

Leptospirose canine :

méthodes de diagnostic direct mises en œuvre au laboratoire

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 :

- l'isolement du germe et la détection moléculaire des leptospires ;
- leur interprétation.

**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).

L'isolement du germe qui est la méthode traditionnelle du diagnostic direct est actuellement remplacé par la PCR qui détecte l'ADN de l'agent causal sans en préciser le sérovar.

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale causée par un spirochète du genre *Leptospira*, famille des *Leptospiraceae*. Chez le Chien, cette infection, 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 l'examen diagnostique 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 les méthodes de diagnostic direct mises en œuvre au laboratoire. □

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*.

Les méthodes de diagnostic direct sont soit l'isolement du spirochète directement à partir

de prélèvements biologiques, soit le diagnostic par méthode moléculaire.

Isolement du germe

Cette méthode, qui est historiquement la méthode traditionnelle, peut se réaliser à partir de divers prélèvements effectués dans des conditions d'asepsie irréprochables.

Du vivant de l'animal, les prélèvements à effectuer sont représentés par le sang sur tube hépariné (15-20 UI d'héparine), les urines (si possible prélevées par cystocentèse et si la situation l'autorise, le liquide céphalorachidien) ; les quantités requises sont d'au moins 0,5 mL pour chacun des liquides biologiques mentionnés.

En *post-mortem*, on privilégiera la recherche à partir du rein ou du foie, les prélèvements seront alors réalisés de manière la plus propre (la stérilité étant difficile à obtenir dans les conditions du cabinet), en récupérant si possible l'organe entier muni de sa capsule, ce qui

permettra de le préserver au mieux des contaminations environnementales.

Quel que soit le prélèvement réalisé, il convient de le faire acheminer rapidement au laboratoire, à température ambiante et en respectant les dispositions prévues pour le transport du matériel biologique potentiellement infectieux, c'est-à-dire en respectant le principe du triple emballage (FIGURE 1).

Au laboratoire, la mise en culture permet un diagnostic de certitude mais sa réalisation est très délicate. Elle s'effectue sur des milieux spécifiques très riches dont le plus connu est le milieu EMJH (Ellinghausen et McCullough, modifié par Johnson and Harris).

Compte tenu des possibilités fréquentes de contamination bactérienne, cette mise en culture, réalisée rapidement après le prélèvement, s'effectue en dilutions croissantes (1/10 ; 1/100 et 1/1 000 voire 1/10 000) et en double sur le milieu ci-dessus et le même contenant un inhibiteur de croissance des contaminants les plus fréquents (fluoro-uracil à 150 µg/mL ; néomycine à 5–25 mg/mL ; sulfathiazole à 50 mg/mL ou cycloheximide à 0,5 mg/mL) [2].

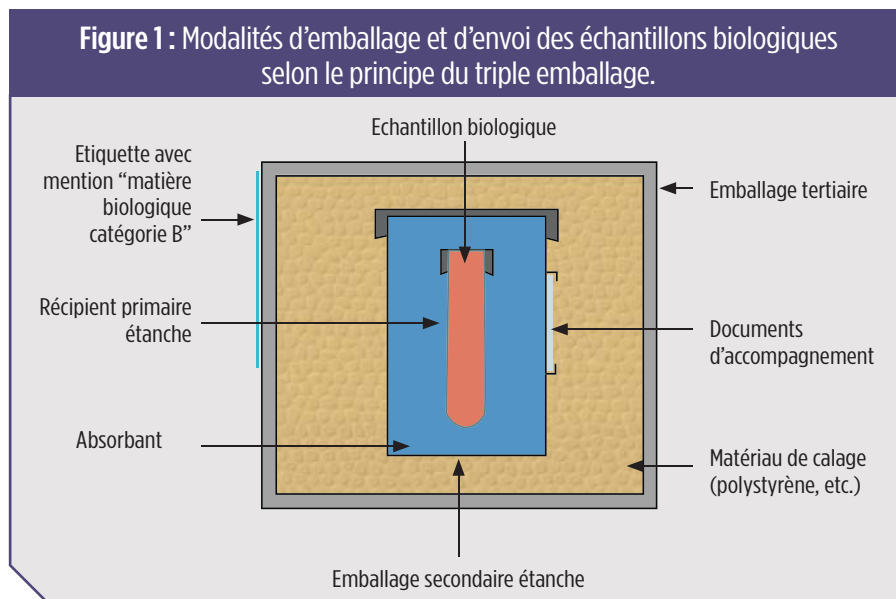
L'inhibition obtenue n'est jamais absolue ; ainsi, en cas de contamination dense, il ne sera quasiment pas possible d'obtenir de culture pure de leptospires, d'autant que celles-ci subissent aussi l'action des inhibiteurs. Même si celle-ci est limitée, elle impacte la croissance des leptospires au risque de la négativer.

