

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département du génie de l'environnement
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et de Génie des Procédés
(BIOGEP)



MEMOIRE DE MAGISTER
Présenté par

AMARA - KORBA ANISSA

Pour l'obtention du Grade de Magister
En Génie de l'environnement Option Biotechnologie Environnementale

THEME

Production de l'Antigène Thermo – Résistant pour
Le dépistage de la leptospirose

Devant la commission d'examen :

Mr H. LOUNICI.....Professeur, ENP.....Président
Mr N. MAMERI.....Professeur, ENP.....Promoteur
Mr E.H.A LEBRES...Docteur en microbiologie, IPA.....Co-promoteur
Mme A.S MERAD.....Maître assistante, IPA.....Examinatrice
Mme N. ABDI.....Maître de conférences, ENP.....Examinatrice

Remerciements

Tout d'abord, je remercie DIEU, Tout puissant, pour m'avoir donné le courage et la force afin d'accomplir ce modeste travail.

Ce mémoire n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et le soutien de mon époux Mr MESRATI Toufik.

Mes plus sincères remerciements et reconnaissances vont spécialement à mon directeur de thèse Pr. MAMERI N.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements et gratitudes à :

Mr LOUNICI H. pour l'honneur qu'il nous fait de bien vouloir présider le jury.

Mme ABDI N., Mme MERAD A. et à Mme ADOUR L. pour l'honneur qu'elles nous font d'examiner ce travail.

Enfin, je remercie l'ensemble des enseignants de la post-graduation option Biotechnologie pour leur assistance pédagogique et leurs conseils en espérant que je serais digne du savoir qu'ils m'ont transmis.

ANISSA.

GLOSSAIRE

Antigène thermolabile : Antigène qui est détruit ou perd ses qualités à une température déterminée.

Asthénie : Dépression de l'état général.

Chikungunya : Maladie virale qui provoque une infection pseudo grippale avec douleurs articulaires.

Co- agglutinines : Agglutinations de plusieurs sérovars apparaît au cours des premières semaines de la maladie.

Dengue : Maladie virale caractérisée par une forte fièvre et des douleurs musculaires.

Dyspnée : Difficulté de la respiration

Epistaxis: Saignement de nez

Immuno dominant : Relative à un antigène dominant.

Immunsérums: Sérum fournie par des animaux immunisés activement contre un microbe.

Leptospirémique : Invasion des leptospires des différents organes humains.

Macro agglutination test : Test qui visualise les agglutinas à l'œil nu.

Micro agglutination test : Test exigeant un microscope à fond noir pour l'observation des agglutinas.

Neuro-encéphalitique: Atteinte neurologique qui se traduit par une image à l'IRM.

Pétéchies: Hémorragie cutanée, caractérisée de petites tâches d'un rouge violacé.

Sérogroupe: Souches ayant des critères sérologique identiques pouvant ou pas appartenir à la même espèce.

Sérovars: Souches appartenant au même sérogroupe grâce à la réactivité avec des anticorps monoclonaux.

Thrombopénie: Diminution du taux des plaquettes sanguines.

SOMMAIRE

Page

RESUME.....	4
INTRODUCTION	5

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique

I.HISTORIQUE	6
II.GENERALITES	8
II.1. Microbiologie.....	9
II.2. Physiologie et caractères métaboliques	11
II.3. Structure antigénique	12
II.4. Génome et biologie moléculaire.....	12
II.5. Mécanisme et mode d'action	12
II.5.1.Voies de transmission	13
II.5.2.Les réservoirs	15
II.6. Physiopathologie	16
II.7. Clinique	16
A/. Phase d'incubation.....	16
B/. Phase pré ictérique.....	17
C/. Phase ictérique.....	17
II.8. Le diagnostic	18
II.8.1. Diagnostic clinique.....	18
II.8.2. Diagnostic biologique.....	18
II.8.2.1. Diagnostic non spécifique.....	19
II.8.2.2 Diagnostic spécifique.....	19
A/. Diagnostic bactériologique.....	19
B/. Diagnostic sérologique.....	19
C/. Amplification génique (PCR).....	20
II.9. Traitement.....	20
II.10. Prophylaxie	21

CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes

III. MATERIEL ET METHODES.....	22
III.1. Test de Macro agglutination sur lame à l'antigène thermorésistant	22
III.2. Test de Micro agglutination (MAT)	23
III.2.1. Matériels et les réactifs	23
A /. Immunsérums de lapin	24
B/. Eau physiologique tamponnée	24
C/. Eau bidistillé stérile.....	24
D/. Souches de Leptospires contrôlée.....	25
E/. Milieu EMJH	25

III.2.2. Méthodologie MAT.....	30
A/. MAT	
qualitatif	30
B/. MAT	
quantitatif	32
III.3. Préparation de l'antigène Thermo-Resistant (TR)	33
III.3.1. Matériels et Réactifs.....	33
III.3.2.Mode opératoire	34
A/. Préparation de la culture <i>L. biflexa Patoc</i>	35
B/. Traitement de la culture par le formol (Formaldéhyde)	35
C/. Centrifugation de la culture	35
D/. Lavage du culot	37
E/. Traitement thermique de la suspension d'antigène TR	38
F/. Mesure de la densité optique au spectrophotomètre	39
G/. Etape finale du réactif antigène TR	39
III.3.3. Contrôle de qualité de l'antigène TR produit	39
A/. Réactions.....	39
B/.Interprétation.....	40
C/. Conservation.....	40

