

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamedBougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master en biologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté et soutenue par :

RAMDANI Souad

MOUSSAOUI Asma

**Diagnostic et évaluation de la leptospirose
par la technique ELISA**

Mme BOUSSAK Hassina

Maître de conférences A FS-UMBB

Présidente

Mme AKROUM-AMROUCH Dahbia

Maître de conférences B FS-UMBB

Promotrice

Melle BELALIA Nawel

Maître de conférences B FS-UMBB

Examinatrice

2019/2020

DÉDICACE

Nous dédions ce modeste travail :

A nos chers, père et mère, qui sans eux rien n'aurait pu être fait,

A nos chers grands-parents,

A nos chers sœurs et frères,

A nos nièces et neveux,

A toute notre famille,

A toutes celles et ceux qui nous sont chers,

Et À tous ceux qui auront le plaisir de lire ce mémoire.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous remercions Dieu le tout Puissant de nous avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Mes sincères remerciements vont à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, ainsi que pour leur aide, leur compréhension, et leur soutien

Nous tenons à remercier particulièrement notre promotrice Mme AKROUM-AMROUCH Dahbia, Maître de Conférences à l'Université de Boumerdès UMBB, qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail, pour sa patience et ses précieux conseils et pour son accompagnement dans la réalisation de ce mémoire. Tous nos sincères respects.

Nous voudrions adresser nos vifs remerciements à M^{me} BOUSSAK Hassina, Maître de Conférences à l'Université de Boumerdès UMBB, pour avoir accepté d'être la présidente de notre jury de mémoire et à qui nous exprimons notre profond respect.

Nous remercions également grandement M^{elle} BELALIANawel, Maître de Conférences à l'Université de Boumerdès UMBB, d'avoir accepté d'examiner notre travail et à qui nous exprimons notre profonde gratitude.

Enfin merci à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

ملخص

داء البريميات هو مرض حيواني المصدر ينتشر في جميع أنحاء العالم ويزداد انتشاره . وهي عدوى تسببها اللولبية اللولبية *Leptospira*. يمكن الوصول إلى البشر إما عن طريق الاتصال المباشر مع الحيوانات المصابة أو بشكل غير مباشر عن طريق المنتجات الملوثة ببول الحيوانات المصابة والتي تنقل البكتيريا المسببة للأمراض *Leptospira* من خلال تآكل الجلد أو الأغشية المخاطية . معظم التهابات لا تظهر عليها أعراض ، لكن الأعراض تتراوح من مرض حمى خفيف غير محدد ذاتيًا إلى تفشي الفشل التنفسي والكولي مع ارتفاع معدل الوفيات . الطرق المصلية هي أكثر الوسائل المستخدمة على نطاق واسع لتأكيد تشخيص داء البريميات ، مثل "المعيار الذهبي" واختبار التراص المجهرية واختبار ELISA. العلاج النموذجي للأسباب الخفيفة هو الدوكسيسيسكلين الفموي ، على الرغم من أن الأزيثروميسين والبنسلين عن طريق الفم بدائل معقولة.

كلمات مفتاحية: الليبتوسبيروز ; مرض حيواني المنشأ ; اختبار التراص الدقيق , **MaT** ; اختبار الممتص المناعي المرتبط بالإنزيم , **ELISA**

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution and increasing prevalence. It is an infection caused by the *Leptospira* spirochete. Humans can be reached either by direct contact with infected animals or indirectly by products soiled by the urine of infected animals which transmit the pathogenic bacteria *Leptospira* through abrasions of the skin or mucous membranes. Most infections are asymptomatic, but symptoms range from mild, self-limiting, nonspecific febrile illness, to fulminating respiratory and renal failure with a high death rate. Serological methods are the most widely used means of confirming a diagnosis of leptospirosis, such as the "gold standard", a microscopic agglutination test and the ELISA test. The typical treatment for mild causes is oral doxycycline, although oral azithromycin and penicillins are reasonable alternatives.

Key-Words: Leptospirosis; zoonosis; microagglutination test, MaT; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA

Résumé

La leptospirose est une maladie zoonotique de distribution mondiale et de prévalence croissante. C'est une infection causée par le spirochète *Leptospira*. Les humains peuvent être atteints soit par contact direct avec des animaux infectés, soit indirectement par des produits souillés par l'urine d'animaux infectés qui transmettent les bactéries pathogènes *Leptospira* à travers des abrasions de la peau ou des muqueuses. La plupart des infections sont asymptomatiques, mais les symptômes vont d'une maladie fébrile légère, spontanément résolutive et non spécifique, à une insuffisance respiratoire et rénale fulminante avec un taux de mortalité élevé. Les méthodes sérologiques sont les moyens les plus largement utilisés pour confirmer un diagnostic de leptospirose, comme le "gold standard", le test d'agglutination microscopique et le test ELISA. Le traitement typique des causes bénignes est la doxycycline par voie orale, bien que l'azithromycine et les pénicillines par voie orale soient des alternatives raisonnables.

Mots clés : Leptospirose ; zoonose ; test de micro-agglutination, MaT ; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA

Sommaire

Dédicace

Remerciements

Résumé

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
CHAPITRE 1 : Etude bibliographique	
1. La leptospirose	3
2. Historique	3
3. Bactériologie	3
3.1. Classification	4
a-Classification sérologique.....	5
b- Classification génétique.....	5
3.2. Caractère morphologique.....	5
3.3. Architecture membranaire.....	6
3.4. Physiologie et caractère métabolique.....	8
4. Épidémiologie et répartition géographique.....	8
5. Agents responsables	11
6. Physiopathologie.	12
7. Représentation clinique chez quelques espèces domestiques.....	13
7.1. Chien.....	14
7-2. Chat.....	14
7.3. Cheval.....	14

7.4. Porc.....	14
8. Représentation clinique chez l’homme (symptômes).....	15
8.1. La phase septicémique	15
8.2. Complications sévères.....	16
9. Diagnostique biologique	18
9.1. Examens biologiques standards.....	18
9.2. Examens biologiques spécifiques	19
A. Microagglutination test(MaT).....	20
D. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	23
10. Traitement de la leptospirose	25
10.1. Traitement curatif	25
10.2. Traitement préventif.....	27

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes

1. Introduction.....	29
2. Préparation des réactifs.....	29
3. Prélèvement et préparation des échantillons.....	30
4. Dosage.....	30
5. Mesure.....	32
6. Critères de validation.....	32
7. Calcul des résultats.....	32

CHAPITRE 3 : Discussion

1. Introduction.....	33
2. Interprétation des résultats.....	33
3. Diagnostic de la leptospirose	33
4. L’étude des caractéristiques épidémiologiques.....	34
5. Evaluation du test MAT par rapport au test ELISA.....	35
Conclusion	36
Références	37

Liste des tableaux

Tableau 1	Principaux signes cliniques et leurs fréquences.	16
Tableau 2	Les anomalies biologiques dans le cas de leptospirose.	19
Tableau 3	Antibiotique recommandés pour le traitement curatif de la leptospirose	26

Liste des figures

Figure .1	Classification des leptospires adaptée de (Romich, 2008).	4
Figure .2	Vue en microscope à fond noir (A) et en microscope électronique (B et C) de leptospires ayant une longueur de 6 à 20 μm et un diamètre de 0,1 μm (Bourhy et <i>al.</i> , 2012)	6
Figure .3	Représentation schématique de l'architecture membranaire des leptospires pathogènes.(Fraga., 2011)	8
Figure .4	Histogramme de Répartition des malades par tranche d'âge (Lamrani A 2008)	10
Figure .5	Principaux sérogroupes étiologiques des cas de leptospiroses diagnostiqués à Tala-Athmane, Tizi-Ouzou.(Afiri et al.,2013)	10
Figure .6	Voix de transmission de leptospirose d'après (Ko ,2009)	13
Figure .7	Poumons d'un chien atteint d'hémorragie pulmonaire aigue diffuse sévère (Amélie,2012)	14
Figure .8	Les tests à effectuer en fonction du stade de la maladie (Mathieu Picardeau) (koai et <i>al.</i> ,2009)	20
Figure .9	Mesure du titre d'un anticorp (weill, 1998)	22
Figure .10	Recouvrement des puits par l'anticorps de recouvrement (Vézina and Lacroix, 2017)	24
Figure.11	Lecteur de densité optique (Vézina and Lacroix, 2017)	24
Figure .12	schéma explicatif de la technique Elisa (Vézina and Lacroix, 2017)	25

ABREVIATIONS

ELISA **IgM-Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay**

LCR liquide céphalorachidien

LigA Protéines exposées à la surface

LipL32 La principale protéine leptospirale

LPS Lipopolysaccharide

MAT Test d agglutination microscopique

OmpL1 Outer membrane lipoproteins

PCR Polymérase chaîne réaction

Introduction

La leptospirose est une maladie zoonotique de distribution mondiale et de prévalence croissante. C'est une infection causée par le spirochète *Leptospira* (Alison and Michael, 2016). Elle affecte 100 000 personnes par an dans le monde entraînant 1000 décès (Michot, et al 2007).

L'homme peut être atteint, soit par contact direct avec des animaux infectés, soit de façon indirecte à partir de produits souillés par les urines d'animaux infectés (Nardone *et al.*, 2004). La Transmission de la bactérie pathogène *Leptospira* survient par des abrasions cutanées ou des muqueuses (Hauk *et al.*, 2008 ; Chérif and Karaoui, 2015)

La plupart des infections sont asymptomatiques, mais les symptômes vont d'une maladie fébrile légère, spontanément résolutive et non spécifique, à une insuffisance respiratoire et rénale fulminante avec un taux de mortalité élevé. La suspicion clinique seule peut suffire à justifier un traitement antibiotique empirique dans de nombreux cas.

Une combinaison de symptômes non spécifiques et un manque de tests de diagnostic facilement disponibles ont fait de la leptospirose une maladie sous-diagnostiquée. Les méthodes sérologiques sont le moyen le plus utilisé pour confirmer un diagnostic de leptospirose, tel que le « gold standard » le test d'agglutination microscopique et le test ELISA. Le traitement typique des causes bénignes est la doxycycline orale, bien que l'azithromycine et les pénicillines orales soient des alternatives raisonnables (Alison and Michael, 2016).

C'est dans cette optique que le thème de ce mémoire a été proposé. Notre but de travail sera focalisé principalement sur :

- Le diagnostic de la leptospirose par la technique ELISA avec des bactéries traitées au formol et bouillies de l'espèce intermédiaire *Leptospira fainei* comme antigène pour détecter les anticorps spécifiques de *Leptospira* ;
- L'étude des caractéristiques épidémiologiques ;
- Les échantillons de sérum testés préalablement par un test d'agglutination microscopique (MAT) comme test de référence, ont été utilisés pour l'évaluation du test ELISA.

Ce présent travail est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre concerne une étude bibliographique renfermant des généralités sur :

1. La leptospirose, son origine et ses symptômes.
2. Le diagnostic précoce de leptospirose par ELISA et MAT.
3. L'efficacité de la technique ELISA.
4. Le traitement de la leptospirose.

Le second chapitre concerne l'expérimental où les différentes méthodes de prélèvement, de préparation et du dosage sont présentées.

Le dernier chapitre concernera donc la discussion des résultats rapportés dans la littérature par des auteurs qui travaillent sur ce domaine d'étude.

Enfin, on termine notre travail par une conclusion générale.

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique

1. La leptospirose

La leptospirose est une maladie bactérienne présente dans le monde entier, elle est causée par la *Leptospira interrogans* (Gram négative et aérobie stricte) dont il existe plusieurs sérovars qui affecte de nombreuses espèces. *Leptospira* vient du grec "leptos" (fin) et du grec "speira" (boucle), (Amélie, 2012).

La maladie est une zoonose de la faune sauvage dont ses principaux réservoirs sont les rongeurs, en particulier les rats, qui excrètent la bactérie dans leur urine. Chez l'homme, la maladie est souvent bénigne, mais peut conduire à l'insuffisance rénale, voire à la mort dans 5 à 10% des cas (Sheena and Waitkins, 1986).

2. Historique

Sur le plan clinique, les premières individualisations de la maladie datent des années 1880.

- En 1886, Adolf Weils en Allemagne et Mathieu en France complètent indépendamment la description du tableau clinique en entité pathologique.
 - En 1907, Stim Son observe des *Spirochètes interrogans* dans les reins d'un patient décédé par un ictère fébrile. (Paul and Levett, 2000; Houpikian et al. 2002; World Health Organization 2003).
- En 1915, deux auteurs japonais, Inada et Ido isolent *Spirochaeta ictero haemorrhagiae* et leurs anticorps spécifiques dans le sang de mineurs présentant un ictère infectieux et montrent le rôle du rat comme source d'infection humaine (Terpstra, 2006).
- En 1917, Nuguchi crée le terme *Leptospira* pour remplacer celui plus général de *Spirochaeta*. (World Health Organization, 2003; Houpikian et al., 2002; Paul and Levett, 2000).
- En 1918, Martin et Pettit démontrent la présence d'anticorps agglutinants dans le sérum des malades et décrivent la réaction d'agglutination lyse, elle est toujours une Méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la maladie.

