

Leptospira

Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène

2014

Table des matières

1. Généralités.....	4
2. Caractères de la bactérie.....	4
2.1. Morphologie (Figure 1).....	4
2.1.1. MO à fond noir (X10 et X25).....	4
2.1.2. Pour améliorer sa visualisation.....	4
2.1.3. Mobilité.....	5
2.1.4. Modifications avec le vieillissement.....	5
2.1.5. Division.....	5
2.1.6. Colorations.....	5
2.2. Structure.....	5
2.2.1. Axostyle.....	5
2.2.2. Cylindre cytoplasmique.....	6
2.2.3. Membrane cytoplasmique.....	6
2.2.4. Enveloppe.....	6
2.3. Caractères cultureux.....	6
2.3.1. Milieux de cultures.....	6
2.3.2. Conditions de cultures.....	6
2.3.3. Croissance.....	7
2.3.4. Aspect des cultures.....	7
2.3.5. Cas des prélèvements contaminés.....	7
2.3.6. Cas des hémocultures.....	7
2.4. Résistance - Vitalité.....	7
2.4.1. Conservation des souches.....	7
2.5. Caractères biochimiques.....	8
2.5.1. Besoins nutritifs.....	8
2.6. Produits élaborés.....	8
2.7. Caractères antigéniques.....	8
3. Pouvoir pathogène.....	8
3.1. Pouvoir pathogène expérimental.....	8
3.1.1. Animaux sensibles.....	8
3.1.2. Tableau clinique.....	8
3.1.3. Autopsie.....	9
3.2. Pouvoir pathogène naturel.....	9
3.2.1. Signes fondamentaux.....	9
3.2.2. Signes facultatifs.....	9
3.2.3. Evolution.....	9
3.3. Physiopathologie.....	10
3.4. Immunité.....	10

3.5. Prophylaxie – Traitement.....	10
3.5.1. Prophylaxie.....	10
3.5.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	10
3.5.3. Traitement.....	11
3.6. Epidémiologie.....	11
3.6.1. Répartition géographique.....	11
3.6.2. Cycle épidémiologique (Figure 3).....	11
3.6.3. Mode de contamination.....	11
4. Diagnostic de laboratoire.....	12
4.1. Chronologie des examens en fonction de l'évolution.....	12
4.2. Diagnostic direct.....	12
4.2.1. Prélèvements.....	12
4.2.2. Culture.....	12
4.2.3. Amplification génique.....	12
4.3. Diagnostic indirect.....	12
4.3.1. Réaction macroscopique ou macro-agglutination sur lame.....	13
4.3.2. Méthode par ELISA.....	13
4.3.3. Réaction microscopique d'agglutination-lyse (MAT).....	13
Annexes.....	14

1. Généralités

La leptospirose est une **anthropozoonose** associée à une bactérie qui, émise par les urines d'animaux infectés, survit dans l'environnement (eaux douces). L'homme est un hôte accidentel contaminé soit par voie directe (contact avec un animal infecté) soit, le plus souvent, par voie indirecte (contact avec les eaux douces ou des sols souillés par des urines ou tissus d'animaux infectés). Certaines professions sont plus particulièrement exposées (**maladie professionnelle**). La première description de l'**ictère grave essentiel** due à une Leptospire a été faite par Lancereaux (1882).

Les Leptospires font partie :

- de l'ordre des *Spirochaetales*.
- de la famille des *Leptospiraceae*.
- du genre *Leptospira* (genre unique)

Le genre *Leptospira* comprend 2 taxons:

- *L. interrogans sensu lato* : regroupe les espèces pathogènes.
- *L. biflexa sensu lato* : regroupe les espèces saprophytes mais il existerait 7 espèces génomiques pathogènes par hybridation ADN/ADN qui sont pathogènes pour l'homme et les animaux; 3 espèces saprophytes ; 2 espèces à rôle inconnu.

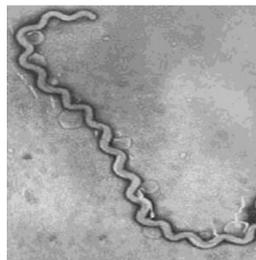
Les sérovars sont regroupés en sérogroupes en fonction des relations antigéniques entre les sérovars.