En général, l'incubation des prélèvements se fait à 30 °C, à l'obscurité et en maintenant une agitation régulière pour faciliter la croissance, le métabolisme des leptospires étant aérobique.

Chaque semaine, ces prélèvements sont observés au microscope à fond noir et un repiquage systématique des tubes de culture primaire est recommandé après une incubation de quinze jours, le renouvellement des facteurs nutritifs étant un élément favorisant la croissance.

La culture nécessite, au minimum, une dizaine de jours, mais en général un mois est nécessaire pour visualiser correctement la croissance, et on ne peut conclure à la négativité de la culture qu'au bout de deux mois au minimum.

Ce temps très long est en relation avec le temps de doublement considérable des leptospires qui est de près de vingt heures soit 60 fois plus lent que celui



d'*Escherichia coli* qui n'est que de 20 minutes.

Ainsi, s'il faut 1 jour pour visualiser *in vitro* la croissance d'*E. coli*, il en faudra au moins 60 pour objectiver la présence de *Leptospira* pathogène. Certaines procédures vont jusqu'à recommander trois mois avant de déclarer la négativité.

Finalement, même si la mise en culture donne un diagnostic de certitude qui permet d'identifier précisément la souche infectante, celui-ci est tardif, très complexe, très onéreux et peu compatible avec la nécessité de l'instauration rapide de l'antibiothérapie.

C'est pourquoi, en pratique cet examen est très peu demandé. Néanmoins, il reste incontournable lorsque l'on cherche à disposer des souches réellement circulantes dans un environnement géographique donné, avec pour objectif d'adapter les vaccins existants ou de préparer un autovaccin.

Dans cette hypothèse, il conviendra de définir avec le laboratoire chargé de faire l'isolement et de suivre les cultures, une stratégie de mise en culture directement au cabinet, au pied du malade, à l'image de ce qui se pratique pour les hémocultures. A défaut de procéder ainsi, les chances de succès seront extrêmement limitées.

En routine donc, cet isolement n'est pas la méthode de choix, d'autant qu'il existe une alternative moléculaire basée notamment sur l'amplification génique en chaîne ou PCR.

Détection moléculaire des leptospires

Cette méthode actuellement courante en médecine humaine remplace très avantageusement toutes les méthodes traditionnelles du diagnostic direct de la leptospirose, pour peu que l'échantillon biologique soit "pensé" en fonction de l'évolution pathogénique de l'infection (cf. *Questions de cours PratiqueVet de mars 2017*).

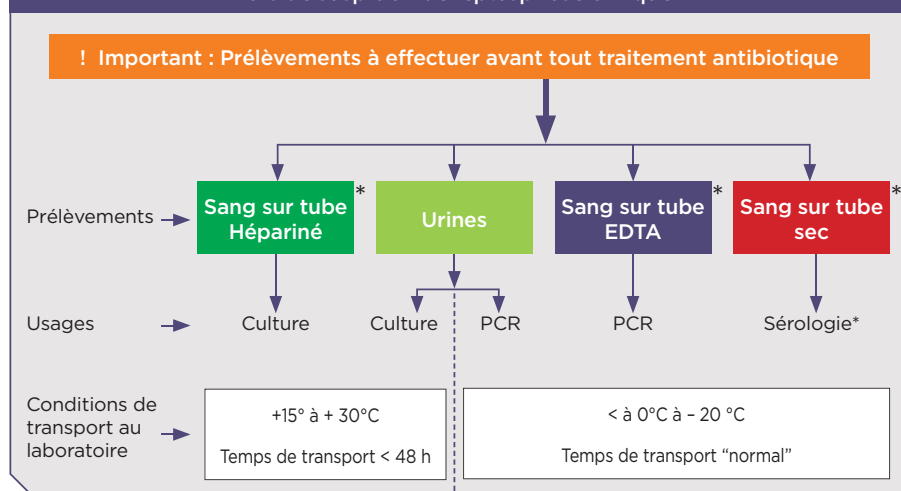
Les matrices sur lesquelles on effectuera la détection sont représentées par le sang prélevé sur EDTA ou par l'urine (FIGURE 2). Chez l'animal mort, la recherche est également possible à partir de divers tissus : habituellement reins, foie (plus la rate des avortons, le cas échéant).

Contrairement aux nécessités de la mise en culture, ici les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire idéalement sous congélation de manière à préserver l'ADN de la dégradation par diverses enzymes lytiques d'origine cadavérique ou bactérienne.