3. Bactériologie

Les spirochètes incluent un grand nombre de bactéries d'importance médicale, causant différentes maladies dont les plus connues chez l'homme sont la syphilis (*Treponem pallidum*), la maladie de lyme (*Borrelia burgdorferi*), et la leptospirose (*Leptospira*). (Amélie, 2012).

3.1. Classification des leptospires

Le genre *Leptospira* comprend des organismes qui causent d'importantes maladies humaines (Yan, 2003 and Weil, 1986), et dont la taxonomie est comme suit :

Domaine ou empire :	Bacteria
Division ou phylum :	Spirochaetes
Classe :	Spirochaetes
Ordre :	<i>Spirochaetales</i>
Famille :	<i>Leptospiraceae</i>
Genre :	<i>Leptospira</i>

Ce genre est composé de bactéries aux différentes adaptations écologiques :

- Organismes vivant en liberté, par exemple *Spirochaeta* sp. et *Leptospira biflexa*;
- Genres dépendants de l'hôte, par exemple *Borrelia* sp. ;
- Des bactéries pathogènes capables de survivre à l'extérieur de l'hôte pendant de longues périodes ex. *Leptospira borgpeterseni*, *Brachyspira* sp. et *Leptospira interrogans*.

On distingue donc deux espèces (Figure I.1) :

- ✓ *Leptospira interrogans*, "espèce pathogène" pour l'Homme et l'animal. Elle comprend environ 200 sérovars.
- ✓ *Leptospira biflexa*, "espèce saprophyte libre", vivant dans les eaux profondes et rarement associée à des infections chez les mammifères. (Acha and Szyfres, 1989)

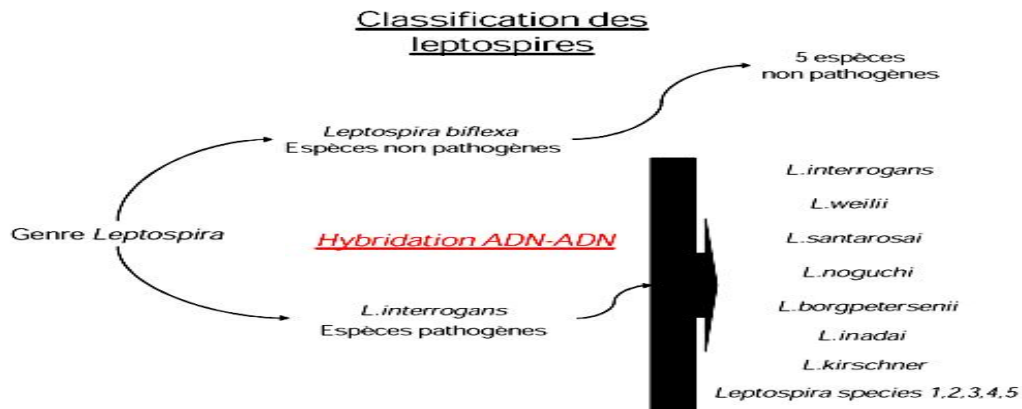


Figure 1. Classification des leptospires adaptée de (Romich, 2008)

a) La classification sérologique

La classification sérologique est basée sur l'agglutination des anticorps-antigènes qui se produit lorsqu'une culture de *Leptospira* est mise en contact avec un sérum spécifique. Cette méthodologie peut être considérée comme une fonction directe de la teneur en lipopolysaccharidesleptospiral (LPS) car c'est le composant majeur qui contribue à l'agglutination (Faine,etal.1999).

Cependant, il est important de noter que la classification sérologique, bien qu'utile, peut conduire à des résultats équivoques car le même sérovar peut être composé de leptospires appartenant à différentes espèces (Levett, 2001).

b) La classification génétique

La classification génétique est basée sur la similitude de l'ADN évaluée par hybridation (Yasuda et *al.*1987; Brenner, 1999). Elle tend à refléter les relations évolutives avec plus de précision. Cependant, la classification sérologique continue d'être utilisée car elle est très utile en milieu clinique (Bharti, 2003).

3.2. Caractères morphologiques

Les leptospires sont des spirochètes, de forme hélicoïdale, caractérisées par leur faible diamètre 0,1 µm pour 6-20 µm de longueur, le grand nombre est d'aspect très serré sous forme des spires, et la présence de deux endo-flagelles au centre de la cellule lui permettant une grande mobilité. On observe fréquemment la présence de «crochets» aux extrémités et une membrane extérieure, à triple feuillet, limite la cellule, tandis qu'une membrane cytoplasmique, également triple, entoure le cytoplasme.

En raison de leur faible diamètre cellulaire, les leptospires sont plus facilement visualisés au microscope fond noir ou en contraste de phase. Toutes les espèces de leptospires ont une morphologie semblable avec des différences mineures ne permettant pas de distinguer, morphologiquement, les espèces saprophytes des espèces pathogènes ou même les différentes souches pathogènes entre elles (Rais, 1997 ; Paul and Levett, 2000; Plank, 2000 ; Levillain, 2001; Houpikian et al. 2002; World Health Organization, 2003).

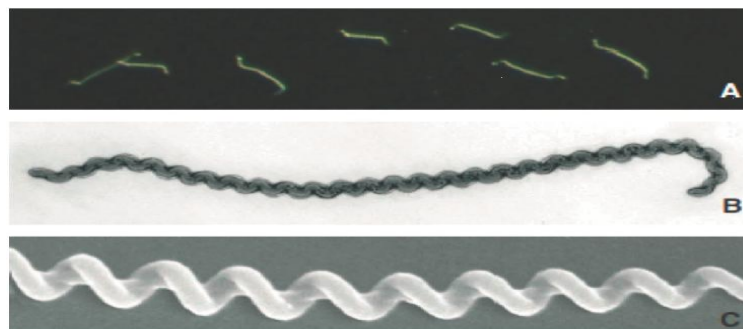


Figure 2. Vue en microscope à fond noir (A) et en microscope électronique (B et C) de leptospires ayant une longueur de 6 à 20µm et un diamètre de 0,1µm (Bourhy et al., 2012)

.3. Architecture membranaire de *Leptospira*

L'architecture à double membrane de *Leptospira* partage les caractéristiques des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Haake, 2000) :

- À l'instar des bactéries à Gram négatif, les leptospires sont colorés en rouge après la coloration de Gram et possèdent une membrane externe, une membrane cytoplasmique et une fine paroi cellulaire peptidoglycane (Faine, 1999).
- Comme c'est le cas chez les bactéries à Gram positif, la paroi cellulaire de peptidoglycane de *Leptospira* est plus étroitement associée à la membrane cytoplasmique qu'à la membrane externe (Haake, 2000 and Holt, 1978). Cette caractéristique rare conduit à une faible stabilité et une grande fluidité de la membrane externe leptospirale, qui est reliée de manière lâche au corps cellulaire et peut être facilement éliminée par lavage et manipulation de culture (Faine, 1999 and Raddi et al., 2012).

Récemment, une troisième couche de la membrane externe du leptospire a été décrite. Cette troisième couche apparaît comme une couche dense en tomographie cryoélectronique et

elle est plus prononcée chez les espèces pathogènes que chez les espèces saprophytes. Deux faits sont déjà connus au sujet de la troisième couche :

- Elle n'est pas uniquement composée de protéines, et
- Il semble que le LPS s'étend probablement de la membrane externe à la troisième couche, restant exposé à la surface bactérienne (Raddi et *al.*, 2012).

La membrane externe leptospirale est composée de phospholipides, de protéines de la membrane externe (Outer Membrane Protein : OMP) et de LPS (Cullen et *al.*, 2004). Le LPS est le composant majeur de la membrane externe de *Leptospira*. Sa présence contribue aux leptospiraux l'intégrité structurale puisque la chélation des cations divalents impliqués dans le pontage des molécules de LPS favorise une déstabilisation de la membrane externe (Haake and Matsunaga, 2002; Haake, 2010).

Bien que semblable à d'autres LPS à Gram négatif, le composant *lipide A* du LPS leptospiral a un *phosphate méthylé unique*, qui ne se trouve dans aucune autre bactérie (Adler, 2010; Que-Gewirth, 2000). Cette caractéristique inhabituelle semble être liée à la faible toxicité de LPS de *Leptospira*, qui est environ 12 fois moins toxique que LPS d'*Escherichia coli* (Faine et *al.*, 1999). Des données récentes de mutagenèse ont montré que le LPS est un facteur de virulence de *Leptospira*.

Les leptospires mutants qui ne produisent pas de molécules LPS ne parviennent pas à favoriser une infection réussie (Murray et *al.*, 2010). Il a également été démontré que la teneur en LPS, en particulier les niveaux de l'antigène O, est associée à la survenue d'une infection rénale aiguë (Nally et *al.*, 2005). De plus, les molécules de LPS sont plus abondantes et plus longues dans les *L. interrogans* pathogènes que dans les *L. biflexa* saprophytes, reflétant l'implication du LPS dans la virulence bactérienne (Raddi et *al.*, 2012).

Les protéines sont des composants importants de la membrane externe de *Leptospira*. Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions biologiques (Yan et *al.*, 2003 and Stimson 1907). On estime que les lipoprotéines-protéines attachées de manière covalente à un lipide et les protéines transmembranaires représentent jusqu'à 300 protéines différentes potentielles dans la membrane externe (Haake, 2010). Une analyse protéomique a montré que les protéines de la structure d'encapsulation externe sont les protéines les plus abondantes chez *L. interrogans* (Malmstrom et *al.*, 2009).

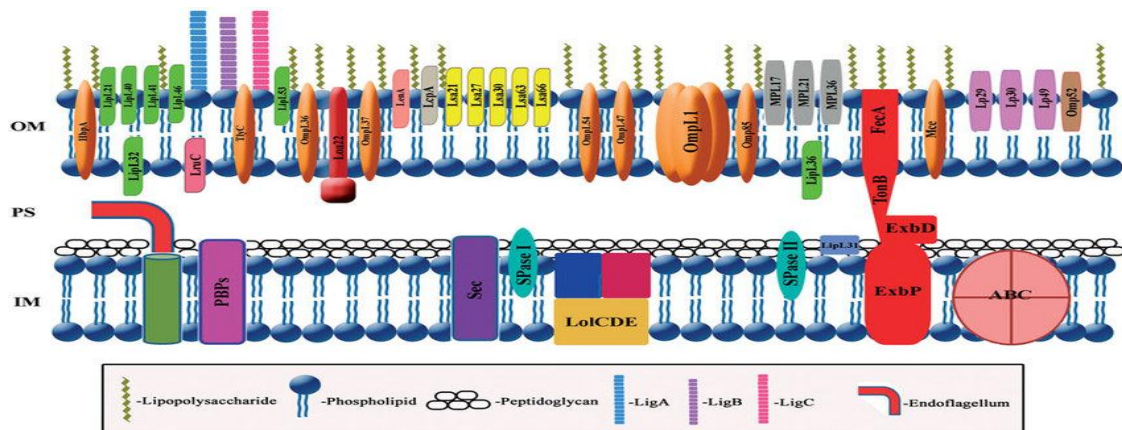


Figure 3. Représentation schématique de l'architecture membranaire des leptospires pathogènes (Fraga., 2011)

*La membrane interne (IM) est étroitement associée à la paroi cellulaire du peptidoglycane (PG), qui est recouverte par la membrane externe (OM). Les protéines exposées à la surface (LigA, LigB, LenA, LenB et Loa22), la protéine transmembranaire de la membrane externe, la porine L1 (OmpL1) et le lipopolysaccharide (LPS) sont parmi les principaux composants de la membrane externe. La principale protéine leptospirale, LipL32, est représentée comme une protéine souterraine. Pour simplifier, les systèmes récepteurs dépendants de TonB, l'appareil d'exportation de lipoprotéines leptospirales et l'endoflagelle sont omis. Figure adaptée de (Fraga, 2011).

3.4. Physiologie et caractères métaboliques

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes, avec une température optimale de croissance de 28 à 30°C. Ils produisent la catalase et l'oxydase, et se développent dans des milieux enrichis avec des vitamines (les vitamines B2 et B12 sont des facteurs de croissance), des acides gras à longue chaîne, et des sels d'ammonium. Les acides gras à longue chaîne (et non les glucides) sont utilisés comme source unique de carbone et sont métabolisés par β -oxydation (Houpikian et *al.*, 2002, Paul and Levett, 2000, Terpstra, 2006).

Le métabolisme original des leptospires oblige le bactériologiste à utiliser des milieux de culture complexes comme le milieu EMJH (Ellinghausen McCullough modifié par Johnson et Harris) qui est le plus utilisé pour l'isolement et l'entretien des souches de leptospires à une température d'incubation de 30 °C (Merien F and Berlioz-Arthaud, 2005).

4. Epidémiologie

L'étude de la fréquence des maladies et de la dynamique des états de santé dans une population humaine permet une meilleure compréhension et connaissance des maladies et d'améliorer les stratégies médicales, ainsi que l'évaluation de leurs applications dans le cadre d'activités cliniques.