CHAPITRE 3 : Résultats et discussion

IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	41
IV.1.Production de l'antigène TR.....	41
IV.1.1.Etude comparative de l'antigène TR produit avec l'antigène TR importé.....	41
IV.1.2. Comparaison du test de micro agglutination avec le test de macro agglutination....	43
IV.1.3. Evaluation du réactif antigène TR pour le dépistage de la leptospirose en 2000.....	44
IV.2. Résultats du diagnostic sérologique par le test MAT.....	46
IV.3. Etude épidémiologique.....	48
IV.3.1. Age et sexe des malades.....	48
IV.3.2. Données géographiques des malades	48
IV.3.3. Contexte clinique	50
IV.3.4. Distribution mensuelle de la leptospirose humaine des 100 cas positifs	51
IV.3.5. Facteurs à risque.....	52
CONCLUSION.....	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	55
ANNEXE.....	58
GLOSSAIRE.....	59
Liste des abréviations.....	61

ملخص

إن الهدف من هذا العمل هو إنتاج كاشف عام المولد المضاد المقاوم الحراري انطلاقا من أرومة Leptospira biflexa.

Patoc I

هذا المولد المضاد يستعمل في التشخيص المباشر لليبتسيروز عن طريق الفحص التلازني الكبير على الشفرة . و نظرا لتفاقم الحمى القلاعية في الجزائر فان الوفرة غير الثابتة للكاشف المستورد حاليا من قبل بيوراد فرنسا تعرقل بشكل معتبر التحري السريع لهذا المرض . و لقد تم التعديل عملية إنتاج عرضها و اقتراحها المركز الوطني لمراجع الليبتسيبر التابع لمعهد باستور باريس فرنسا، وذلك على مستوى بعض الضوابط مثل سرعة الاركاس في المرض. و تمت دراستنا على مائة حالة مصلى ايجابي مؤكدة بتقنية مرجع التلازن الصغير (MAT) و كذا على البيانات الوبائية المسجلة في استمارة المعلومات المرفقة لمصل كل مريض .

و قد أثبتت المقارنة بين الكاشف المنتوج و الكاشف المستورد التي تمت على مائة حالة، أن نسبة الحساسية متشابهة 100% في حين أن نسبة نوعية الكاشف المستورد 93% تقدر بأعلى نسبيا من تلك المسجلة لدى الكاشف المنتوج 90% ، كما تجدر الإشارة إلى الجودة و النوعية العالية للتلازن الملاحظ لدى الكاشف المنتوج.

المصطلحات الأساسية

-مولد مضاد مقاوم حراري. الفحص التلازني الكبير على الشفرة. الفحص التلازني الصغير. وباء الحمى القلاعية .

RESUME

Le but de ce travail est la production d'un réactif générique, l'antigène thermorésistant (TR) à partir de la souche Leptospira biflexa Patoc I. Cet antigène est utilisé dans le diagnostic direct de la leptospirose par le test de macro-agglutination sur lame. Etant donné l'importance de la leptospirose en Algérie, la variabilité de disponibilité du réactif actuellement importé par Biorad*. France – empêche le dépistage rapide de cette maladie. Un protocole de production proposé par le CNR des Leptospires à l'Institut Pasteur Paris, a été modifié au niveau de certains paramètres telle la vitesse de centrifugation. Notre étude a été réalisée sur 100 sérums positifs confirmés par la technique de référence de micro-agglutination (MAT) ainsi que par les données épidémiologiques fournies par les fiches de renseignements des malades. La comparaison entre le réactif produit et le réactif importé aboutit à un pourcentage de sensibilité identique dans les deux cas (100%).

Par contre le pourcentage de spécificité du réactif importé (93%) est relativement supérieur à celui du réactif produit (90%). Toutefois, une meilleure qualité d'agglutination est observée avec le réactif produit.

Mots clés : Antigène thermorésistant, test de macro-agglutination sur lame, Leptospira biflexa Patoc, test de micro-agglutination (MAT), épidémie de la leptospirose.

ABSRTACT

The aim of this work is the production of a generic reagent, Thermo-resistant antigen (TR) from Leptospira biflexa Patoc I this antigen is used in the direct diagnostic of leptospirosis using the macroagglutination test on slide. Given the importance of leptospirosis in Algeria, the variability of the reagent availability, now brought in by Biorad –france-, prevents the fast screening of the illness. The production protocol suggested by the Center of Reference of the Leptospires at Institut Pasteur-Paris- has been modified at certain parameters such as the centrifugation speed. Our survey has been conducted on one hundred sera confirmed by the reference method of microagglutination test (MAT) as well as by epidemiological data provided by an information card of ill people. The comparison between the produced reagent and the imported reagent gives a percentage of sensibility (100%) similar to both . Whereas, the percentage of specificity of imported reagent (93%) is relatively greater than of the produced reagent (90%). We also notice a better agglutination quality using the produced reagent.

Key-words : thermo-resistant antigen, macroagglutination test, Leptospira biflexa , microagglutination test, leptospirosis epidemic.