- *L. interrogans* comprend 23 sérogroupes avec 225 sérovars.
- *L. biflexa* comprend 28 sérogroupes avec 63 sérovars.
- il existe une étroite spécificité entre le tableau clinique, les sérotypes et les réservoirs animaux.

2. Caractères de la bactérie

2.1. Morphologie (Figure 1)

Figure 1 : Morphologie



2.1.1. MO à fond noir (X10 et X25)

Longueur 6 à 20 μm ; diamètre 0,1 μm .

Filament hélicoïdal, plus ou moins rigide, sans souplesse, 18 tours de spires ou plus, longueur d'onde de la spire: 0,5 μm ; pas de la vis à droite.

Corps à 2-3 ondulations lâches.

Extrémités effilées avec inflexions en crochets.

2.1.2. Pour améliorer sa visualisation

Il s'agit de pratiquer une centrifugation douce du sang traité par oxalate de sodium ou héparine: élimination des éléments cellulaires pour supprimer les interférences. Puis une centrifugation à vitesse élevée pour

concentrer les éléments restants qu'on examine.

Il y a une possibilité de faux positifs par présence de fibres ou éléments cellulaires.

Il faut réserver le microscope à fond noir pour les prélèvements riches en Leptospires (sang, liquide péritonéal et foie d'animaux infectés).

L'absence de Leptospires n'élimine pas le diagnostic. A confirmer obligatoirement par cultures ou tests sérologiques.

2.1.3. Mobilité

La mobilité est intermittente, assez rapide. **Les mouvements sont dus à l'axostyle.**

Il y a trois mouvements:

- flexion: disparaît en 1er sous antibiothérapie et avec des anticorps spécifiques.
- rotation, en vrille, très rapide.
- translation: déplacement dans le sens antéro-postérieur.

2.1.4. Modifications avec le vieillissement

Cela se manifeste par la présence de formes bouclées, déroulées, granulaires. Présence de granules spirochétogènes aux extrémités en signes de souffrance de la bactérie.

2.1.5. Division

La division se fait selon un **mode transversal**: épaissement de la zone médiane avec étirement filiforme.

Le rythme de division est très lent : 16 fois inférieur à celui d'une autre bactérie.

2.1.6. Colorations

Elles sont délicates, normalement à Gram négatif.

- par technique de **surcoloration**: Vago (mercurochrome + violet méthyl), Fontana-Tribondeau (**argent**).
- par **fluorescence** avec anticorps spécifiques.

2.2. Structure

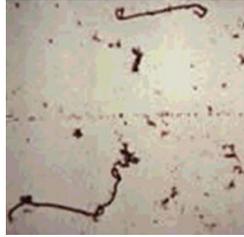
2.2.1. Axostyle

L'axostyle est :

- en dessous de l'enveloppe externe.
- en dehors et au contact du cylindre cytoplasmique qui s'enroule autour de lui.
- un double filament rectiligne avec une ligne de fission longitudinale.

L'axostyle est fixé par un système de boucles et disques à la membrane pariéto-cytoplasmique au niveau des extrémités; aspect en "crochets" (Figure 2).

Figure 2 : L'axostyle



2.2.2. Cylindre cytoplasmique

Sa disposition est hélicoïdale autour de l'axostyle. Il contient des ribosomes.

2.2.3. Membrane cytoplasmique

C'est une membrane à **3 feuillets** qui contient certains constituants des parois bactériennes (glucosamine, a. muramique).

Elle assure la rigidité et la résistance du cytoplasme.

Il existe des mésosomes.

2.2.4. Enveloppe

L'enveloppe gaine l'ensemble des structures. Elle est séparée du cylindre cytoplasmique par un espace contenant les filaments axiaux.

Elle possède **5 couches**: 3 couches denses séparées par 2 couches claires.

Les antigènes de type seraient dans cette enveloppe.

2.3. Caractères cultureux

2.3.1. Milieux de cultures

Il n'y a pas de croissance sur milieux ordinaires. La bactérie nécessite des milieux enrichis en :

- sérum de lapin : nature liquide (**Reiter et Ramme**; Stuart) ou semi-solide (Fletcher).
- albumine et acides gras (tween) (**Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris**) +++.