La leptospirose est une maladie de répartition géographique mondiale et elle est endémique dans les régions tropicales à forte pluviosité avec un sol neutre ou alcalin (Asie, Inde,

Amériques Centrale et Latine). Il y a des serovars universels tels que *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* et serovar *canicola* et d'autres qui ne se trouvent que dans certaines régions. En effet, son polymorphisme clinique et les difficultés de son diagnostic sérologique engendrent d'emblée une sous-estimation du nombre de cas.

Chaque région a ses serotypes caractéristiques, déterminés par son écologie :

En Europe, la France est l'un des pays les plus touchés avec environ 700 personnes chaque année dont 300 cas en métropole soit une incidence annuelle de 0,50 cas pour 100 000 habitants métropolitains (Acha and Szyfres, 1989; Valenciano and Deshayes et al., 2002 ; world health organization 2003).

En Algérie, cette zoonose a été considérée comme une maladie à déclaration obligatoire (MDO) en raison de sa gravité, de son potentiel épidémique et d'une connaissance partielle de son épidémiologie (L'arrêté ministériel du 17 novembre 1990). Les scientifiques du laboratoire d'analyses médicales, de l'institut Pasteur d'Algérie, Alger, ont identifié 24 souches de leptospires. (Afiri et al., 2013)

Une épidémie de leptospirose a été observée du 30 novembre 2006 au 3 janvier 2007 dans une localité rurale (Tala-Athmane, Tizi-Ouzou). La proximité de deux décharges non contrôlées des habitations et l'invasion de ces dernières par des rongeurs ont été à l'origine de 48 cas confirmés sérologiquement par le MAT (microagglutination test) et hospitalisés au sein du service des maladies infectieuses du CHU de Tizi-Ouzou. Les caractéristiques épidémiologiques de ces 48 patients, majoritairement des femmes (sex ratio H/F = 0,5), d'âge moyen de 31,33 ans (16-83 ans) ont été concernés par une étude prospective (Figure I.4). La contamination était d'origine professionnelle (éleveur de bovins, n=3, agriculteur, n=4) dans 14,58% des cas (n=7) et péri-domestique dans 85,42 % des cas (n=41).

Le diagnostic de leptospirose a été confirmé par le MAT. Huit (08) sérogroupes ont été concernés et rencontrés par ordre de fréquence décroissante (Afiri et al., 2013), (Figure .5).

Nombre de malades

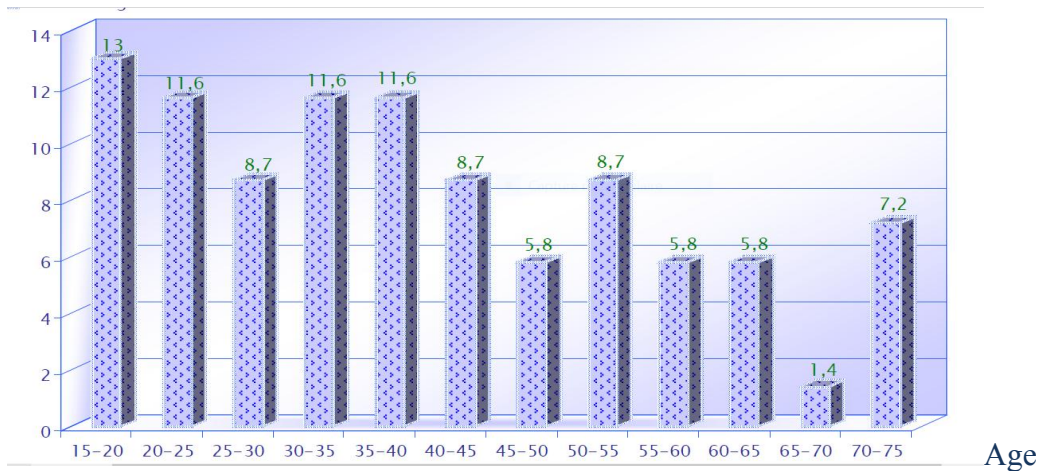


Figure 4. Répartition des malades atteints de la leptospirose par tranche d'âge (Lamrani, 2008)

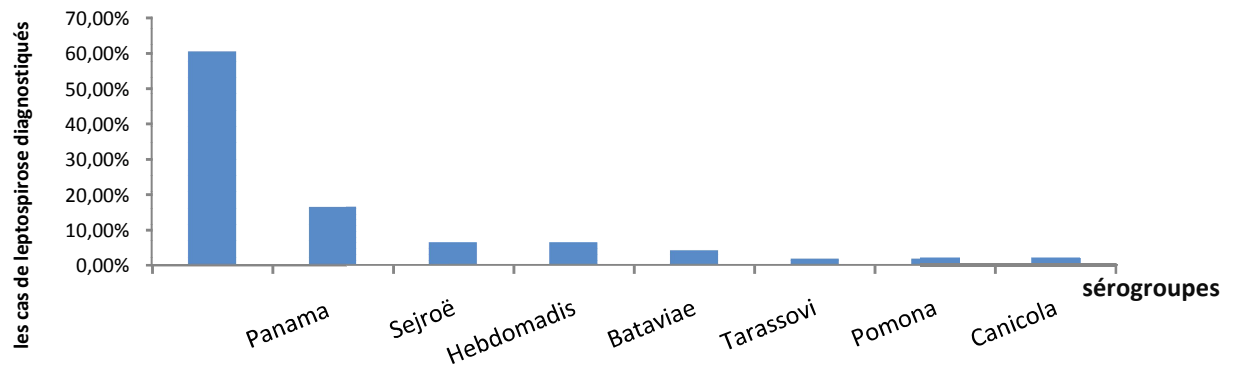


Figure.5. Principaux sérogroupes étiologiques des cas de leptospiroses diagnostiqués à Tala-Athmane, Tizi-Ouzou

On retrouve les mêmes régions traditionnellement plus touchées, sur une période de 15 ans, allant de Janvier 2000 à Décembre 2014, 30 cas de leptospirose ont été colligés au service des maladies infectieuses CHU Tlemcen, cependant 40% des cas (soit 12 malades) ont été colligés pendant le printemps. L'âge moyen de ces malades était de 45.03 ans (de 20 et 76 ans). Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et évolutives montrent que le Sex-ratio H/F est ainsi égal à 3, 76,66% des cas (23 malades) étaient de sexe masculin, alors que les femmes représentaient 23.33% des cas (7 malades), avec un pic de fréquence entre 30 et 35 ans (Ko et *al.*, 1999; Cherif and Karaoui, 2015) ont rapporté également que la maladie est généralement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes.

5. Agents responsables

Un certain nombre de facteurs, tels que le climat, la densité de population et le degré de contact entre l'entretien et les hôtes accidentels, influencent l'étendue de la transmission (Levett, 2001) :

5.1. Le climat

Le réchauffement climatique, l'augmentation des précipitations au niveau mondial et l'augmentation de fréquence des événements climatiques extrêmes contribuent à l'augmentation globale de l'incidence de la leptospirose (Hartskeerl ,2011;Bezirtzoglou ,2011) voire à son émergence dans certaines régions. Les inondations provoquent un lessivage des sols contaminés vers les sources d'eau plus vastes, utilisées par les hommes et/ou les animaux, ce qui augmente le risque d'interactions entre la bactérie et les hôtes potentiels.

5.2. La reproduction massive des hôtes

Le taux de fertilité élevé (une femelle des petits mammifères en particulier les rongeurs donne en moyenne 4 petits par portée pour 3 portées par an en moyenne, soit une femelle pour 12 petits). L'infection est acquise par ces hôtes d'entretien à un âge précoce, puis la maladie se perpétue dans la nature par une infection chronique des tubules rénaux de ces hôtes réservoirs. D'autres animaux sont considérés comme des hôtes fortuits et peuvent être infectés directement ou indirectement après une exposition à l'urine d'un animal porteur (Babudieri, 1958 ; Faine et *al.*, 1999; Levett, 2001).

Les humains ne sont pas d'importantes sources épidémiologiques de transmission, bien que l'excrétion des leptospires dans l'urine soit signalée depuis des semaines, des mois, voire plus d'un an (Bharti, et *al.*, 2003).

5.3. Professions à risques

Les professions exposées aux animaux ou à l'eau (agriculteurs / éleveurs, vétérinaires, riziculteurs, personnel militaire, bucherons, constructeurs...) ont également été associées à un risque accru de contracter la leptospirose (Katz et *al.*, 2001), et même d'autres activités courantes et simples, telles que le jardinage ou la pêche en eau douce sont des activités qui exposent les pratiquants aux leptospires (Douglin ,1997; Lévesque ,2007).

Dans les pays développés, les infections liées aux voyages et les expositions récréatives sont de plus en plus reconnues comme une source d'infection à *Leptospira*. En 2009, plus de

la moitié des cas de leptospirose au Royaume-Uni ont été contractés à l'étranger lors de voyages dans les régions tropicales (Johnston et *al.*, 2009). De nombreux cas se sont produits en association avec des activités aquatiques telles que la natation, les triathlons, le canoë et le kayak, y compris plusieurs éclosions aux États-Unis et à l'étranger (Katz et *al.*, 2001; Nardone et *al.*, 2004; Update, 2000; Alison and Michael, 2016).

6. Physiopathologie

Les leptospires pénètrent dans la peau par des abrasions ou des coupures, la conjonctive peut également servir de portail d'entrée. Une infection par la peau intacte peut survenir après une immersion prolongée dans l'eau. La transmission directe se produit par exposition oronasale aux liquides organiques ou au sang d'un animal infecté de façon aiguë. Le transfert placentaire, le contact sexuel et l'allaitement sont parmi les voies de transmission directe de la leptospirose (Greene et *al.*, 1998; Faine et *al.*, 1999). La transmission indirecte se produit lors d'une exposition à l'eau et aux sols contaminés. Lacs, étangs, rivières, fluides de drainage des abattoirs, eaux usées et boue sont des sources importantes de leptospires, qui sont capables de survivre pendant des semaines dans l'environnement sous un pH neutre ou légèrement alcalin (Smith and Self HRM, 1955; Faine et *al.*, 1999).

Après pénétration et diffusion dans l'organisme, les leptospires pathogènes échappent à la phagocytose et se développent rapidement dans le sang et tous les sites de l'organisme, y compris le système nerveux central et l'humeur aqueuse, leur mobilité étant favorisée par une paire de flagelles. Les bactéries sont alors responsables de lésions de vascularite, par l'intercalation d'une toxine glycoprotéique, entraînant une rupture des cellules endothéliales des petits vaisseaux. Les lésions pétéchiâles qui s'ensuivent peuvent expliquer certaines complications graves comme les hémorragies alvéolaires, les lésions ischémiques du cortex rénal conduisant à la nécrose des cellules épithéliales des tubules rénaux ainsi que la destruction de l'architecture hépatique responsable de jaunisse.

D'autres toxines peuvent être synthétisées comme des hémolysines, une hyaluronidase, une phospholipase etc. Les leptospires possèdent également sur leur membrane externe un lipopolysaccharide. Celui-ci possède une activité anti phagocytaire et permet de déterminer les sérogroupes. C'est lui qui est à l'origine de la réponse immunitaire humorale avec production des immunoglobulines (IgM) et des IgG. La durée de la persistance des anticorps est inconnue et ceux-ci protègent donc seulement contre un seul type de Sérovars.

Des manifestations chroniques, telles que l'uvéite, peuvent s'observer après des infections modérées ou sévères et seraient médiées par des complexes antigènes anticorps, ceci même en l'absence de germes. (Cherif and Karaoui, 2015).

Le cycle de l'infection leptospirose est illustré à la figure .6 :

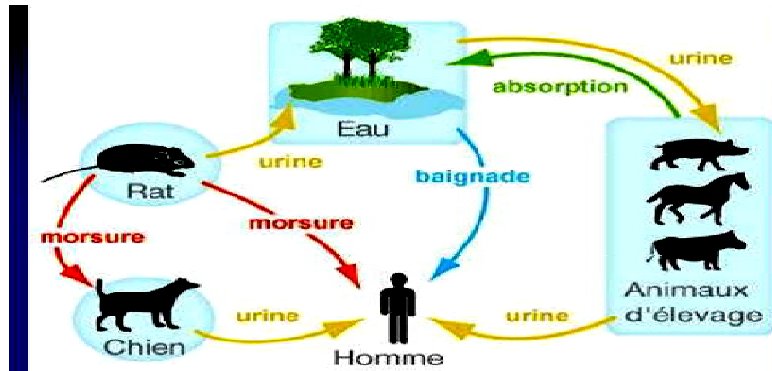


Figure 6.Voix de transmission de leptospirose d'après (Ko, 2009).

* Les rongeurs, les animaux domestiques et sauvages sont des réservoirs de leptospires. Ces animaux éliminent les bactéries dans leur urine, contaminant ainsi l'eau et le sol. Chez les rongeurs, l'infection produit un portage chronique et asymptomatique. Chez le bétail et les animaux domestiques, un large éventail de manifestations de la maladie peut survenir, telles que des fausses couches et des uvéites. Le maintien de la leptospirose dans ces populations est dû à leur exposition continue aux rongeurs ou à la transmission au sein des troupeaux d'animaux. Les humains sont des hôtes accidentels et s'infectent par contact direct avec les animaux ou l'eau et le sol contaminés. Après avoir pénétré à travers la peau ou les muqueuses, les leptospires se disséminent par la circulation sanguine et atteignent les organes vitaux, tels que le foie, les poumons et les reins, où ils provoquent respectivement l'hépatite, l'hémorragie pulmonaire et la néphrite. Les humains ne perdent pas un nombre suffisant de leptospires pour constituer des réservoirs de transmission.

