pour des raisons de veille.

Tableau 1. Sensibilité comparée du test MAT et des tests IgM-rapides.

	% de sensibilité en phase aiguë (IC 95 %)	% Sensibilité en phase de convalescence (IC 95 %)	Spécificité (IC 95%)
MAT	48,7 (40,4 - 57,0)	93,8 (88,1 - 97,3)	97,3 (95,8 - 98,4)
IgM Tests rapides*	38,5 à 52,7 (30,6 - 61)	67,2 à 84,4 (58,3-90,2)	89,6 à 98,8 (86,9 - 99,5)

MAT = micro-agglutination microscopique

\*Données de plusieurs tests d'après [1] ; IC 95 % Intervalle de confiance à 95 %.

### Performance

Dans une étude comparative des tests utilisés en biologie clinique humaine, il a été montré par différents modèles statistiques, en particulier par l'analyse en classes latentes (qui permet de définir les cas indépendamment de la réponse du MAT, qui est le paramètre habituel de définition des cas), que si la sensibilité du MAT est globalement identique à celle des tests rapides en phase aiguë de la maladie, autour de 50 %, le MAT leur est nettement supérieur en phase de convalescence.

La spécificité de l'ensemble des tests – vis-à-vis de la leptospirose et non de l'identification des sérovars infectants – est tout à fait superposable (TABLEAU 1). Si ces données ne sont pas *in extenso* extrapolables à l'animal, elles donnent néanmoins une indication appréciable quant à leurs performances intrinsèques.

### Mise en œuvre et interprétation

En routine, l'analyse des sérums de chiens souffrant de leptospirose clinique est testée à partir d'une dilution initiale au 1/100<sup>e</sup>.

L'approche est différente lorsqu'il s'agit de titrer les anticorps postvaccinaux, la dilution initiale doit être bien moins importante car les titres postvaccinaux sont en général beaucoup plus faibles.

En effet, rarement supérieurs à 400, ceux-ci ne sont quasiment plus détectés au bout de 4-6 mois.

Cette observation a d'ailleurs longtemps conduit à considérer que le rythme des rappels de vaccination devait être de tous les 6 mois.

En réalité, il est démontré que des chiens correctement vaccinés résistent parfaitement à des épreuves virulentes avec de fortes concentrations de leptospires pathogènes, et ceci jusqu'à 12 voire

Références à rappeler [REDACTED] Le 3/12/2016

Votre référence: [REDACTED] Espèce: Chien

N°	Sujet	IH	COP		MUN	AUS	BRAT	AKI	BIM	BAL	BAT	CAN	GRIP	VAN	PAN	MAN	POM	PYR	MOZ	SJ	HJ	SAX
		WOLF	TAR	JAV																		
[REDACTED]	Dja 1	400	200	0	400	800	0	200	0	0	0	400	800	200	0	0	0	400	100	0	0	0
[REDACTED]	Dja 2	200	200	200	800	1600	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Figure 1 : Résultats sérologie (MAT) Leptospirose.** Exemple de résultat sérologique obtenu chez un chien symptomatique à l'admission, puis quelques semaines plus tard. Noter la fréquence des réactions croisées à la sérologie précoce -Dja 1-, celle-ci ne permet pas d'identifier clairement le sérotype infectant. Quelques semaines plus tard, le sérotype infectant peut être identifié sans équivoque, il s'agit d'un membre du sérotype Australis, il reste toutefois délicat de se prononcer quant au sérovar infectant car l'écart entre le sérovar Australis (Aus) et le sérovar Bratislava (Brat) n'est que d'une dilution. Au moment des symptômes, ce chien était vacciné depuis 2 mois avec le vaccin traditionnel combinant la valence Icterohaemorrhagiae et Canicola qui ressortent ici. Les positivités initiales observées pour les sérovats Bim, Griptophosa (Grip), Vanderhoedoni (Van), Pyrogenes (Pyr) et Mozdok (Moz) doivent dans ce cas particulier être considérées comme des réactions croisées aspécifiques.

14 mois après la vaccination alors que les anticorps ne sont déjà plus détectables 6 mois après celle-ci [2].

Ce test de référence détecte tout à la fois les IgG et IgM, c'est pourquoi il peut

être mis en œuvre dès l'admission pour confirmer l'étiologie leptospirosique.

Revers de la médaille, il est sujet à de très nombreuses réactions croisées entre différents sérovats, voire sérotypes, et

dans bon nombre de situations, il sera difficile d'identifier le véritable sérovar infectant, notamment au moment où le pic en IgM est à son maximum, d'où la complexité notoire de l'interprétation des réactions obtenues chez les animaux vaccinés et présentant des symptômes évocateurs de leptospirose (voir un exemple en FIGURE 1).

Compte tenu de cette complexité, un arbre décisionnel a été proposé par André-Fontaine sur la base d'une expérience de laboratoire cumulée de quelques décennies à l'école vétérinaire d'Oniris [3].

A la faveur de quelques ajustements, cet arbre décisionnel est utilisé en routine au Laboratoire des Leptospires de VetAgro Sup (TABLEAU 2).

Il faut noter que si son principe général est partout valable, les seuils proposés dans ce schéma doivent être ajustés pour chaque structure, car d'un laboratoire à un autre, voire d'un opérateur à un autre, les variations peuvent être considérables.

Ainsi, et à juste titre, le consensus européen sur la leptospirose ne propose pas de titres décisionnels seuils, optant plutôt pour une cinétique à systématiser [4].

Cette cinétique qui est bien sûr l'idéal, est malheureusement peu réalisée car la majorité des propriétaires sont habituellement réticents à la faire pratiquer pour des raisons de coût.