Il est nécessaire d'ensemencer au moins 5 tubes de chacun des 2 types de milieux pour diluer les inhibiteurs (surtout le sang).

Il est possible d'utiliser des flacons d'hémocultures type BacT/Alert MB (**mycobactéries, sans supplément d'enrichissement**) pour la détection des leptospires. Permet une bonne viabilité des leptospires sur 14 jours (temps moyen de détection : 3-4 J).

2.3.2. Conditions de cultures

Les milieux doivent avoir un **pH alcalin**: 7.2 - 7.6.

La température d'incubation de 10° à 30°C; **optimum à 28°C** (lyse rapide à 37°C).

Les milieux sont à placer à l'**obscurité et agités** si possible.

Il faut réaliser un **inoculum abondant** : 1/10 du milieu de culture: ensemencer 1 volume de sang ou urine

pour 10 ml de milieu de culture, puis diluer au dixième avec 5 tubes de milieu afin de diluer les inhibiteurs.

2.3.3. Croissance

- début de croissance au 2^e J; abondante au 3^e- 6^eJ jusqu'au 10^e J.
- croissance maximale au 6^e- 14^eJ.
- conservation des cultures jusqu'à la 4^e- 6^e semaine.
- lecture des cultures tous les 5-7J.

2.3.4. Aspect des cultures

Il y a **peu de modifications macroscopiques** des milieux :

- liquide: très léger trouble: faire les prélèvements de contrôle quelques centimètres en dessous de la surface.
- semi-solide: disque linéaire à 1-3 cm en dessous de la surface: faire les prélèvements de contrôle à ce niveau.

2.3.5. Cas des prélèvements contaminés

Il est nécessaire de mettre en culture le prélèvement sur un milieu contenant de la 5-fluoro-uracile (100 mg/l), néomycine (5-25 mg/l), cycloheximide (0,5 mg/l). Ces prélèvements contaminés doivent être filtrés avec des filtres entre 0,22 µm et 0,45 µm.

Afin d'enrichir le prélèvement en bactéries, il est possible de faire un passage sur animal : hamster ou cobaye jeune; inoculation du prélèvement en intra-péritonéal (0.5-1 ml); après 10-15 min prélèvement du sang au niveau du coeur qui est mis en culture.

La mise en culture des urines est réalisée sur milieux contenant du 5-fluoro-uracile (100 mg/l) ou par filtration des urines sur membranes (diamètre entre 0,22 et 0,45 µm). Nécessité de diluer 10 fois les urines.

2.3.6. Cas des hémocultures

Le prélèvement pour hémoculture ne doit être réalisé uniquement la 1^{ère} semaine de la maladie.

Il est possible d'observer une inhibition de la croissance en présence d'héparine, d'oxalate ou de citrate de sodium. Le broyage du caillot est recommandé avant de le mettre en culture.

2.4. Résistance - Vitalité

La vitalité de la bactérie est importante malgré son apparente fragilité.

Elle survit :

- dans le sol humide (280 J)
- les eaux de pH alcalin (7,7)
- à basse température (- 8°C)

Elle est détruite par :

- dessiccation (en 10 H)
- exposition à 41°C (en 8H), à 55°C (en 5 min)
- exposition à la lumière (en 2H)
- les antiseptiques, les acides dilués (suc gastrique)

2.4.1. Conservation des souches

La conservation se fait avec des milieux de Reiter et Ramme (20% de sérum à 29°C); repiquage 2-3 fois par

an, recouvrir de vaseline ; ou en milieu glycérolé (20%) puis congélation dans l'azote liquide.

2.5. Caractères biochimiques

Il n'est pas possible de distinguer les espèces à partir des caractères biochimiques.

2.5.1. Besoins nutritifs

La bactérie n'utilise pas le glucose et le glycérol.

Les sources de carbone principales sont: utilisation des acides gras à longues chaînes, saturés ou non, acétate, pyruvate.

Les facteurs de croissance: vitamines B1, B12, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺.

La bactérie a un métabolisme **aérobie** (absence de culture en l'absence d'oxygène). Elle possède une cytochrome oxydase et une catalase.

2.6. Produits élaborés

La bactérie produit une hémolysine (**sphingomyélinase**) active sur les hématies humaines et de lapin par certains sérotypes.