7. Signes cliniques chez quelques espèces domestiques

7.1. Chien : L'infection par *Leptospira* chez le chien est probablement inapparente dans la majorité des cas (Prescott, 2008), généralement causée par *L. Interrogans* et *L. Kirschneri* (Goldstein, 2010). Lorsqu'elle s'exprime, la maladie est de sévérité variable, dépendante de la souche infectante, elle-même liée à la localisation géographique, et de la réponse immunitaire de l'hôte. Certains chiens montrent des signes mineurs ou moyens de l'infection, alors que d'autres développent une maladie sévère pouvant conduire à la mort. La leptospirose aiguë est caractérisée chez le chien par une hyperthermie, une anorexie, des douleurs abdominales, des vomissements, une insuffisance rénale et hépatique avec ictère. On peut aussi observer une tachycardie, des hémorragies pulmonaires (Figure .7) ou digestives.

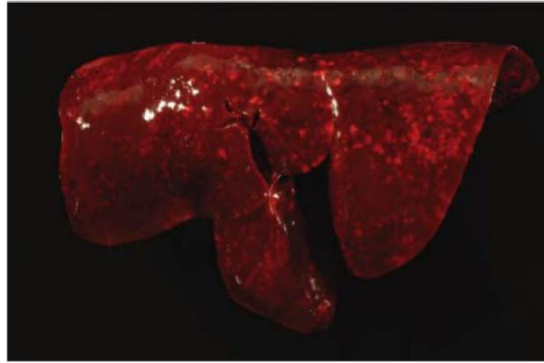


Figure 7. Poumons d'un chien atteint d'hémorragie pulmonaire aiguë diffuse sévère (Amélie, 2012)

7.2. Chat : Des résultats sérologiques montrent que les chats sont exposés à *Leptospira*, mais la maladie clinique est rarement décrite (Carlos et al., 1971 ; Jamshidiet al., 2009). Néanmoins, d'autres enquêtes épidémiologiques n'ont pas réussi à mettre en évidence une infection leptospirosique chez cette espèce (Fukushima et al., 1985 ; Feltet al., 2011). Il semble donc que le chat puisse être un hôte de *Leptospira*, et dans certains cas, pourrait être un réservoir contribuant à la contamination de l'environnement (Jamshidiet al., 2009).

7.3. Cheval : L'infection des chevaux est souvent asymptomatique, mais des anticorps sont fréquemment mis en évidence chez des animaux sains (Donahue et al., 1995). Lorsque l'infection est cliniquement exprimée, elle se traduit par la naissance de prématurés (Poonacha et al., 1993 ; Leonet et al., 2006), des atteintes rénales (Divers et al., 1992 ; Hogan et al., 1996), des atteintes hépatiques ou par des atteintes générales chez le poulain.

7.4. Porc : Chez le porc, les leptospiroses s'expriment sous des formes très diverses (Bolin, 1994) formes inapparentes, formes subcliniques (néphrites interstitielles chroniques conduisant à la saisie des reins à l'abattoir), formes modérées (fièvre, anorexie, retards de croissance), formes sévères « fièvre, ictère, hémorragie, mort », (Faine et al., 1999). Troubles de la reproduction « infertilité, avortements le plus souvent tardifs, contamination des porcelets par voie transplacentaire, mortinatalité », (Kazami et al., 2002 ; Boqvist et al., 2002). Les porcs peuvent être infectés de façon chronique et être des réservoirs de leptospires (Bolin, 1994).

8. Présentation clinique chez l'homme (symptômes)

Les caractéristiques cliniques de la leptospirose sont à la fois très variables et non spécifiques, selon les facteurs de l'hôte et du pathogène. Une proportion importante des infections sont probablement asymptomatiques ou infra cliniques, lorsque des symptômes apparaissent, le début est généralement de 2 à 30 jours après l'exposition, avec un temps d'incubation moyen de 7 à 12 jours (Who, 2003 ; Haake and Levett ,2015). La majorité des cas symptomatiques (jusqu'à 90%) suivent un schéma diphasique consistant en *une phase Leptospirémique* symptomatique initiale d'une durée de 5 à 7 jours suivie d'une *phase immunitaire* au cours de laquelle les symptômes peuvent progressivement s'améliorer à mesure que l'hôte monte une réponse anticorps, bien que cliniquement les deux phases peuvent être difficiles à différencier (Haake and Levett, 2015).

8.1. La phase septicémique

Les symptômes cliniques (Tableau .1) commencent généralement par l'apparition soudaine de fièvre, de frissons, de myalgies et de maux de tête, comme dans de nombreuses autres maladies fébriles. Les douleurs musculaires sont souvent concentrées dans les mollets et le bas du dos, et les maux de tête sont généralement frontaux et lancinants. La suffusion conjonctivale (érythème sans exsudat) est la découverte physique la plus caractéristique mais la présence peut être variable (observée chez 7 à 60% des patients sur la base de l'examen de plusieurs grandes séries de cas. Les Symptômes gastro-intestinaux (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée) sont fréquents et une toux non productive survient dans environ la moitié des cas (Bharti *et al.* 2003 ; Haake and Levett, 2015).

La méningite aseptique est également relativement fréquente (jusqu'à 80% des cas) et se manifeste généralement environ 7 jours après le début de la maladie. Moins fréquemment, les patients peuvent présenter une hépatosplénomégalie, une lymphadénopathie ou une pharyngite. Il convient de noter que l'éruption cutanée en tant que manifestation clinique de la leptospirose est très rare et en fait, suggère d'autres étiologies chez un patient souffrant d'une maladie fébrile. Dans une minorité de cas, la leptospirose peut évoluer vers une maladie sévère et fulminante avec un taux de mortalité de 5% à 40% (Haake and Levett, 2015).

Tableau.1. Principaux signes cliniques et leur fréquences (%), (Chérif and Karaoui, 2015)

Signe	Fréquence (%)
Fièvre	> 90
Céphalées	> 95
Frissons	> 75
Myalgies, Lombalgies, crampes	> 80
Anorexies	> 80
Ictère	40-80
INausées vomissement	40-70
Diarrhée, douleurs abdominales	30-60
Suffusion conjonctival	30-40
Oligoanurie	25
Arthralgies	20-40
Syndrome méningé	20-30
Toux	20
Hépatosplénomégalie	10-40
Exanthème	10-40

8.2. Complications sévères

La combinaison de l'ictère, de l'insuffisance rénale et de l'hémorragie est connue sous le nom de maladie de Weil et le schéma le plus caractéristique associé à une leptospirose sévère, bien que tout système organique du corps puisse être affecté en raison d'une large diffusion hématogène pendant la phase leptospirémique (Houpikian et *al.*, 2002 ; Lane and Dore, 2016). La forme ictérique a en général un mauvais pronostic mais des complications sévères peuvent se voir aussi chez des malades anictériques :

- ***L'atteinte rénale*** est courante en raison de la prédilection de l'organisme pour les tubules rénaux chez leurs hôtes naturels et l'insuffisance rénale se produit dans 16% à 40% des cas. (Abdulkader, 1997). La dysfonction rénale dans la leptospirose est généralement non oligurique et associée à une hypokaliémie. Bien que la fonction rénale se rétablisse généralement avec des soins de soutien appropriés, sa présence est associée à une mortalité plus élevée (Taylor, 2015).

- **L'atteinte hépatique** se produit généralement selon un schéma chole statique, avec des niveaux élevés de bilirubine conjuguée et des élévations plus légères des Amino-transférases sériques. Bien que l'amélioration soit lente, l'insuffisance hépatique est généralement réversible et n'est pas un facteur indépendant d'augmentation de la mortalité (Haake and Levett, 2015).
- **L'atteinte pulmonaire** a une incidence qui est très variable selon les séries variant de 20 à 70 %. Les patients peuvent présenter des symptômes allant de la toux, de la dyspnée, des hémoptysies, jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë nécessitant une ventilation assistée. La sévérité de l'atteinte respiratoire est généralement secondaire à une hémorragie intra-alvéolaire ou à un œdème pulmonaire lésionnel (Chérif and Karaoui, 2015). Une coagulopathie et des complications hémorragiques peuvent survenir en raison d'une altération de la fonction synthétique. Les manifestations pulmonaires de la leptospirose sévère comprennent l'hémorragie alvéolaire (appelée syndrome hémorragique pulmonaire sévère ou SPHS) et l'œdème pulmonaire, qui peuvent tous deux entraîner un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (Helmerhorst et al., 2012). L'atteinte pulmonaire est associée à une mortalité significativement plus élevée due à la leptospirose, avec des taux de létalité estimés de 50% à 70% (Segura et al., 2005 ; Costa et al., 2015)
- **L'atteinte du cœur** provoque le plus souvent des anomalies d'échocardiogramme non spécifiques (même en cas de maladie bénigne). Une myocardite, une péricardite, un bloc cardiaque et des arythmies peuvent survenir et les anomalies de repolarisation sont un mauvais signe pronostique. Même après le rétablissement, les patients peuvent avoir continué des séquelles tardives, y compris des symptômes neuropsychiatriques et oculaires (WHO, 2003).
- **Méningo-encéphalite et une altération mentale** des séquelles peuvent subsister après la phase aiguë, en général fatigue chronique, parésies, dépression et occasionnellement uvéite.
- **Mort fœtale**, la leptospirose en cours de grossesse peut provoquer une mort fœtale, un avortement, une mortinaissance ou une infection congénitale.
- **Décès**, la mort survient principalement dans un contexte de défaillance rénale, de détresse cardiorespiratoire, de syndrome hémorragique et, plus rarement, de défaillance hépatique. Le taux de létalité rapporté globalement entre 5 % et 30 % passe à plus de 10 % en cas d'insuffisance rénale aiguë et à plus de 50 % en cas d'hémorragie pulmonaire (Chérif and Karaoui, 2015).

9. Diagnostic biologique

L'aspect protéiforme de cette maladie rend son identification clinique difficile et aléatoire, et pose le problème du diagnostic différentiel avec d'autres pathologies (les hépatites virales, le paludisme ou d'autres infections virales, la grippe ou les infections à Hantavirus notamment). Le diagnostic biologique demeure donc un outil fondamental pour la confirmation des cas de leptospirose. Chez l'Homme, on peut isoler l'agent étiologique dans le sang pendant la première semaine puis dans les urines ensuite.

On effectue une culture directe ou par inoculation à un hamster. Pour cela, nous devons faire des prélèvements sanguins régulièrement pour cet examen sérologique (Merien and Berlioz, 2005).

9.1. Examens biologiques standards

Les principaux signes biologiques sont reportés dans le Tableau. 2. Ce sont souvent des signes biologiques simples qui permettent d'orienter le diagnostic en conduisant à rechercher un contexte épidémiologique évocateur en association avec certains signes cliniques.

Les résultats de laboratoire communément associés à la leptospirose sont généralement non spécifiques, mais peuvent inclure une leucocytose légère, ainsi qu'une thrombocytopénie. De légères élévations des transaminases sériques sont fréquemment observées. De plus, une protéine-C-réactive (CRP) très élevée (supérieure à 300 mg/l) serait en faveur d'un processus infectieux, la CRP est une protéine de la réaction inflammatoire (WHO, 2003).

Dans les cas de manifestations rénales plus sévères, la créatininémie est souvent élevée et une hypokaliémie et une hyponatrémie peuvent être présentes. Même lorsque les manifestations cliniques sont légères, une hyperbilirubinémie conjuguée est souvent présente et peut atteindre des niveaux allant de 40 à 80 mg / dl (Bharti and Nally, 2003 ; Haake and Levett, 2015). L'analyse d'urine peut révéler une protéinurie, une pyurie et une hématurie microscopique occasionnelle. La créatine kinase et l'amylase sérique peuvent également être élevées. L'examen du liquide céphalo-rachidien est généralement compatible avec une méningite aseptique, avec une pléocytose lymphocytaire, une augmentation modérée des protéines et un taux de glucose normal (Haake and Levett, 2015).

Tableau 2. Les anomalies biologiques dans le cas de leptospirose (Chérif and Karaoui, 2015).

Organe atteint	Anomalie biologiques	Fréquence %
Rein	Augmentation de l'urée sanguine	25-70
	Augmentation de la créatininémie	25-70
	Protéinurie modérée	25-70
	Hématurie microscopique	30-70
	Leucocyturie aseptique	35-60
Foie	Augmentation des transaminases	70-80
	Augmentation des phosphatases alcalines	70-80
	Augmentation de la bilirubine conjuguée	70-80
Hématologie	Thrombopénie	70-80
	Anémie	30
	Hyperleucocytose	70

La présence de ces anomalies biologiques est inconstante et varie beaucoup selon les pays et donc les Sérovars.