Tableau 2. Arbre décisionnel dans le diagnostic de la leptospirose par le test MAT (Adapté de [3])

Délai depuis la vaccination	Titre MAT (Sérovats vaccinaux)	MAT titre (Sérovats non vaccinaux)	Délai depuis l'apparition des symptômes (jours)	Conclusion
< 6 mois	> 400	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Confirmation
		< 100	< 10	Probable
	≤ 400	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Probable
		< 100	< 10	Non retenue
> 6 mois	≥ 400	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Confirmation
		< 100	< 10	Probable
	< 400	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Probable
		< 100	< 10	Non retenue
Non vacciné	≥ 100	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Confirmation
		< 100	< 10	Probable
	< 100	≥ 100	< 10	Confirmation
			> 10	Confirmation
		< 100	< 10	Non retenue

■ Leptospirose confirmée ■ Leptospirose probable (solliciter une cinétique) ■ Leptospirose non retenue

Tableau 3. Guide d'utilisation des tests rapides et conventionnels pour le diagnostic biologique de la leptospirose canine.

	Tests rapides (sang, plasma, sérum)		PCR (sang EDTA, Urines)	MAT (sérum)
Animaux vaccinés depuis moins de 2 mois	Test IgM (Witness® / Kitvia®) Test IgM-IgG (Snap Lepto®)	Ils sont utilisables mais attention aux nombreuses interférences avec les IgM d'origine vaccinale		Faire une PCR (Urines et sang) couplée au MAT*
Animaux vaccinés depuis moins de 6 mois	Test IgM (Witness® / Kitvia®)	Test positif	Leptospirose confirmée	Faire si possible un test à la guérison pour typer le sérovar
		Test négatif	Tests complémentaires requis	Faire une PCR (urines et sang) couplé au MAT
	Test IgM-IgG (Snap Lepto®)	Test positif	possibilité de leptospirose ; à confirmer par le MAT	Faire si possible un test à la guérison pour typer le sérovar
		Test négatif	Tests complémentaires requis	Faire une PCR (urines et sang) couplé au MAT
Animaux non vaccinés ou vaccinés depuis plus de 6 mois	Test IgM (Witness® / Kitvia®)	Test positif	Leptospirose confirmée	Faire si possible un test à la guérison pour typer le sérovar
		Test négatif	Tests complémentaires requis	Faire une PCR (urines et sang) couplé au MAT
	Test IgM-IgG (Snap Lepto®)	Test positif	Leptospirose confirmée	Faire si possible un test à la guérison pour typer le sérovar
		Test négatif	Tests complémentaires requis	Faire une PCR (urines et sang) couplé au MAT
Cadavre			Faire une PCR sur rein et ou foie (avorton, privilégier la rate)	Possibilité de faire le test sur le sérum cardiaque

\* L'analyse couplée MAT et PCR devrait être la règle, car la plupart des laboratoires proposent des "packs diagnostic Leptospirose" à un coût acceptable pour le propriétaire. A titre informatif, consulter le site <http://www.vetagro-sup.fr/wp-content/uploads/2016/11/Grille-tarifaire-globale.pdf>.

Cet arbre décisionnel permettra donc au clinicien de pouvoir exploiter l'unique sérologie à sa disposition.

Par ailleurs, la définition du sérotype ou du sérovar infectant est souvent sujet à controverse aussi, pour proposer un schéma simple, dans un profil sérologique avec de multiples réactions croisées, il est communément admis que le sérotype infectant est celui dont le titre est le plus élevé.

En pratique, chez l'animal vacciné, ces schémas et algorithmes simples doivent être amendés en considérant les titres postvaccinaux résiduels, eux-mêmes liés à la proximité de la vaccination, l'interprétation n'étant possible par l'expert du laboratoire que si l'échantillon est accompagné de commémoratifs suffisants.

Ceux-ci doivent préciser au minimum la date d'apparition et la durée des symptômes, la date de vaccination, le type de vaccination (rappel ou primovaccination), la nature du vaccin (vaccin à 2 valences, 3 valences ou 4 valences L2, L3 ou L4), la date présumée du contact

infectant si celui-ci peut être deviné. En cas de doute, seule une cinétique pourra préciser la réalité de l'infection et le sérotype incriminé.

## Recommandations pratiques

Au terme de cette revue actualisée, le praticien dispose d'un panel d'outils diagnostiques dont certains peuvent être mis en œuvre au cabinet.

Le principal avantage de ces tests est de pouvoir disposer d'une réponse rapide permettant de mettre en route le traitement étiologique.

Si ces systèmes miniaturisés offrent pour la plupart une excellente spécificité, leur niveau de sensibilité qui est moyen, implique qu'ils soient parfois associés aux méthodes conventionnelles de diagnostic applicables au laboratoire.

La grille proposée au TABLEAU 3 pourra guider le praticien dans sa démarche. □

### MÉMO

■ Le diagnostic indirect des maladies infectieuses peut faire appel à de nombreuses techniques (ELISA-Immunofluorescence etc.). Cependant, en ce qui concerne la leptospirose, le test historique de microagglutination microscopique ou MAT reste encore aujourd'hui la référence, notamment du fait de sa capacité à typer les sérovats infectants. Mise en œuvre par des laboratoires spécialisés, leur utilisation doit impérativement être accompagnée d'une interprétation en raison de la fréquence des réactions croisées.

### >>À LIRE...

1. Bajani MD et coll. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 803-9.
2. Minke J et coll. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol.* 2009 ; 137 : 137-45.
3. Andre-Fontaine G. Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs : disease and vaccination effects on the serological results. *Vet Rec.* 2013 ; doi : 10.1136/vr.101333.
4. Schuller S et coll. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 2016 ; 56 : 159-79.