INTRODUCTION

L'Algérie, à l'instar d'autres pays -développés ou en voie de développement-, met tout en œuvre pour améliorer certains secteurs- clés parmi lesquels nous citerons le secteur sanitaire, secteur d'activité de la recherche scientifique par excellence.

Cet important créneau utilise un nombre inestimable de produits de base, médicamenteux ou réactifs, parmi lesquels figure l'antigène thermorésistant, réactif destiné à la détection de la leptospirose dans le sérum humain.

Cependant, d'énormes difficultés surgissent quant à la disponibilité permanente de ces produits au niveau des différents centres hospitaliers et sanitaires.

Les causes de la variabilité de disponibilité des produits diffèrent selon leur origine, à savoir :

- Variabilité due à une faible capacité de production pour les produits de fabrication locale,
- Variabilité fluctuante avec le capital devise pour les produits d'importation.

Le diagnostic de la leptospirose au laboratoire qu'il soit direct ou indirect, est astreignant, car il nécessite la disponibilité permanente de ce réactif. C'est d'ailleurs ce qui a sûrement rebuté les laboratoires de l'Institut Pasteur d'Algérie, à sa production locale.

L'objet du présent travail consiste en la formulation et le contrôle d'un réactif générique à savoir :

Antigène Thermorésistant pour l'identification et le contrôle de la leptospirose.

La démarche méthodologique adoptée pour la réalisation de ce travail consiste à :

- Produire et contrôler le réactif antigène thermorésistant, grâce au mode opératoire établi par le centre national de référence des leptospires de l'Institut Pasteur Paris – France - .
- Comparer le réactif ainsi produit avec le réactif témoin importé en testant 100 sérums positifs par la technique de macro-agglutination sur lame,
- Confirmer le diagnostic positif des 100 malades testés, grâce la technique de référence de micro-agglutination .
- Réaliser une étude épidémiologique pour l'année 2007, afin de connaître la situation de la leptospirose en Algérie.

I. HISTORIQUE

La leptospirose a été décrite « officiellement » en 1886 simultanément et indépendamment par **MATHIEU** et **WEIL**, alors que la maladie avait déjà été individualisée à Paris par **LANDOUZY** en 1883 qui réunissait la description de deux cas chez des égoutiers de « fièvre bilieuse ou Typhus hépatique ». Elle a été, cependant, très certainement rapportée depuis longtemps en Asie, associée à la riziculture sous divers noms. Ce seront les Japonais **INADA** et **IDO** qui en 1916 identifieront et cultiveront l'agent étiologique sous le nom de **Spirochaeta icterohaemorrhagiae**. Ils incrimineront aussi le rat comme réservoir. En fait, **STIMSON**, en 1907, observe des **Spirochaeta interrogans** dans les reins d'un malade décédé à la Nouvelle Orléans de « fièvre jaune ». [16]

En 1914, **WOLBACH** et **BINGER** découvrent dans l'eau douce, une nouvelle espèce non pathogène de *Spirochaeta* baptisée **Spirochaeta biflexa**. De ce fait la classification officielle du genre *Leptospira* regroupe deux espèces :

- 1- *Leptospira biflexa*, incluant les germes saprophytes ;
- 2- *Leptospira interrogans*, représentant la souche pathogène avec les sérotypes.

En 1918, le diagnostic sérologique spécifique par « Réaction Agglutination – Lyse » ou **RAL**, rebaptisé plus tard « Micro – Agglutination Test » ou **MAT**, est mis au point à l'Institut Pasteur de Paris – France par **MARTIN** et **PETTIT**.

En 1920, une surveillance passive de la leptospirose cumulé des sérodiagnostics sera mise en place en France. [18]

La situation paraît simple : une bactérie, une maladie, un réservoir. Puis, des leptospiroses parfois atypiques seront isolées des leptospires dont les anticorps suscités dans l'organisme ne répondront pas à l'*Icterohaemorrhagiae*. Le nouveau sérotype ainsi isolé sera ajouté à la gamme antigénique.

C'est la période non pas de la leptospirose, mais des leptospiroses. La **RAL**, utilisée avec des immunosérums connus, et effectuée pour différencier les sérotypes. On décrit alors fièvre des 7 jours, la fièvre automnale, la fièvre des marais, etc.

En 1971, **BORG-PETERSEN**, découvre l'existence d'un antigène thermolabile et immunogénique dans le sérotype **ICTERO N°1**.

En 1972, **KMETY** démontre que l'antigène Vi, présent dans les souches pathogènes, est inactivé lorsqu'il est chauffé à 56°C pendant dix minutes. Alors qu'il est possible d'obtenir un antigène thermorésistant par un traitement à la chaleur de la souche saprophyte *Leptospira biflexa* Patoc I. Cet antigène résiste à la température de 100°C pendant 30 minutes et offre un pourcentage d'agglutination avec les sérums homologues atteignant 99%. En 1974, **J MAZZONELLI, G. DORTA DE MAZZONELLI** et **M. MAILLOUX** ont mis au point une technique sérologique d'agglutination sur lame, simple, précoce et rapide, utilisant un antigène polyvalent, l'antigène Patoc, afin de simplifier le dépistage des Leptospiroses humaines.