9.2. Examens biologiques spécifiques

Le diagnostic clinique de la leptospirose reste toujours difficile. Dengue, fièvre typhoïde, infection à Hantavirus et bien d'autres les maladies peuvent avoir des symptômes cliniques similaires à ceux symptômes associés à la leptospirose. Les cliniciens devraient sachez que les patients atteints de leptospirose ont généralement un antécédents de contact avec des animaux ou de l'eau contaminée. Par conséquent, la première étape pour établir un diagnostic précis consiste à collecter des informations sur les voyages, les loisirs et les activités professionnelles.

La phase aiguë appelée "leptospirémique" dure de 4 à 9 jours suivée par la phase immune", apparaît en même temps que les immunoglobulines de type M (IgM) (levette, 2001). Pendant la phase aiguë, il est préconisé de commander une culture leptospirale et PCR.

Échantillon de sang, cérébrospinal du liquide ou de l'urine peut être utilisé pour cultiver des leptospires sur des milieux particuliers tween-albumine EMJH « EllinghausenMcCullough Johnson Harris » (Faine et al., 1999). Considérant qu'il est souvent difficile pour déterminer dans quelle phase de la maladie se trouve un patient, le clinicien doit également commander un *Leptospira* IgM-ELISA (WHO; 2003), ce qui pourrait

donner un résultat positif au cours de la période entre la fin de la phase aiguë et le début de la phase immunitaire.

Une fois en **phase immunitaire**, les leptospires commencent à s'éclaircir du sang, et un sérodiagnostic devient la méthode la plus appropriée. Le diagnostic de la phase immunitaire repose principalement sur le test d'agglutination microscopique (MAT) (Faine et *al.*, 1999).

Les souches de *Leptospira* sont utilisées comme antigènes. Échantillons de sérum doit être collecté à au moins 2 semaines d'intervalle. Un quadruple ou une augmentation plus importante du titre ou de la séroconversion est considéré résultat positif. La complexité du test d'agglutination limite son utilisation aux laboratoires de référence (Figure .8).

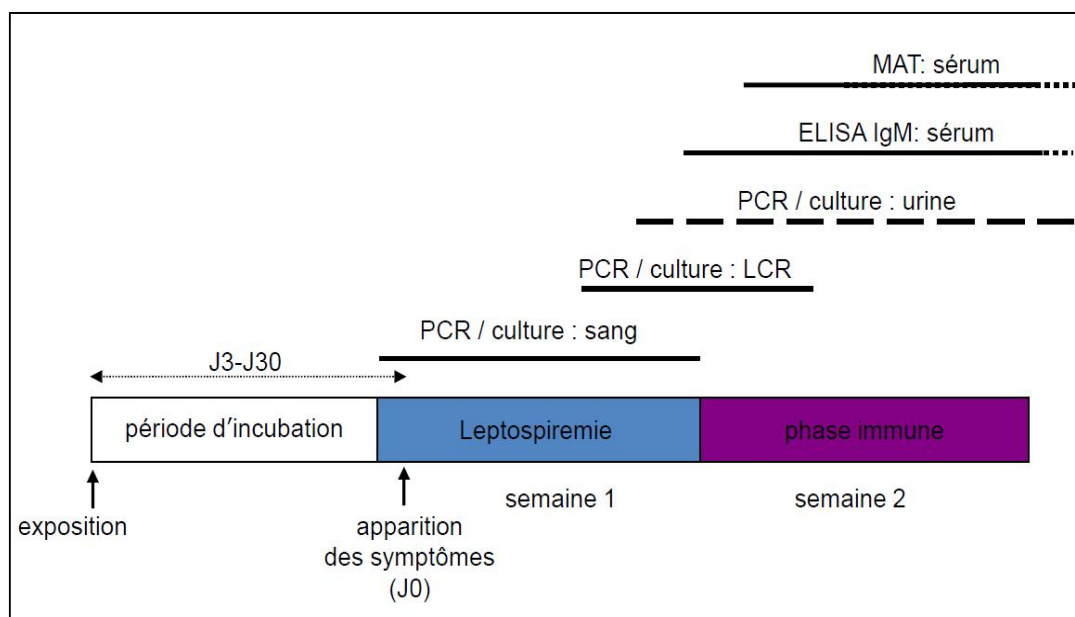


Figure 8. Les tests à effectuer en fonction du stade de la maladie (Koai et *al.*, 2009)

10. Les méthodes de diagnostic de la leptospirose :

A) Le test d'agglutination microscopique (MAT)

Détecte la présence d'anticorps spécifiques à leptospires, à l'aide d'un panel d'antigènes sous forme d'un ou des organismes vivants qui représentent les sérogroupes ou sérovars originaires à la localisation géographique donnée.

La confirmation sérologique nécessite un quadruple du test d'agglutination entre la phase aiguë et la phase de convalescence (phase immunitaire), les sérums sont obtenus au minimums 10 jours. Un seul titre MAT d'au moins 400 testes est également pris comme preuve d'une infection récente lorsqu'elle est appuyée par un résultat positif dans un test ELISA IgM (Who, 2003).

Principe du test d'agglutination microscopique (MAT): Le MAT ou test d'agglutination microscopique est considéré comme la référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose. C'est une méthode à la fois quantitative et qualitative. L'objectif du test est de détecter la présence des anticorps (IgM ou IgG) chez un patient. Une des premières limites du test est, qu'il ne permet pas de faire la distinction entre anticorps post infectieux et anticorps vaccinaux, toutefois la considération d'autres éléments concernant le patient pourra aider dans la démarche diagnostique. Le test peut être réalisé à partir du 6ème jour d'infection, lorsque la réponse immunitaire est initiée (Martel Morgane, 2019).

Le principe du MAT repose sur la réalisation de dilution d'échantillons des sérums prélevés sur un patient suspecté d'être atteint d'une infection leptospirosique. Les dilutions sont ensuite mises en contact avec un panel de cultures vivantes de sérovars de référence détenue par le laboratoire. La plupart des panels disponibles sur le marché sont constitués de 6 à 8 sérogroupes localement rencontrés chez l'espèce. Pour optimiser la sensibilité du test, le sérum doit être mis en contact avec les antigènes de tous les sérogroupes connus. À l'institut Pasteur, une vingtaine de sérogroupes sont testés. Le test ne détecte que les sérogroupes inclus dans le panel d'analyse, donc certains sérogroupes peuvent échapper à l'analyse MAT (Martel Morgane, 2019)

Lorsque le sérum utilisé contient des anticorps ceux-ci vont provoquer une réaction d'agglutination des leptospires. Cette réaction est observée au microscope à fond noir. Le prélèvement recommandé dans le cadre de la réalisation du MAT est le sérum. Cette technique est réservée à certains laboratoires spécialisés ; elle nécessite d'avoir des cultures des souches de leptospires. Elle permet l'identification du séro groupe infectant (martel, 2019).

Interprétation du MAT : Chaque sérovar testé est mis en contact avec une dilution de sérum du patient. La plus haute dilution causant l'agglutination de 50% des leptospires est considérée comme un résultat de test positif. Les résultats sont ensuite présentés sous forme de titre (Figure .9), (Martel, 2019). Il est à noter que certains auteurs définissent le titre d'un sérum comme la dilution la plus forte permettant d'avoir une agglutination. Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive (Mayer and Hudrisier, 2012).

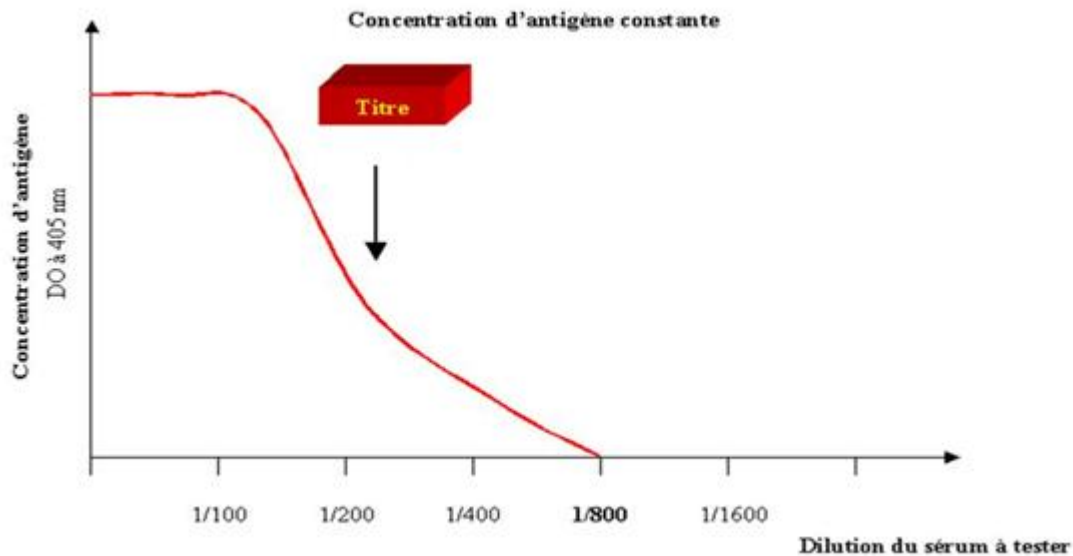


Figure 9. Mesure du titre d'un anticorps (Weill, 1998)

L'infection entraîne une bactériémie durant les premiers jours après exposition. Suite à l'augmentation du titre des anticorps agglutinants (phase immune), les leptospires sont éliminés de la circulation sanguine. Les leptospires sont aussi retrouvés dans le liquide céphalorachidien « LCR » et de manière transitoire dans les urines.

B)-Culture de *Leptospira*

La détection des leptospires par culture constitue un moyen définitif de diagnostic de leptospirose. Cependant, cette méthode est entravée par la faible croissance de certaines souches.

L'isolement réussi de *Leptospira* nécessite des tissus frais, des échantillons de sang ou d'urine prélevés avant le début de traitement antibiotique. Si la contamination de l'échantillon est suspectée, l'antibiotique, le 5-fluorouracile, doit être ajouté au milieu pour inhiber la croissance d'autres micro-organismes (Faine et *al.*, 1999 ; Levett, 2001).

La culture s'effectue sur des milieux particuliers (tween-albumine EMJH, liquide ou partiellement gélosé) à 30°C à l'obscurité durant 2 mois jusqu'à 13 semaines. L'agitation des cultures facilite la croissance (métabolisme aérobie) avec examen hebdomadaire par fond noir microscopie. En raison de cette longue période d'incubation, la culture n'est pas considérée comme un test de diagnostic de routine, mais reste importante à des fins épidémiologiques et pour confirmer davantage le diagnostic initial.

C)-PCR

Le principal avantage des technologies moléculaires, comme la PCR standard et en temps réel, est leur haute sensibilité (Ahmed et *al.*, 2009). La validité des données de PCR dépend des contrôles utilisés dans le test. La PCR conventionnelle, en particulier, peut donner des résultats faussement positifs en raison de la présence de contaminants. De plus, la préparation du matériel génétique à partir d'échantillons biologiques est une étape cruciale car ces échantillons peuvent contenir des inhibiteurs de PCR, qui peuvent produire résultats faussement négatifs.

Il y'a plusieurs protocoles de PCR pour la détection des leptospires. Diverses séquences ont été ciblées, notamment le gène de l'ARNr 16 S (Smythe, et *al.*, 2002); le gène LipL32, qui code pour la principale lipoprotéine membranaire leptospirale (Levett et *al.*, 2005); et les gènes qui codent pour les immunoglobulines de Leptospirales protéines (Lig) (Palaniappan et *al.*, 2005), qui sont des facteurs de virulence importants. En dépit d'être une technologie largement utilisée pour le diagnostic de nombreuses maladies, la PCR n'est pas souvent utilisée.

D) *Leptospira* ELISA-IgM et IgG

Des études avec un grand panel d'échantillons de patients et de laboratoire permettent la détection de *Leptospira* en pratique clinique. De plus la normalisation est encore nécessaire pour mettre en œuvre cette technologie. Dans ce travail nous nous intéressons à la technique d'Elisa qui permet de donner un diagnostic précoce de la leptospirose et donc d'aider à différencier une leptospirose évolutive d'une maladie antérieure grâce à la mise en évidence des IgM (Loïc, 2017). Un autre potentiel l'avantage de ce test est qu'il peut aider à différencier entre la leptospirose actuelle et précédente parce que les anticorps des infections passées peuvent ne pas être détectés.

*Leptospira*IgM-Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay (IgM-ELISA) donne une réponse positive plus tôt que le MAT car il est plus sensible aux IgM des anticorps. Cependant, il devient également négatif, d'abord par le résultat de la diminution des titres d'IgM, suivis par la production d'anticorps IgG (Who, 2003). Cependant, les cliniciens doivent être conscients du fait que *Leptospira*IgM-ELISA peut produire des faux positifs résultats. Par conséquent, il est recommandé de confirmer le diagnostic par MAT.

*Leptospira*IgM-ELISA a été développé en utilisant une grande variété de préparations d'antigènes, de leptospires sonicates à des protéines recombinantes, telles que (LipL32, LigA

et OmpL1 (Adler, 2010). La trousse *Leptospira*IgG-ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgG anti-*Leptospire* dans le sérum humain ou plasma (héparine).