Certains sérotypes produisent aussi une **toxine cytopathogène**.

2.7. Caractères antigéniques

Les connaissances sont réduites sur ce sujet.

Elle possède 3 antigènes :

- **antigène H** (flagellaire), de nature protéique, ayant un rôle dans la réaction d'agglutination-lyse.
- **antigène O** (paroi), de nature polysidique, ayant un rôle dans l'immunité.
- **antigène d'enveloppe**, de nature inconnue, ayant un rôle dans la réaction d'agglutination-lyse.

La bactérie entraîne la formation d'anticorps homologues spécifiques pour chaque sérotype.

3. Pouvoir pathogène

3.1. Pouvoir pathogène expérimental

3.1.1. Animaux sensibles

Il s'agit préférentiellement du **cobaye** +++ vis-à-vis de *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *hebdomadis*.

Le rat, souris donnent des infections inapparentes.

Le **hamster jeune** est sensible vis-à-vis de *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *canicola*, *pomona*, *australis*.

Il est possible d'utiliser le jeune chien ou le jeune lapin.

3.1.2. Tableau clinique

Injection en intra-péritonéal de 1-2 ml du prélèvement (sang, urine) à au moins 3 cobayes.

- 4°-5° J: hyperthermie à 41°C, amaigrissement
- 6°-7° J: subictère, congestion des conjonctives, hémorragies puis généralisation de l'ictère.
- 9°-12° J: mort
- autres manifestations: maladie atténuée non mortelle nécessite un passage sur un 2° animal (sang, urine)

3.1.3. Autopsie

A l'autopsie, la coloration est ictérique, jaune safran, généralisée, au niveau des téguments et tissus :

- tâches hémorragiques diffuses
- augmentation de volume du foie et cortico-surrénales
- examen microscopique du sang puis mise en culture des reins.

3.2. Pouvoir pathogène naturel

Les 3 sérogroupes les plus fréquemment isolées en métropole sont *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* et *Australis*.

- **85% des leptospiroses sont anictériques.**
- Elle se manifeste chez l'homme par un syndrome général associant des signes fondamentaux communs et des signes facultatifs.

3.2.1. Signes fondamentaux

Les signes fondamentaux sont :

- **syndrome fébrile** : 40°C en plateau pendant 4 à 8 J.
- **syndrome douloureux** : myalgies, arthralgies, ostéoalgies.
- **syndrome méningé** constant, souvent infra-clinique avec réaction lymphocytaire (pléiocytose + protéinorachie)
- **hépto-néphrite**:
 - ictère intense ou subictère.
 - créatininémie élevée.
 - cytolysé hépatique.
 - albuminurie, cylindrurie, hématurie.
 - leucocyturie.
 - thrombocytopénie, polynucléose sanguine.
 - azotémie -----> mort.
- **syndrome vasomoteur** avec injection conjonctivale intense.

3.2.2. Signes facultatifs

- syndrome hémorragique avec *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*.
- phénomènes exanthématisés avec *L. grippotyphosa*.
- manifestations respiratoires avec *L. grippotyphosa*.

3.2.3. Evolution

- incubation entre 10-12 J (3 à 30 J)
- début brutal, aigu en 24-48 H
- 1^{er} cycle fébrile = stade septicémique

- guérison apparente: dure 2 à 5 J, apyrexie
- rechute fébrile sans nouveaux signes cliniques
- convalescence: asthénie importante et durable
- guérison sans séquelles

3.3. Physiopathologie

La maladie commence par une courte phase de **multiplication locale** au niveau de l'inoculation :

- infection générale par voie hématogène = hémoculture positive au début
- envahissement de tous les tissus: surrénales, foie, reins + localisations secondaires
- élimination ensuite par les urines.

Les mécanismes de virulence sont mal connus :

- les souches virulentes induisent l'apoptose des macrophages et des hépatocytes.
- il existe une activité hémolytique due à des sphingomyélinases (variable selon les sérovars).

Le rôle de ces facteurs n'est pas défini.

3.4. Immunité

Elle entraîne une **protection non totale** après la maladie ou la vaccination. Il existe une immunité spécifique de chaque sérotype.

La réponse immunitaire humaine est détectée dès le 8^{ème} jour chez l'homme. Ces anticorps sont **opsonisants** et mettent en jeu la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires. Les leptospires peuvent être lysées par le système anticorps/complément.