En 1977, au cours de la première réunion des Leptospirologues européens à Brescia, le Docteur **Joyce COGHLAN** décrit les résultats obtenus grâce à la technique d'agglutination macroscopique modifiée par elle-même. [17]

Afin de simplifier le dépistage des Leptospiroses humaines, **J. Mazzonelli, G. Dorta de Mazzonelli, et M. Mailloux** ont mis au point une technique sérologique simple, rapide, utilisant un antigène polyvalent, l'antigène Patoc préparé selon les indications du **Pr. Joyce Coghlan**. [17]

II. GENERALITES

La leptospirose est une anthroozoonose très répandue dans le monde entier, elle est associée à une bactérie qui, émise par les urines d'animaux infectés, peut survivre dans l'environnement humide (eaux douces). [15]

La diversité clinique des leptospiroses est extrême, de même que la diversité des souches sur les plans épidémiologique, antigénique ou génétique. Cependant le groupe des leptospires pathogènes est homogène, ses modalités de transmission, son devenir dans l'organisme infecté et les organes- cibles, restent les mêmes.

Il reste vrai que l' *Icterohaemorrhagiae* est responsable des leptospiroses les plus fréquentes et les plus graves dans le monde. [15]

La leptospirose présente un large spectre de manifestations cliniques depuis le syndrome pseudogrippal (fièvre, myalgie, vomissements, douleurs abdominales, éruptions cutanées) et parfois plus évocateurs à ce stade de la maladie (suffusion conjonctivale bilatérale) de bon pronostic jusqu' à l'atteinte pluriviscérale dont la forme clinique typique est **le syndrome de WEIL** associant fièvre, ictère, insuffisance rénale et signes hémorragique diffus. [15]

D'autres organes peuvent être atteint dans le cadre d'une défaillance multi viscérale (poumons, cœur et méninges) engageant le pronostic vitale.

Une étude a montré un taux de séroconversion significatif dans 30 % des cas d'un échantillon de population infantile suggérant ainsi un contact possible dès les premières années de vie.

De ce fait, l'observation continue de cas, une présentation clinique très polymorphe, la méconnaissance occasionnelle du diagnostic et une mortalité qui ne semble pas varier depuis 20 ans, justifie l'importance de l'étude épidémiologique réalisée dans ce mémoire.

II.1. Microbiologie

Les leptospiroses sont dues à des bactéries du genre ***Leptospira***, de la famille des ***Leptospiraceae*** .Ce sont des bactéries à Gram négatif, très allongées, hélicoïdales avec des extrémités recourbées en crochets. Elles ont de 4 à 25 µm de long et 0,1 µm de large. (Fig 3)

Ces bactéries sont caractérisées par une très grande mobilité, à la fois par rotation, flexion, et translation.

L'observation de ces fins spirochètes nécessite un microscope muni d'un condenseur à fond noir, en raison de son grand angle de champ à faible grossissement.

Les spires serrées visible au microscope électronique sont au nombre d'une vingtaine permettent de distinguer les leptospires des autres spirochètes de même que la présence d'un endoflagelle, un organe locomoteur interne.

Les leptospires sont capables de passer à travers de filtres 0,45 et même 0,22 μm ce qui peut être mis à profit pour décontaminer une souche en culture.

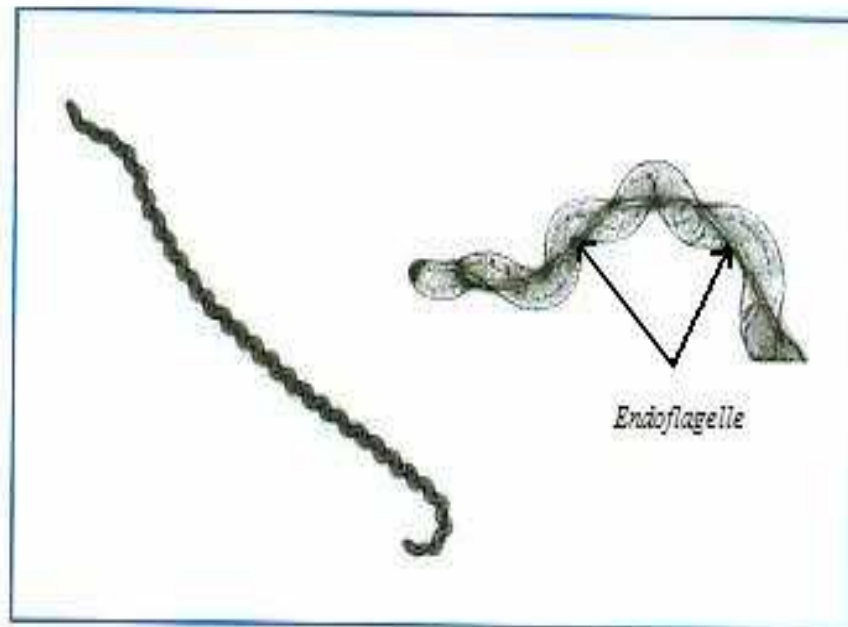


Figure 1: Morphologie des leptospires en microscopie à balayage

Autrefois, les leptospires étaient divisés en deux espèces par le critère pathogénique: *Leptospira biflexa* regroupait les souches saprophytes (aquicoles) et *Leptospira interrogans* les pathogènes. [19]