Principe du dosage (Figure 12): Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes *Leptospire* pour fixer les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon (Figure I.10). Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué anti-IgG humaines marquées à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés spécifiques de la *Leptospire*. Le complexe immun constitué par le conjugué lié est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthyl-benzidine (TMB) qui donne un produit de couleur bleu.

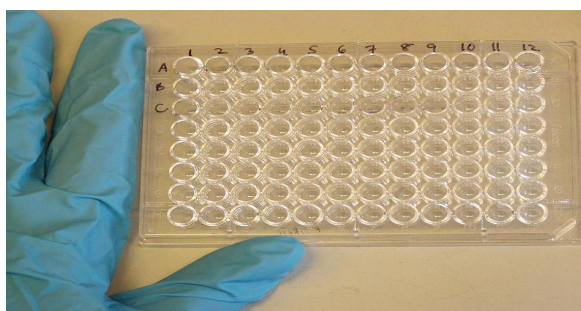


Figure 10. Recouvrement des puits par l'anticorps de recouvrement (Vézina and Lacroix, 2017)

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques de *Leptospire* dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA (Figure .11).



Figure.11 Lecteur de densité optique (Vézina and Lacroix, 2017)

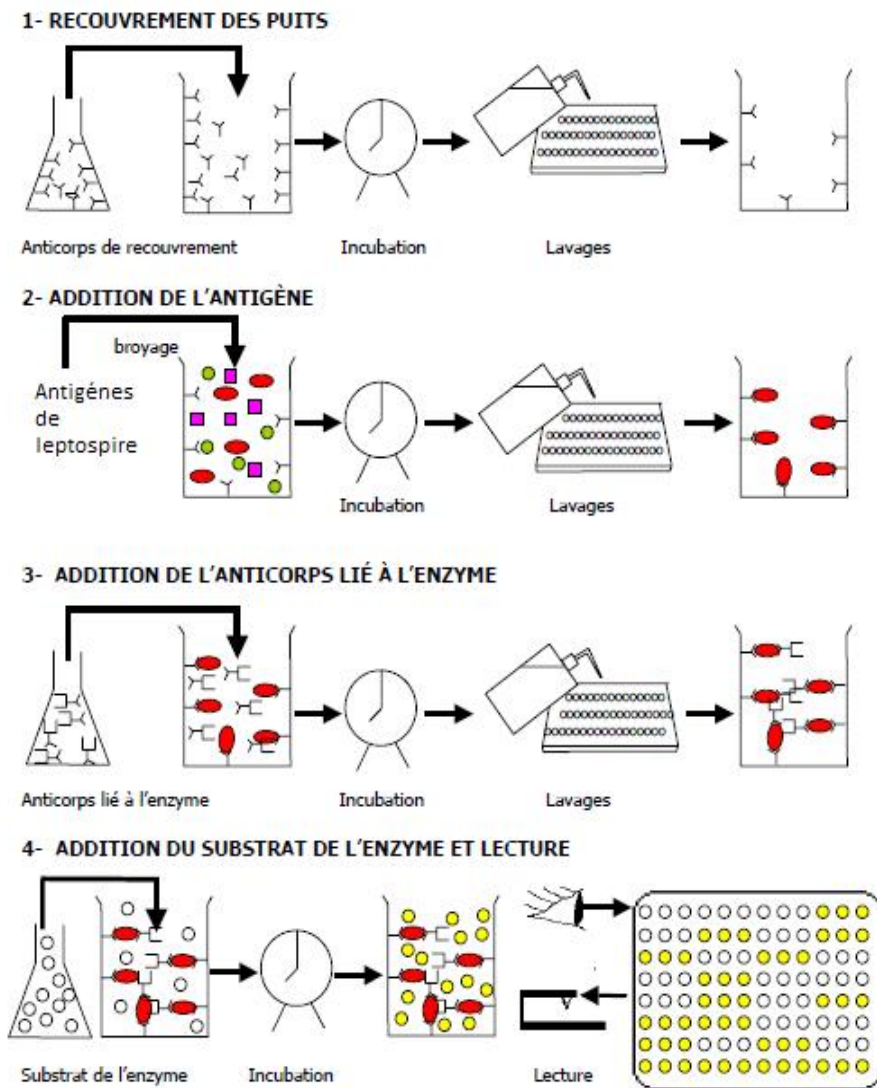


Figure 12. Schéma explicatif de la technique d'Elisa (Vézina and Lacroix, 2017)

11-Traitement de la leptospirose

11.1. Traitement curatif

Le traitement actuellement recommande est une antibiothérapie par voie veineuse débutée précocement (Tableau.3). La suspicion d'une leptospirose impose une antibiothérapie appropriée systématique sans attendre les résultats microbiologique, sérologique ou de biologie moléculaire. Ceci permet de diminuer l'apparition de symptômes et de les atténuer et de raccourcir leur durée ainsi que d'éviter des complications.(Houpikian and Brouqui , 2002 ; Suputtamongkol, Niwattayakul et *al.*, 2004 ;Ristow, 2007).

Tableau 3 : Antibiotique recommandés pour le traitement curatif de la leptospirose (Sidi and Karaoui, 2015)

ANTIBIOTIQUE	POSOLOGIE	COMMENTAIRE
CAS POUVANT ÊTRE TRAITÉS EN MÉDECINE AMBULATOIRE		
<i>Doxycycline</i>	- adulte : 100 mg <i>po bid</i> X 7 jours - enfant ≥ 8 ans : 2 mg/kg/jour divisés en 2 doses (max. de 200 mg/jour) X 7 jours	Contre-indiqué pour les femmes enceintes et les enfants <8 ans.
<i>Amoxicilline</i>	- adulte : 500 mg <i>po tid</i> X 7 jours - enfant : 25 à 50 mg/kg/jour, divisés en 3 doses (max. de 3 g/jour) X 7 jours	
CAS PLUS GRAVES NÉCESSITANT UNE HOSPITALISATION ET UN TRAITEMENT INTRAVEINEUX		
<i>Doxycycline</i>	- adulte : 100 mg IV toutes les 12 heures X 7 jours - enfant ≥ 8 ans : 4 mg/kg/jour IV divisés en 2 doses (max. de 200 mg/jour) X 7 jours	Contre-indiqué pour les femmes enceintes et les enfants <8 ans.
<i>Pénicilline</i>	- adulte : 1,5 million U IV toutes les 6 heures X 7 jours - enfant : 250 000 à 400 000 U/kg/jour divisées en 4 à 6 doses (max. de 6 millions U/jour) X 7 jours	
<i>Ceftriaxone</i>	- adulte : 1 g IV par jour X 7 jours - enfant : 80 à 100 mg/kg/jour en 1 dose (max. de 4 g/jour) X 7 jours	
<i>Céfotaxime</i>	- adulte : 1 g IV toutes les 6 heures X 7 jours - enfant : 150 à 200 mg/kg/jour divisés en 4 doses (max. de 12 g/jour) X 7 jours	
ENFANTS DE MOINS DE 8 ANS AYANT UNE ALLERGIE GRAVE À LA PÉNICILLINE		
Désensibilisation à la pénicilline (ceftriaxone ou céfotaxime) suggérée		
Si la désensibilisation est impossible :		
<i>Azithromycine</i>	10 mg/kg le 1 ^{er} jour (max. de 500 mg/jour) puis 5 mg/kg/jour en 1 dose (max. de 250 mg/jour) les jours suivants X 6 jours	
<i>Clarithromycine</i>	15 mg/kg/jour divisés en 2 doses (max. de 1 g/jour) X 7 jours	

De plus, un ***traitement symptomatique*** sera donc cible en fonction des symptômes observés :

- Insuffisance rénale nécessite une épuration extra-rénale.
- Syndrome de détresse respiratoire impose des manœuvres d'assistance respiratoire.
- Hémorragie demande une transfusion de plasma frais congelé et de concentré globulaire.
- Manifestations pulmonaires comme une dyspnée, hémoptysie peuvent être traitées par une administration de 500mg de methyl-prednisolone par voie IV.
- Choc cardio-vasculaire requiert une injection de médicaments vasoactifs.
- Taux de prothrombine bas nécessite l'administration de vitamine K.

Douleurs sont traitées par des antalgiques (Houpikian and Brouqui, 2002 ;Ristow, 2007).

En phase de rémission (10^{ième} jours), plusieurs symptômes commencent à apparaître : une sensation de bien être, disparition de la fièvre, des douleurs, des signes méningés, atténuation de l'ictère, persistance de l'asthénie, de l'albuminurie et l'hyperazotémie. Cinq jours plus tard, l'ictère continu à décroître, une guérison assez lente mais complète sans séquellesest observée aux 21-25^{ième} jours de la maladie.

11.2. Traitement préventif

La lutte contre les rongeurs, indispensable dans les villes, est difficile dans les zones rurales. Il existe des vaccins pour les chiens et les animaux d'élevage. Il faut en contrôler les effluents.

La protection humaine consiste à éviter les contacts avec les eaux stagnantes et à porter des bottes, des gants et des vêtements couvrants en cas de travaux exposés.

La vaccination pour les professions exposées n'est pas universelle. Le vaccin ne protège que contre le sérotypeictérohémorragique pour éviter que l'infection à *Leptospira* ne soit transmise d'un chien à un autre ou à un humain, les mesures préventives qui suivent doivent être appliquées par les propriétaires d'animaux et le personnel des cliniques vétérinaires (RAIZO, 2007 ; Brown and Prescott, 2008).

- Respecter les bonnes mesures d'hygiène personnelle, principalement le lavage des mains après tout contact avec un animal. Pour les personnes travaillant dans une clinique vétérinaire, il est également recommandé de se laver les mains en fin de journée et de changer de tenue de travail quotidiennement ;
- Suivre rigoureusement le protocole de vaccination que le médecin vétérinaire a recommandé pour l'animal ;

- Éviter de laisser les chiens boire ou marcher dans des mares d'eau auxquelles les animaux sauvages ont accès, par exemple dans les parcs publics ;
- Si de l'urine de chien est répandue sur une surface, couvrir celle-ci avec des serviettes de papier et appliquer une solution, dont la concentration est d'une partie d'eau de Javel domestique pour neuf parties d'eau, de la périphérie vers le centre. Laisser la solution agir au moins trente minutes. Éponger la solution d'eau de Javel avec des serviettes jetables.
- Lorsque l'on sait qu'un chien est infecté par le leptospire, il faut suivre en plus les recommandations relatives à la prophylaxie ;
- Se protéger les muqueuses et les yeux, et couvrir toutes plaies. Porter des gants pour toucher un animal suspect ou malade (Cherif and Karaoui, 2015).

CHAPITRE 2 : Matériels et méthodes

1. Introduction

La sérologie est l'examen le plus utilisé pour poser le diagnostic biologique spécifique de la leptospirose. Les anticorps sont détectables après la première semaine de la maladie.

Dans les premiers jours de la maladie il existe peu d'examen biologiques utilisables pour le diagnostic spécifique de la leptospirose. C'est dans cette phase critique, caractérisée par une absence de symptômes spécifiques que le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies infectieuses, particulièrement en zone tropicale, est essentiel pour l'instauration rapide d'une antibiothérapie.

L'interprétation de la sérologie est difficile, car le premier prélèvement est négatif une fois sur deux (Abgueuen and Pichard, 2006) et le test peut rester négatif en cas de traitement précoce par antibiotique. Une sérologie négative n'exclut donc pas le diagnostic et doit être impérativement répétée 15 jours à 3 semaines plus tard. En cas de sérologie positive, l'interprétation du test dépend également de l'épidémiologie de la leptospirose dans la zone où le test est réalisé. Plusieurs tests sérologiques pour le diagnostic de la leptospirose existent comme le test ELISA et le test MAT.

Dans ce présent chapitre, nous présentons le mode opératoire pour la réalisation du test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), (WHO, 2002 ; VN, 2015) avec des bactéries traitées au formol et bouillies de l'espèce intermédiaire de *Leptospira* *fainei* comme antigène pour détecter les anticorps spécifiques de *Leptospira*. Les échantillons de sérum testés préalablement par un test d'agglutination microscopique (MAT) comme test de référence, ont été utilisés pour l'évaluation du test ELISA.

2. Préparation des réactifs

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et étalons/contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25 °C) avant de commencer le dosage.

A). **Barrettes revêtues sécables :** Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de *Leptospira fainei* et sont prêtes à l'emploi. Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à 2 - 8 °C.

- B). **Solution de lavage (conc. x 20) :** Diluer la solution de lavage au 1/20ème; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 mL d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2 - 8 °C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37 °C dans un bain marie.
- C). **Solution de substrat TMB :** Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à 2 - 8 °C, à l'abri de la lumière. La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé (Bourhy et al., 2013).

3. Prélèvement et préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum humain ou plasma (héparine) humain. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2 - 8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgG. Diluer 10µL de l'échantillon avec 1mL du diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex.