Les vaccins sont constitués de souches tuées.

- 2 injections en 15 J d'intervalle.
- Rappel à 6 mois, tous les 2 ans.
- Durée de l'immunité : 2 ans.

Il existe une allergie cutanée pour dépister les sujets sensibilisés avec la leptospirine.

3.5. Prophylaxie – Traitement

3.5.1. Prophylaxie

Les principales mesures à mettre en œuvre sont :

- lutte contre les rongeurs et animaux sauvages.
- une stérilisation des eaux stagnantes : éviter les baignades.
- une protection des sujets exposés par des bottes et des gants imperméables
- réaliser des enquêtes sérologiques dans les élevages.

Le choix du vaccin est selon la profession et la région : vaccin inactivé anti-*Icterohaemorrhagiae* en France.

Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire et une maladie professionnelle.

3.5.2. Sensibilité aux antibiotiques

La bactérie est sensible à tous les antibiotiques.

Plus particulièrement :

- **pénicilline G IV** (6 M/24h), ampicilline *per os* au début.
- **C3G**.
- **chloramphénicol**.
- **tétracyclines** (doxycycline) pour l'antibioprophylaxie (hebdomadaire).

3.5.3. Traitement

Le traitement est essentiellement symptomatique.

L'antibiothérapie n'est administrée que dans les formes sévères. Son efficacité est réduite si elle est tardive: à débiter précocément pour éviter l'apparition des lésions hépatiques et rénales (avant le 4^{ème} jour).

3.6. Epidémiologie

3.6.1. Répartition géographique

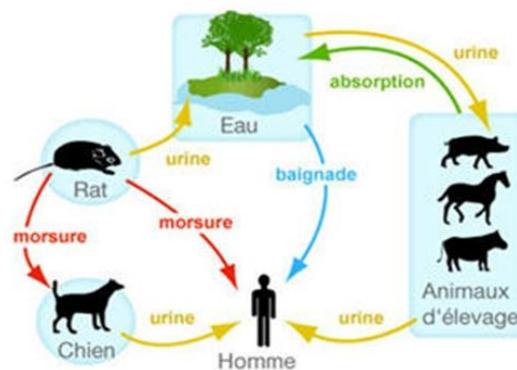
C'est une anthrozoonose: la maladie humaine est rare et accidentelle. La distribution des sérotypes dans les pays d'endémies comporte 5 à 7 sérotypes différents, toujours les mêmes dans un même pays (7 en France).

On dénombre environ **300 cas en métropole** par an. La fréquence est plus grande dans les DOM-TOM.

3.6.2. Cycle épidémiologique (Figure 3)

- 1e étape: infection inapparente surtout chez les rongeurs qui éliminent la bactérie toute leur vie.
- 2e étape: les **eaux de pH neutre ou alcalin**, de **température tiède** assurent la survie des leptospires.
- 3e étape: les victimes sont les animaux et accidentellement l'homme.

Figure 3 : Cycle épidémiologique



3.6.3. Mode de contamination

La contamination professionnelle concerne: égoutiers, équarisseurs, vétérinaires, agriculteurs, rizières.

Il existe une fréquence saisonnière avec les baignades :

- par **transmission indirecte** par immersion ou contact avec des eaux contaminées,
- **transmission directe** par contact avec des animaux infectants.

La pénétration est muqueuse par voie nasale, conjonctivale, digestive haute, transcutanée. Elle n'est jamais digestive en raison de l'acidité gastrique.

4. Diagnostic de laboratoire

4.1. Chronologie des examens en fonction de l'évolution

Il existe 3 phases :

- Phase septicémique: hémoculture et LCR jusqu'au 8ème jour.
- Phase immunitaire: débute au 6ème jour pour les IgM (non spécifique du sérotype en cause).
- Phase d'élimination des leptospires dans les urines du 15ème au 25ème jour en l'absence d'antibiothérapie.

4.2. Diagnostic direct

4.2.1. Prélèvements

Sang : recueil sur héparine ou EDTA (jamais de citrate).
examen en MO à fond noir (spécificité médiocre, nombreux pièges)
ensemencement sur milieux de cultures appropriés (cf Q.S.)
inoculation à l'animal avec prise de température.