Il est théoriquement logique de réaliser la recherche à partir du sang chez l'animal à l'admission, mais il faut admettre qu'il est possible que la phase de leptospiémie soit terminée à ce moment-là, compte tenu du fait d'une translocation très précoce des leptospires du sang vers les organes, une fois la contamination intervenue.

Sauf à être devant une forme fulminante évidente, il est donc sage de demander une détection conjointe d'ADN de lep-

Figure 2 : Diagramme des prélèvements à effectuer et à acheminer au laboratoire lors de suspicion de leptospirose clinique.



* Ces matrices sont utilisables dans le cadre d'un diagnostic par test rapide au cabinet.

▶▶ leptospires pathogènes à partir du sang ET des urines.

Sachant que l'excrétion urinaire des leptospires ou leptospiurie est discontinuée, un pool d'urines prélevées à différents temps peut augmenter les chances de succès.

Bien que la leptospirose zoonose soit rare en cabinet [3], il est conseillé de se prémunir de toute contamination potentielle au moment de la réalisation de ces prélèvements, au minimum le port de gants devrait être la règle.

Selon les laboratoires vétérinaires de destination, diverses procédures d'extraction d'ADN et de PCR sont applicables.

Les techniques PCR appliquées peuvent être des techniques développées localement (cas le plus fréquent) ou des kits commerciaux permettant la détection des leptospires pathogènes.

Dans une récente publication, l'utilisation du kit "Taq Vet® Pathogenic Leptospira" a été appliquée avec succès par divers laboratoires vétérinaires départementaux pour la détection de leptospires à partir de plus de 3738 spécimens de reins collectés d'animaux sauvages [4].

Il n'existe pas vraiment de publication faisant état des performances comparées des diverses techniques utilisées dans les laboratoires vétérinaires.

Néanmoins, dans des tests interlaboratoires, réalisés annuellement entre le CNR (Centre National de Référence) des

leptospires de l'Institut Pasteur Paris, le CODA-CERVA (Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques) de Bruxelles, le Royal Tropical Institute (KIT) d'Amsterdam et le Laboratoire des leptospires de VetAgro Sup, les différentes méthodes de PCR utilisées par chacun de ces laboratoires se sont révélées équivalentes, tant en détectabilité qu'en sensibilité.

Ces données sont superposables à celles rapportées par la Haute Autorité de Santé dans son rapport d'évaluation de 2011 sur les tests utilisés pour le diagnostic biologique spécifique de la leptospirose humaine : de l'évaluation réalisée, il ressort que le test le plus performant est la PCR en temps réel, avec une sensibilité comprise entre 10 et 50 leptospires par mL de sang.

Le rapport ne fait pas état de la performance de ce test dans les urines, ce fluide étant rarement exploré en médecine humaine [5].

Les rapporteurs recommandent qu'elle soit réservée aux 8 premiers jours après l'apparition de la fièvre, et réalisée sur un échantillon de sang prélevé, de préférence avant la mise en œuvre de l'antibiothérapie.

Par ailleurs, compte tenu de la faible concentration habituelle des leptospires circulant dans le sang, il est recommandé que toute PCR négative soit associée à une exploration sérologique, ce qui permet de pallier un de ses inconvénients.

En effet, il faut prendre en considération que la mise en œuvre de cette méthode, si elle permet de confirmer l'infection, reste à l'heure actuelle limitée à la détection des leptospires pathogènes au sens large, la méthode ne permettant pas de déterminer la nature du sérovar infectant, paramètre indispensable à la connaissance de l'épidémiologie et incontournable à la mise à jour des vaccins. □

MÉMO

- Les méthodes de diagnostic direct de la leptospirose canine mises en œuvre au laboratoire s'inscrivent en complémentarité ou en alternative des tests rapides utilisables au cabinet.
- La détection moléculaire de l'agent causal est la méthode recommandée compte tenu de la durée requise pour l'isolement du germe. Intéressante pour sa rapidité, sa mise en œuvre ne permet pas de préciser le sérotype infectant.

>> À LIRE...

1. Major A et coll. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 ; 11 : 7242-60.
2. Miraglia F. EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. *Braz. J. Microbiol.* 2009 ; 40 : 189-93.
3. Bontemps M. La leptospirose humaine en exercice vétérinaire ; point actuel du Risqué. 2012 ; Thèse de doctorat vétérinaire, VetAgro Sup. Lyon.
4. Ayral F et coll. Hedgehogs and Mustelid Species : Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (2012-2015). *PLoS One*. 2016 ; doi : 10.1371/journal.pone.0162549.
5. Haute Autorité de Santé. 2011. Diagnostic biologique de la leptospirose. Rapport d'évaluation. Consultable sur : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-08/diagnostic_biological_de_la_leptospirose_-_rapport_devaluation_2011-08-05_12-35-31_268.pdf. Dernier accès le 23 février 2017.