Toute fois rien ne permet morphologiquement de distinguer les leptospires pathogènes des saprophytes. [1]

Une définition génomique sur la base du taux de réassociation des ADN dans des expériences d'hybridation ADN/ ADN [31] a révélé que les leptospires pathogènes étaient divisées en 7 espèces :

- * *Leptospira interrogans*
- * *Leptospira borgpetersenii*
- * *Leptospira santarosai*
- * *Leptospira noguchii*
- * *Leptospira weilii*
- * *Leptospira kirshneri*
- * *Leptospira alexanderi*

Les leptospires sont divisées en un nombre indéterminé d'espèces dont 3 sont nommées : [31]

- * *Leptospira biflexa*
- * *Leptospira wolbachii*
- * *Leptosira mayeri*

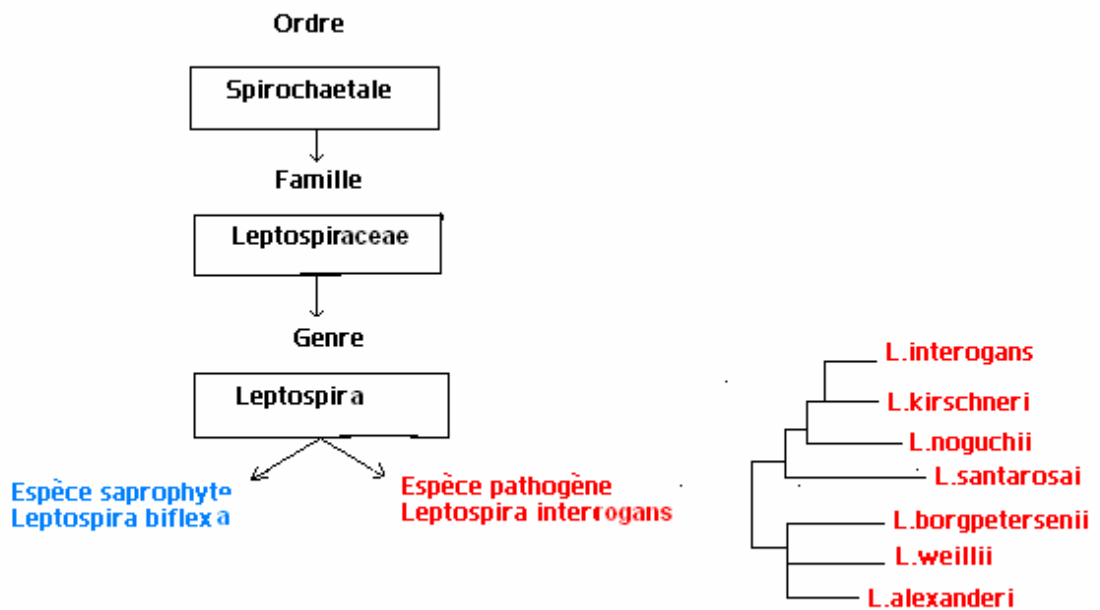


Figure 2 : Arbre phylogénétique des leptospires

II.2. Physiologie et caractères métaboliques

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes, catalase positive, oxydase négative.

Ces bactéries doivent être maintenues à l'obscurité, ce sont des germes Chimio-organotrophes, aux besoins nutritionnels simples mais inhabituels (glucides non nécessaires) capable d'utiliser les acides gras à long chaînes comme seule source de carbone et d'énergie. [4]

La culture des leptospires est délicate (température de croissance varie entre 28-30°C) et lente (temps de génération de 10 à 12 h). [1]

Actuellement, on utilise le milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris) qui contient comme source de carbone des acides gras à longue chaîne sous la forme de Tweens, et des ions ammonium comme source d'azote.

Cependant, ce milieu n'est pas totalement synthétique, car on doit y ajouter de l'albumine bovine fraction V pour détoxiquer les Tweens. [18]

Le glycérol et le pyruvate améliorent la croissance, les vitamines B1 et B12 sont nécessaires, de même que les ions chlorure, phosphate, calcium, magnésium et ferriques.

En pratique, on ajoute également les ions zinc, manganèse, et les sulfates. [15]

Le milieu EMJH devient sélectif pour les leptospires en y rajoutant l'un des inhibiteurs suivants : [18]

- 5 fluoro-uracile.
- Phosphomycine.
- Kanamycine.
- Rifampicine.
- Métronidazole.

A l'isolement la culture est très lente, exigeant parfois jusqu'à 2 mois. Par contre après plusieurs sub-cultures une croissance correcte s'obtient en 8-10 jours.

Il faut savoir que la culture des leptospire est favorisée en milieu EMJH liquide qu'en milieu solide car leur croissance est très lente et les colonies apparaissent au mieux en une vingtaine de jours. [15,26]

II.3. Structure antigénique

Les différences antigéniques expliquent l'existence de sérotypes voisins qui n'auraient pas les mêmes propriétés chez l'homme et chez les animaux et possèderaient des rôles différents en épidémiologie. Des variants antigéniques peuvent être sélectionnés en cultivant les leptospire sur milieux liquides contenant des antisérums de lapin homologues ou hétérologues.