LCR : idem.

Urines : en l'absence d'antibiothérapie.
ensemencement rapide car lyse des bactéries en moins de 6 h.
addition de 5 fluoro-uracile pour les urines contaminées.
inoculation à l'animal.

Pour l'amplification génique, les mêmes prélèvements peuvent être utilisés.

4.2.2. Culture

Il est possible de mettre les prélèvements en culture en utilisant des milieux spécifiques : Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH), incubé à environ 29°C.

Le temps de génération de ces bactéries étant long, l'incubation est poursuivie pendant 2 mois. L'identification des souches isolées est réalisée par le Centre National de Référence des Leptospires.

La détermination du sérotype se fait avec une batterie de sérums pour recherche d'une micro-agglutination (fonction du titre le plus élevé).

La recherche du sérovar est du domaine des laboratoires de référence (technique d'agglutination – adsorption).

4.2.3. Amplification génique

Diagnostic par PCR : amplification des gènes *rrs* (331 bp) spécifique du genre *Leptospira* associée à une hybridation, *lipL32*, *hap1*(animaux).

Le diagnostic d'espèce utilise les techniques de biologie moléculaire : sondes, MRSP (Mapped Restriction Site Polymorphisms), hybridation ADN/ADN

4.3. Diagnostic indirect

Positivité des réactions sérologiques à partir du 6ème jour.

4.3.1. Réaction macroscopique ou macro-agglutination sur lame

Elle n'est plus recommandée.

4.3.2. Méthode par ELISA

Elle se réalise avec l'antigène *L. biflexa* sérovar patoc. Son intérêt est de détecter les IgM (6^{ème} jour) et les IgG.

Le seuil fixé à 1/400.

Cependant, dans de nombreux cas de leptospirose dus aux sérogroupes *Grippityphosa* et *Australis*, les IgM ne sont pas ou mal détectées. Cette réaction se négative généralement dans un délai de 2 à 3 mois.

4.3.3. Réaction microscopique d'agglutination-lyse (MAT)

C'est la réaction de **Martin - Pettit**, Kolochine-Erber.

Ile met en jeu les propriétés lytiques et agglutinantes du sérum pour le sérotype utilisé: bactériolyse en présence de complément.

Sa lecture associe la présence de leptospires libres, la force d'agglutination, l'intensité de la lyse.

Le titre-seuil \geq à 100. ou augmentation par 4 du titre entre un sérum précoce et tardif.

La limite de la réaction se lit dans la dilution présentant moins de 50% de leptospires demeurées libres entre les agglutinats et non plus celle présentant une moindre différence avec la dilution supérieure.

-La réaction est positive dès le 8^{ème}-10^{ème} jour. On observe une décroissance des titres en 3-6 mois avec quelques fois des taux résiduels au-délà.

Il existe des faux :

- positifs : sujets guéris avec anticorps mais cinétique plate.
- négatifs:
 - prélèvement précoce
 - antibiothérapie précoce.
 - sérotype inhabituel
 - variations individuelles.

Annexes

Bibliographie

- **Cerqueira GM, Picardeau M.** : *A century of leptospirosis strain typing. Infect Genet Evol* 2009; 9:760-768.
- **Griffith, M. E., L. L. Horvath, W. V. Mika, J. S. Hawley, J. E. Moon, D. R. Hospenthal, and C. K. Murray.** : *Viability of Leptospira in BacT/Alert MB media. Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 54:263-266.2006.
- **Haute Autorité de Santé.** : *Diagnostic biologique de la leptospirose. Textes long et court. Juin 2011.*
- **Levett PN.** : *Leptospirosis. Clin Microbiol Rev* 2001; 14:296-326.
- **Picardeau M, Cornet M, Morel V, Sertour N, Chaumet D, Brachet E, Bourhy P.** : *Impact du changement de nomenclature médicale sur le diagnostic et la surveillance de la leptospirose en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 2008 ; 37:329-331.
- **REMIC.** : *Diagnostic biologique de la leptospirose. 4ème édition du Référentiel en Microbiologie de la Société Française de Microbiologie.*2010.
- **Thaidapunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, et al.** : *Diagnostic accuracy of real time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PloS One* 2011; 6:16236.