4. Dosage

A). Préparation du dosage

Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des étalons/contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. On réserve au moins :

- 1 puit (par exemple A1) pour le blanc substrat,
- 1 puit (par exemple B1) pour le contrôle négatif,
- 2 puits (par exemple C1+D1) pour le contrôle Cut-off
- 1 puit (par exemple E1) pour le contrôle positif.

C'est conseiller de :

- Déterminer les étalons/contrôles et les échantillons du patient en doublets.
- Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.
- Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.
- Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

B). Etapes :

- a) Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs.
Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
- b) Couvrir les puits avec le couvercle.
- c) Incuber pendant 1 heure $\pm$ 5 minutes à 37 ± 1 °C.
- d) A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!

Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.

- e) Pipeter 100 µL du conjugué IgG anti-Leptospire dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
- f) Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.
- g) Répéter l'étape numéro 4.
- h) Pipeter 100 µL de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
- i) Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.
- j) Pipeter 100 µL de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB. La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.
- k) Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

5. Mesure:

- a) Faire le zéro du lecteur ELISA (Figure 11) à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.
Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables
- b) Mesurer l'absorbance de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.
- c) Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.
- d) Calculer les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaire.

6. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat** dans A1: Valeur d'absorbance < **0.100**
- **Contrôle négatif** dans B1: Valeur d'absorbance < **0.200** et < **Cut-off**
- **Contrôle seuil (Cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0.150 – 1.300**
- **Contrôle positif** dans E1: Valeur d'absorbance > **contrôle seuil (Cut-off)**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

7. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (Cut-off). Exemple: $0.44 \text{ DO contrôle seuil} + 0.42 \text{ DO contrôle seuil} = 0.86 : 2 = 0.43$, Cut-off = 0.43.

CHAPITRE 3 : Discussion

1. Introduction

Vu la pandémie du COVID-19, nous n'avons pas pu réaliser des travaux pratiques sur des échantillons de sérum humain ou plasma (héparine) humain pour Diagnostic et évaluation de la leptospirose par la technique ELISA. Ce chapitre concernera donc la discussion des résultats rapportés dans la littérature par des auteurs qui travaillent sur ce domaine d'étude.

2. Interprétation des résultats

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveau-nés. Interprétation des résultats ce fait comme suit :

Cut-off (Seuil)	10 U	-
Positif	> 11 U	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il y a eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 U	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore équivoque l'échantillon est jugé négatif .
Négatif	< 9 U	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.

Il est à noter qu'au cours de ces tests une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

3. Diagnostic de la leptospirose :

La leptospirose est sous-déclarée dans de nombreux pays en raison d'un manque de techniques de diagnostic. Le diagnostic initial doit reposer sur les antécédents épidémiologiques (détails d'une éventuelle exposition professionnelle ou récréative) et les signes et symptômes cliniques, mais comme il y a beaucoup de chevauchement dans la présentation clinique des maladies fébriles indifférenciées, une confirmation en laboratoire est essentielle. Un diagnostic de laboratoire précoce est important pour l'évaluation de la

leptospirose et pour fournir un traitement approprié aux patients et de prendre des mesures rapides en cas d'épidémie (Levett, 2001; McBride et *al.*, 2005).

En Algérie, les scientifiques du laboratoire d'analyses médicales, de l'institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie ont identifié 24 souches de leptospires. Une épidémie de leptospirose a été observée du 30 novembre 2006 au 3 janvier 2007 dans une localité rurale (Tala-Athmane, Tizi-Ouzou).

300 sérovars ont été identifiés dans le genre *Leptospira*, parmi lesquels cinq espèces "intermédiaires" (*Leptospirainadai*, *Leptospirabroomii*, *Leptospirafainei*, *Leptospirawolffii* et *Leptospiralicerasiae*) sont de pathogénicité incertaine et forment un groupe distinct de ceux qui sont des agents pathogènes connus et des saprophytes. Le sérotype intermédiaire de *L. fainei* a été initialement isolé à partir de l'utérus et des reins de porcs en Australie puis détecté par analyse sérologique chez l'homme, y compris des cas de leptospirose, en Australie et aux Seychelles.

Plus récemment, *L. fainei* a été isolé chez des patients au Danemark et en France. Par conséquent, cette espèce peut être trouvée chez l'homme, les animaux et l'environnement. En raison de sa position phylogénétique, entre saprophytes et pathogènes, cette espèce intermédiaire peut avoir une plus large gamme d'antigènes en commun avec les sérovars pathogènes que le saprophyte *L. biflexa*. Un défi majeur pour le diagnostic sérologique est de trouver un antigène qui permettra un large spectre de détection d'anticorps dirigés contre la variété de sérovars (Bourhy et *al.*, 2013).

4. L'étude des caractéristiques épidémiologiques

Les caractéristiques épidémiologiques des 48 patients détectés dans une localité rurale (Tala-Athmane, Tizi-Ouzou en 2006), majoritairement des femmes (sex-ratio H/F = 0,5), d'âge moyen de 31,33 ans (16-83) ont été concernés par une étude prospective. La contamination a été professionnelle (éleveur de bovins, n=3, agriculteur, n=4) dans 14,58% des cas (n=7) et péri-domestique dans 85,42 % des cas (n=41). Huit (08) sérogroupes ont été concernés (Afiri et *al.*, 2013). Sur une période de 15 ans, allant de Janvier 2000 à Décembre 2014, 30 cas de leptospirose ont été colligés au service des maladies infectieuses CHU Tlemcen, cependant 40% des cas (soit 12 malades) ont été colligés pendant le printemps. L'âge moyen de ces malades était de 45,03 ans (de 20 et 76 ans).

Les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et évolutives montrent que le Sex-ratio H/F est ainsi égal à 3 ; 76,66% des cas (23 malades) étaient de sexe masculin, alors que les femmes représentaient 23,33% des cas (7 malades), avec un pic de fréquence entre 30 et 35

ans (Ko et al., 1999 ;Cherif and Karaoui, 2015;) ont rapporté également que la maladie est généralement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes.

5. Evaluation du test MAT par rapport au test ELISA

L'ELISA est une technique plus simple à utiliser que le MAT et très sensible (94%) et spécifique (99%). Cette technique utilise un antigène non purifié de *L. fainei* souche patoc (saprophyte) car il réagit avec plusieurs leptospires responsables de pathologies humaines. La mise en évidence des anticorps se fait avec un anticorps anti-IgM humaines couplées à la peroxydase. Le titre-seuil est fixé à 400. La positivité de l'ELISA serait un peu plus précoce que celle du MAT (6-8ème jour). Les variations signalées dans la performance des ELISA peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment le type d'antigène utilisé dans le test, la valeur seuil sélectionnée, le choix de la définition de cas et les différences liées à la population (Limmathurotsakul et al., 2012; Signorini et al., 2012).

La performance globale de cet ELISA maison suggère l'applicabilité en tant que test de dépistage rapide pour le diagnostic de la leptospirose dans les milieux à ressources limitées et dans les hôpitaux et laboratoires où un MAT n'est pas disponible (Bourhy et al., 2013).

Les avantages de l'ELISA sont :

- ce test est plus facile à utiliser et accessible à tout laboratoire ;
- il est standardisé et il existe des trousse commercialisées pour l'effectuer ;
- il peut différencier une leptospirose évolutive d'une infection guérie (car il détecte des IgM).

Les inconvénients de l'ELISA sont :

- ce serait un test à utiliser en première intention, suivi du test MAT comme test de confirmation, compte tenu des interrogations sur les performances diagnostiques de l'ELISA ;
- il y aurait beaucoup de faux-négatifs dans le cas de leptospirose à sérogroupes grippotyphosa ou australis (Mérien and Berlioz-Arthaud, 2005).

Conclusion

La leptospirose est une anthroponose réémergence souvent sous diagnostiquée, de répartition mondiale. Elle présente un large spectre de manifestations cliniques, variable d'un simple syndrome pseudo grippal, forme de loin la plus fréquente et de bon pronostic, à l'atteinte pluri viscérale dont la forme clinique typique est le syndrome de Weil associant fièvre, ictère, insuffisance rénale et signes hémorragiques diffus. L'aspect protéiforme de cette maladie rend son identification clinique difficile et aléatoire. Le diagnostic biologique demeure donc un outil fondamental pour la confirmation des cas de leptospirose.

Le traitement de première intention de la leptospirose fait appel à la pénicilline G par voie intraveineuse. Ampicilline, Doxycycline et macrolides constituent des alternatives possibles.

La prévention repose essentiellement sur le contrôle du réservoir animal et hydrique, mais des mesures prophylactiques individuelles, vaccination et chimio prophylaxie doivent être entreprises en Algérie pour un meilleur contrôle de la maladie, et une étude des Sérovars les plus fréquents en Algérie s'impose .

RÉFÉRENCES

- Abdulkader, R.C. (1997), "Acute renal failure in leptospirosis". *Ren Fail* ; 19 : 191-198.
- Abgueguen P, Pichard E. (2006), "Leptospiroses". *Encycl Méd Chir Mal Infect*; Vol. 4, 1161.
- Acha, P. N., Szyfres, B. *Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux*, 2e édition. Off. Int. Des Epizooties, 1989, -1063p.
- Adler, B., de la Pen ã Moctezuma A. (2010), *Leptospira and leptospirosis*. *Vet Microbiol* ; 140 : 287-96.
- Tatiana R Leptospira and Leptospirosis CHAPITRE 7 Instituto de Cie ãncias Biome ´dicas, Universidade de Sãao Paulo, SP, Brazil, 2 Instituto Butantan, Sãao Paulo, SP, Brazil
- Afiri, M., Amara-Khorba, A., Ait-Kaid, D., (2013). *Epidémie de leptospirose*: 48 cas F-02, Médecine et maladies infectieuses, Vol. 43 : 4HS, pp. 34.
- Agunloye, C.A., Nash, A.S. (1996), "Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland". *J Small Anim Pract* , Vol. 37, pp. 126-129.
- Alison B Lane, Michael M Dor (2016), "A clinical review of evidence based diagnosis, treatment and prevention", *World J Clin Infect Dis* , Vol. 25 ; 6(4), pp. 61-66 .
- Amélie D (2012), Thèse *épidémiologie d'une zoonose, la leptospirose, dans deux îles de l'océan indien, la réunion et mayotte - étude comparée du rôle de différentes espèces sauvages et domestiques*.
- Babudieri B. (1958), *Animal reservoirs of leptospirosis*. *Ann NY Acad Sci* ; vol. 70, pp. 393-413.
- Leptospira and Leptospirosis Tatiana Rodrigues CHAPITRE 107.
- Bezirtzoglou C, Dekas K, Charvalos E (2011), *Climat changes, environment and infection : Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe*. Anaerobe In Press, Uncorrected Proof.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. (2003), "Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance". *Lancet Infect Dis* ; Vol. 3, pp. 757-771 [PMID : 14652202 DOI : 10.1016/S1473-3099(03)00830.
- Bolin CA (1994) "Diagnosis of leptospirosis in swine". *Swine Health and Production*; Vol. 2, pp. 23-24.
- Boqvist S, Thu HTV, Vagsholm I, Magnusson U (2002), The impact of *Leptospira* seropositivity
- Bourhy, P. , Vray M., and Picardeau, M. (2013), "Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis", *Journal of Medical Microbiology* Vol. 62, pp. 822-827.
- Bourhy, P., P. Hochedez, et al. (2012), "Leptospirose." *Encyclopédie Médico Chirurgicale*; 9(1), pp. 12
- Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. (1999), "Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genospecies". *Int J Syst Bacteriol*; Vol. 49; pp. 83-958.
- Brown K, Prescott J. (2008), Leptospirosis in the family dog: a health perspective. *Cmaj*; vol. 178, pp. 178.
- Carlos ER, Kundin WD, Watten RH, Tsai CC, Irving GS, et al., (1971), "Leptospirosis in the Philippines : feline studies". *Am J Vet Res*; Vol. 32, pp. 455-456
- Cherif S. A, Karaoui N 2015 De médecine agricole et l'institut de veille sanitaire français 2000 ; 54p. Thèse de leptospirose)
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez- Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko A.I. (2015), "Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis : A Systematic