La présence de variants antigéniques est importante d'un point de vue vaccination. Il existe de nombreuses préparations antigéniques contenant des antigènes de groupe ou type. [28]

L'enveloppe des leptospire contient des antigènes, surtout de nature poly osidique ou lipopolyosidique. Les antigènes spécifiques prédominent à ce niveau.

La spécificité des antigènes rencontrées diminue de l'extérieur vers l'intérieur de la bactérie et la nature des antigènes prédominants change : celle-ci est de moins en moins poly osidique et de plus en plus protéique. [29]

Les nombreuses réactions rencontrées pendant la première phase de la maladie empêchent de déterminer le sérotype en cause à ce stade. Il est nécessaire d'examiner d'autres prélèvements successifs. [30]

L'antigène immunodominant, responsable de la diversité antigénique de surface (sérovars) est le lipopolysaccharide (LPS). Situé dans l'enveloppe externe, il suscite la production d'anticorps, révélés par le test de micro agglutination (MAT).

II.4. Génome et biologie moléculaire

Les leptospires comportent deux chromosomes circulaires dont l'un de 4300 kb (kilo bases) mais pas de plasmides. [1]

Les gènes ribosomiaux ne sont pas organisés mais sont en nombre non équilibrés et différent selon les sérovars.

Des transferts génétiques latéraux ont été observés d'une espèce à l'autre [27] et sont même responsables de problèmes de classification lorsqu'ils touchent le locus *hms* codant le lipopolysaccharide (LPS).

II.5. Mécanisme et mode d'action

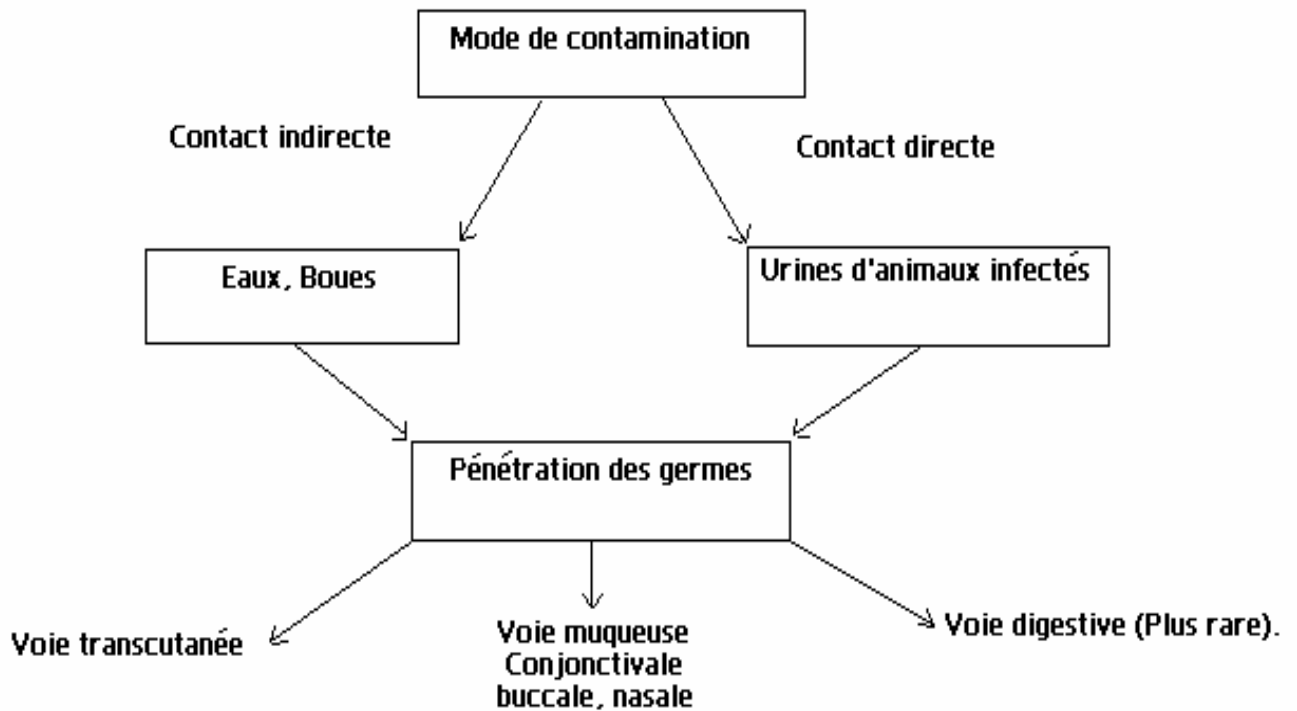
La leptospirose est une zoonose dont les réservoirs animaux sont multiples. (Fig 3) Les cas sont donc généralement isolés ou sporadique mais parfois des groupements peuvent évoquer un aspect épidémique. Ces dernières décennies l'urbanisation incontrôlée dans des conditions sanitaires médiocres conduit à l'écllosion de pseudo-épidémies avec un nombre important de malades. [32]

II.5.1. Voies de transmission

La contamination chez l'homme peut être directe par contact avec les animaux infectés, soit indirecte par contact avec les eaux ou d'autres produits souillés par les urines des animaux infectés.

La survie de leptospires pathogènes durant plusieurs mois a été constatée dans des eaux proches de la neutralité ou légèrement alcalines.

De même, le caractère infectant des urines peut se prolonger lorsqu'il s'agit de celles d'animaux herbivores ou omnivores. (voir schéma)



Représentation schématique de la transmission des leptospires dans la nature

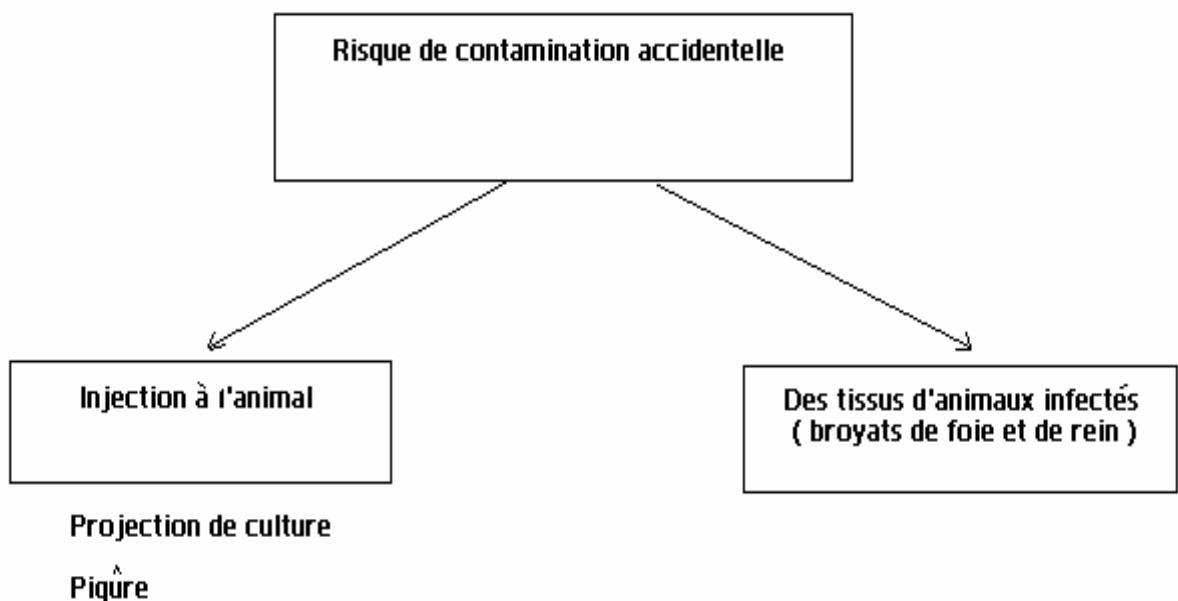
Les leptospires pénètrent dans l'organisme humain par les muqueuses intactes telles la conjonctive, la muqueuse nasopharyngée ou les poumons, en cas d'inhalation d'eau et à la faveur de plaies, ou d'excoriations de la peau parfois minimes.

Chez les animaux, les mêmes voies de contaminations sont fonctionnelles mais peut s'y ajouter, chez le bétail, une transmission vétérinaire ou congénitale.

La transmission inter humaine est exceptionnelle, que ce soit par voie urinaire [21], sexuelle [22], d'allaitement [23] ou transplacentaire [24].

Le risque de contamination de laboratoire est en fait limité .La **transmission** par voie aérienne n'existe pas mais dans les conditions habituelles de manipulation, il ne peut y avoir formation d'aérosols.

Le risque est lié essentiellement par un contact accidentel avec les germes : soit par projection de culture, notamment lors d'injection à l'animal, soit par piqûre, soit par contact avec des tissus animaux infectés.(voir schéma)



Représentation schématique de la transmission des leptospires au laboratoire

II.5.2. Les réservoirs

Le réservoir des leptospires pathogènes est essentiellement animal, mais se prolonge dans l'environnement. Il peut s'agir d'animaux infectés, malades ou non (porteurs chroniques), ou encore de leurs cadavres ou dépouilles dont la survie des leptospires est limitée dans le temps. Les animaux infectés excrètent par leurs urines des leptospires pendant de longues durées (années).

Les leptospires peuvent survivre pendant plusieurs semaines ou mois dans les sols ou les eaux douces, notamment à l'abri de la lumière (égouts, mines). [15]

Le risque de contamination est élevé dans les zones humides ou des animaux urinent fréquemment. C'est le mode indirect qui est le plus souvent à l'origine des transmissions humaines. (Fig 3)