- Review". *PLoS Negl Trop Dis*; Vol. 9, pp.386-98 [PMID: 26379143 DOI: 10.1371/journal.pntd.0003898].
- Cullen PA, Haake DA, Adler B.(2004), "Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes". *FEMS Microbiol Rev*, Vol.28, pp.291-318.
- Divers T, Byars TD, Shin SJ (1992), "Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse". *J Am Vet Med Assoc*; Vol. 201, pp.1391-1392.
- Donahue JM, Smith BJ, Poonacha KB, Donahoe JK, Rigsby CL (1995), "Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons". *J Vet Diagn Invest*, Vol. 7, pp.87-91.
- Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN (1997), "Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados". *Emerg Infect Dis*, Vol. 3; pp.78-80.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.(1999), *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd Ed. Melbourne, Australia: MedSci.
- Felt SA, Wasfy MO, El-Tras WF, Samir A, Rahaman BA, et al. (2011), "Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt". *Am J Trop Med Hyg*, Vol. 84, pp.420-425.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L, (2011), "Leptospirosis : aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system" . *Scand J Immunol* ; Vol. 73, pp. 40- 819.
- Fukushima H, Nakamura R, Iitsuka S, Ito Y, Saito K (1985), "Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Leptospira* sp.) simultaneously in dogs and cats". *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]*, Vol. 181, pp. 430-440
- Greene C, Miller M, Brown C.(1998), *Leptospirosis*. In : *Greene C, editor. Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia, PA : W.B. Saunders Co ; p. 27381. CHAPITRE 107 *Leptospira* and *Leptospirosis* Tatiana Rodrigues.
- Haake DA, Levett PN.(2015), "Leptospirosis in humans". *Curr Top Microbiol Immunol* ; Vol.387, pp. 65-97 [PMID :25388133 DOI : 10.1007/978-3-662-45059-8_5
- Haake DA, Matsunaga J.(2010); "Leptospira : a spirochaete with a hybrid outer membrane". *Mol Microbiol* ; Vol.77, pp. 805 14.
- Haake DA.(2000) "Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis". *Microbiology*; Vol. 146, pp. 1491 504.
- Hartskeerl AR, Collares-Pereira M, Ellis WA (2011), "Emergence, control and reemerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world". *Clin Microbiol Infect*, Vol. 17, pp. 494-501.
- Hauk, P., Macedo, F., Romero, E., Vasconcellos, S., de Moraes, Z., Barbosa, A. et Ho, P. (2008), "Dans LipL32, la principale lipoprotéine leptospirale, le terminus C'est le domaine immunogène primaire et sert d'intermédiaire avec le collagène IV et la fibronectine plasmatique" .*Infection and Immunity*, 76 (6), pp.2642-2650. doi : 10.1128 / iai.01639-07.
- Helmerhorst HJ, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, Hovius JW.(2012); " Severe pulmonary manifestation of leptospirosis". *net J Med*; Vol. 70, pp. 215-221 [PMID: 22744922]
- Hogan PM, Bernard WV, Kazakevicius PA, Fitzgerald MR (1996), "Acute renal disease due to *Leptospira interrogans* in a weaning". *Equine Vet J*, Vol. 28, pp. 331-333. Holt SC. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev* 1978 ; Vol.42 ; pp. 11460
- Houpikian P, Perolat P, Baranton G, Brouqui P. Leptospiroses(2002). *Encycl Med Chir* (Editions Scientifiques et Medicales Elsevier SAS, Paris), *Maladies infectieuses*, 8-039-Q-10, 2002, 14 p..
- Jamshidi S, Akhavizadegan MA, Bokaie S, Maazi N, A. GA (2009), "Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran" .*Iranian Journal of Microbiology*, Vol.1, pp. 32-36.
- Johnston V, Stockley JM, Dockrell D, Warrell D, Bailey R, Pasvol G, Klein J, Ustianowski A, Jones M, Beeching NJ, Brown M, Chapman AL, Sanderson F, Whitty CJ(2009). " Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom : recommendations for investigation

- and initial management". *J Infect*; Vol.59; pp. 1-18 [PMID : 19595360 DOI : 10.1016/j.jinf.2009.05.005].
- Katz AR, Ansdell VE, EfflerPV,(2001); "Middleton CR, Sasaki DM. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998". *Clin Infect Dis* ; Vol. 33, pp.1834-1841 [PMID : 11692294 DOI : 10.1086/324084].
- Kazami A, Watanabe H, Hayashi T, Kobayashi K, Ogawa Y, et al. (2002), "Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan". *J Vet Med Sci*, Vol. 64, pp.735-737.
- KoA.I., Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WDJ, Riley LW (1999), "Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil". *Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet*; Vol. 354, pp. 820-825.
- Ko A.I., Goarant C, Picardeau M (2009), "Leptospira : the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen". *Nat Rev Micro*; Vol. 7, pp. 736-747
- Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, Birgel EH, Fernandes WR, et al. (1985), "Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis". *Int J Zoonoses*, Vol. 12, pp. 111-119.
- Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, et al. (2006), "Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis". *J Vet Diagn Invest*, Vol. 18, pp. 218-221.
- Lévesque B, Messier V, Bonnier-Viger Y, Couillard M, Côté S, et al. (2007), Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagn Microbiol Infect Dis* 59 : 283-286.
- Levett PN.(2011); "Leptospirosis". *Clin Microbiol Rev* ; Vol. 14, pp. 296-326.
- Levett, P. N. (2001). « Leptospirosis ». *Clin Microbiol Rev*, Vol.14, pp. 296–326.
- Levillain A.(2001), *La leptospirose aux Antilles. Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique*, France; 49p
- Limmathurotsakul, D., Turner, E. L., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J., Suputtamongkol, Y., Chierakul, W., Smythe, L. D., Day, N. P. J., Cooper, B. & Peacock, S. J. (2012). "Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: a reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis". *Clin Infect Dis* , Vol.55, pp.322–331.
- Loïc E. (2017), *Émergence de zoonoses en Amazonie : épidémiologie comparée de la leptospirose et de la fièvre Q en Guyane française*, Thèse En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Guyane .
- Mailloux M.(1960), *Application au diagnostic biologique des Leptospiroses humaines : la réaction d'hémagglutination*. Laborama, 9, 4, 5, 11
- Malmstrom J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R.(2009), "Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*". *Nature* ;Vol. 460, pp.7625.
- Martel M (2019), *la leptospirose, étude comparative de la pathologie et des méthodes de diagnostic chez l'homme et l'animal* these présentée à l'université claudes-bernard - lyon
- Marylène J, (2011), les zoonoses transmissibles du rat à l'homme, conseils en officine , Thèse du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie.
- Mayer, G., Hudrisier, D.(2012), " immunoglobulines : réactions antigène-anticorps et tests expérimentaux pour la détection de ces réactions, immunologie" Immunologie, chapitre sept, Microbiologie et Immunologie.
- Mazzonelli J., Dorta De Mazzonelli G.T., Mailloux M. (1974), "antigen thermolabile chez les leptospirilles". *Ann. Microbiol*, Vol. 125, pp. 125-126.
- McBride, A. J., Athanazio, D. A., Reis, M. G. & Ko, A. I. (2005). "Leptospirosis". *Curr Opin Infect Dis*, Vol. 18, pp. 376–386.
- Mérien F, Berlioz-Arthaud A. (2005), "La leptospirose : une zoonose sous surveillance en Nouvelle-Calédonie et dans le Pacifique". *Revue Francophone des Laboratoires*, Vol. 374, pp. 45-50.

- Merien F, Berlioz-Arthaud A.(2005) , “la leptospirose: une zoonose sous surveillance en nouvelle-calédonie et dans le pacifique”. *Revuefrancophone des laboratoires* ; Vol. 374, pp. 45-50
- Michotjm, Lidove O, Boutboul D, Aguilar C, Merle H, Olindo S, Cabre P, PapoT.(2007), “la leptospirose : une cause inhabituelle d’uvéite antérieure”. *La revue de médecine interne* ; [DOI : 10.1016/j.revmed.03.008]
- Murraygl, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswanrw, Adler B.(2010), “mutations affectingleptospirainterroganslipopolysaccharideattenuate virulence”. *Molmicrobiol* ; Vol. 78; pp. 701.
- Nally Je, Chow E, Fishbein Mc, Blancodr, Lovett Ma.(2005), “ changes in lipopolysaccharide o antigendistinguish acute versus chronicleptospirainterrogans infections”. *Infect immun* , Vol. 73, pp. 325-160.
- Nardone A, Capek I, Baranton G, Campèse C, Postic D, Vaillant V, Liénard M, Desenclosjc.(2004), “riskfactors for leptospirosis in métropolitainfrance : results of a national case-control study” . *Clin infect dis* ; Vol. 39, pp .751-753” [pmid : 15356794 doi : 10.1086/423272].
- OCP La leptospirose. (2010), *une maladie toujours d’actualité info flash*, édition spéciale mai .
- on reproductive performance in sows in southern Vietnam. *Theriogenology*; Vol.58, pp.1327-1335.
- Paul Levet T. (2000),“ leptospirosis”. *cinicalmicrobiologyreviews* ; Vol . 14, pp . 296–326.
- Pillot J, Daguët G, Peloux Y, DcipoueyP.(1990),), *berche spirochètes, bactériologie médicale* 2e édition, , Chapitre 49, 1021-1054p.
- Plank R.Dean D.(2000), “ overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of leptospiraspp. Inhumans”. *Microbes and infection*”; Vol. 2, pp. 1265–1276.
- Poonacha KB, donahuejm, gilesrc, hong CB, petrites-murphy mb, et al. (1993), “leptospirosis in equinefetuses, stillbornfoals, and placentas”. *Vet pathol*, Vol. 30, pp. 362-369.
- Prescott J.(2008), “ canine leptospirosis in canada : a veterinarian's perspective”. *Canmedassocj* Vol. 178; pp. 397-398.
- Que-Gewirthnl, Ribeiroaa, Kalb SR, Cotterrrj, Bulach D, AdlerbetAl.(2004) “a methylated phosphate group and four amidelinkedacylchains in leptospirainterroganslipid a. The membrane anchor of an unusuallipopolysaccharidethatactivates tlr2”. *Jbiolchem*, Vol. 279, pp. 254-209.
- Raddi G, Moradodr, Yan J, Haake DA, Yang Xf, Liu J. (2012), “threedimensional structures of pathogenic and saprophyticleptospiraspeciesrevealed by cryo-electrontomography”. *Jbacteriol*; Vol. 194, pp. 129-9306.
- Rais H, (1997), *la leptospirose à propos de 38 cas*. Thèse de médecine, rabat ; n° 127, 97p.
- RistowP.(2007), *la leptospirose : les défis actuels d’une ancienne maladie* bull Acad.vet. France, Vol. 160, 267-278p .
- Romich, J. A. (2008), *understanding zoonotic diseases, thomson, delmarlearning*.
- Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Céspedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, LópezLiñán R, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, VinetzJM.(2005), “Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden” . *Clin Infect Dis*. Vol. 40, pp. 343-351 [PMID : 15668855 DOI : 10.1086/427110]
- Sheena A. Waitkins, (1986). “leptospirosis as an occupationaldisease”, *british journal ofindustrialmedicine*, Vol.43 , pp.721-725
- Signorini, M. L., Lottersberger, J., Tarabla, H. D. &Vanasco, N. B. (2012). “Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature”. *EpidemiolInfect* , Vol, 141, pp. 22–12.
- Simson AM. (1907), “note on an organismfound in yellow-fever tissue.”. *Public healthrep* ; Vol. 22 p. 541.
- Smithdjw, Self HM (1955), “observations on the survival of leptospiraaustralis in soil and water”. *J hyg*, Vol.53, pp.43-644.

- Swancutt MA, Lópezliñán R, Gotuzzo E, Guerra H, Gilmanrh, Vinetzjm. (2005), “clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden”. *Clin infect dis*; Vol. 40, pp. 343-351 [pmid : 15668855 doi : 10.1086/427110]
- Szeredi I, haake Da (2006), “immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection”. *Vetpathol*, Vol. 43; pp. 755-761
- Tayloraj, paris D newton P.(2015) “a systematic review of the mortality from untreated leptospirosis”. *Plosnegl trop dis*; 9: e0003866 [pmid: 26110270 doi: 10.1371/journal.Pntd.0003971]
- TerpstrawJ.(2006), “historical perspectives in leptospirosis”. *Indian j medmicrobiol* ; Vol. 24, pp. 316-320.
- Thias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al.(2003), “Leptospirosis : zoonotic disease of global importance”. *Lancet Infect Dis* ; Vol. 3, pp. 757-761. CHAPITRE 107 Leptospira and Leptospirosis Tatiana Rodrigues.
- Valenciano, deshayesf, mandre-fontaine g. *Et al.*, (2000-2001), *définition des priorités dans le domaine des zoonoses non alimentaires*. Institut de veille sanitaire - département des maladies infectieuses.
- Vézina, L., Lacroix, M. (2017), *Test Elisa enzyme-Linke dimmunosorbent assay*, Rapport Du Laboratoire De Diagnostic En Phytprotection – *Mapaq*
- VN (2015), *Leptospira IgG ELISA*, RE58931, Vol.5, pp.1-9.
- Weil A. (1886), Uebereineigentum “Mliche, Mit Milztumor, Cterus und archklinmed ” ; Vol. 39, pp. 209-32.
- Weill, B (1998), *Méthodes En Immunologie*, Chapitre 24, Faculté De Médecine Cochin Port Royal, France.
- WHO, (2002), World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.
- Who. (2003), *Human leptospirosis: Guidance For Diagnosis, Surveillance, And Control*. Switzerland
- World Health organization. (2003), *Human Leptospirosis : Guidance For Diagnosis, Surveillance And Control* ,122p.
- Yan Y, Chen Y, Liou W, Ding J, Chen J, Zhang J, Et Al. (2003), “An Evaluation Of The Serological And Epidemiological effects Of The Outer envelope Vaccine To Leptospira”. *J Chin Med Assoc* ; Vol. 66, pp.224-30
- Yasuda PH, Steigerwalt AJ, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. (1987) “Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family leptospiraceae with proposals for seven new Leptospira species”. *Int J Syst bacteriol*, Vol. 37, pp . 407-15.