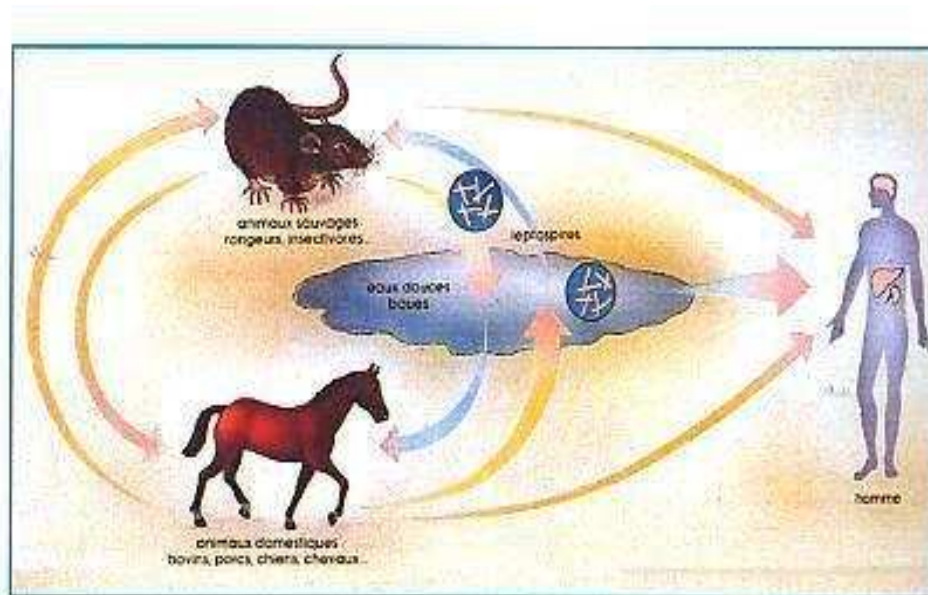


Figure 3 : Cycle des différents modes de contaminations par les leptospires chez l'homme et les animaux .

Parfois, une espèce sauvage présente peu d'opportunités de contact avec les humains, mais des animaux domestiques peuvent servir de relais efficaces. Chez les mammifères sauvages, les rongeurs (rats, souris, campagnols, etc.), insectivores (hérissons, mus araignes), mais aussi les chauve-souris, et plus rarement, les carnivores, sont impliqués. Parmi les espèces domestiques, équins, bovins, mais aussi ovins, et caprins pour les animaux de rente, et canidés pour les animaux familiers, jouent le plus grand rôle. [15]

II.6. Physio pathologie [19]

La voie de pénétration des leptospires dans l'organisme hôte est constituée soit par les muqueuses soit par les effractions cutanées.

Ceci suppose des mécanismes de chimiotaxie, d'adhésion et de passage transmembranaires. Les bactéries doivent ensuite nécessairement gagner le compartiment vasculaire (septicémie obligatoire) afin d'être éliminées par le système urinaire qui constitue la voie de sortie.

Leurs mobilités les aident probablement à accomplir ce parcours, mais, à nouveau, ils doivent franchir des barrières tout en échappant aux systèmes défensifs très efficace dans les tissus, mais aussi dans le sang où les leptospires persistent pendant près d'une semaine.

La physiopathologie de la leptospirose est résumée en deux phases :

La première phase est liée au passage transcutané des leptospires à travers la muqueuse, et gagnent la circulation sanguine ou lymphatique. Les leptospires pathogènes échappent à la phagocytose et se multiplient dans le sang et les tissus hôtes.

La deuxième phase, il apparaît dans le sang des anticorps de type IgM dès le 8^{ème} jour.

Les leptospires pathogènes peuvent échapper à la lyse par le système anticorps complément.

La capacité de pénétration intracellulaire des leptospires pathogènes notamment du sérotype *Leptospira icterohaemorrhagiae* est actuellement prouvée, bien que les leptospires aient été longtemps considérés comme des bactéries extracellulaires strictes. [19]

II.7. Clinique [19]

La clinique de la leptospirose représentée par sa forme la plus classique est l'ictère fébrile à rechute.

Cette forme classique est constituée de trois (03) phases : (Fig 4)

A/. Phase d'incubation

Cette phase est silencieuse, elle dure généralement 5 à 14 jours, mais elle peut varier d'une personne à une autre, on a noté des extrêmes de temps d'incubation allant de 2 à 30 jours.

B/. Phase pré -ictérique

C'est la période d'invasion ou leptospirémique. Un début brutal dure de 3 à 5 jours avec présence de leptospires dans le sang et le LCR et caractérisé par de la fièvre à 39°C et plus, des frissons, des céphalées, des myalgies (mollets et cuisses). Cette période réalise un syndrome grippal plus ou moins sévère.

On peut observer dans cette période, une hémorragie entre le troisième et le quatrième jour, un herpès, une éruption, ou encore un syndrome méningé.

C/. Phase ictérique

C'est la période d'état ou immune. Le syndrome infectieux persiste mais s'atténue. Les manifestations viscérales sont plus ou moins sévères avec différentes atteintes il s'agit de :

***Atteinte hépatique** : avec ictère de coloration orangée, dit flamboyant, apparaissant entre le quatrième et le sixième jour,

***Atteinte rénale** : expliquant une insuffisance rénale,

***Atteinte neuroméningée** : qui se manifeste généralement par un trouble de la conscience,

***Atteinte pulmonaire** : exprimée par une toux, une dyspnée, nécessitant la plus part du temps une radiographie du thorax,

***Syndrome hémorragique** généralement discret : épistaxis, quelques pétéchies.

Cette phase ictérique, qui apparaît au quatrième jour en moyenne a une durée moyenne de 5 jours.

Le dixième jour est marqué par le début de la phase d'apyrexie ou phase intermédiaire qui se manifeste par la chute de la température et la régression de l'ictère et des signes neurologiques.

La recrudescence fébrile apparaît au 15^e jour puis elle disparaît au 20^e jour laissant la place à la crise urinaire.

La convalescence de la maladie est longue, marquée par une asthénie prolongée, mais la guérison survient sans séquelles.

Au total, la maladie évolue classiquement en quatre phases d'environ 5 jours chacune. (Fig 4)

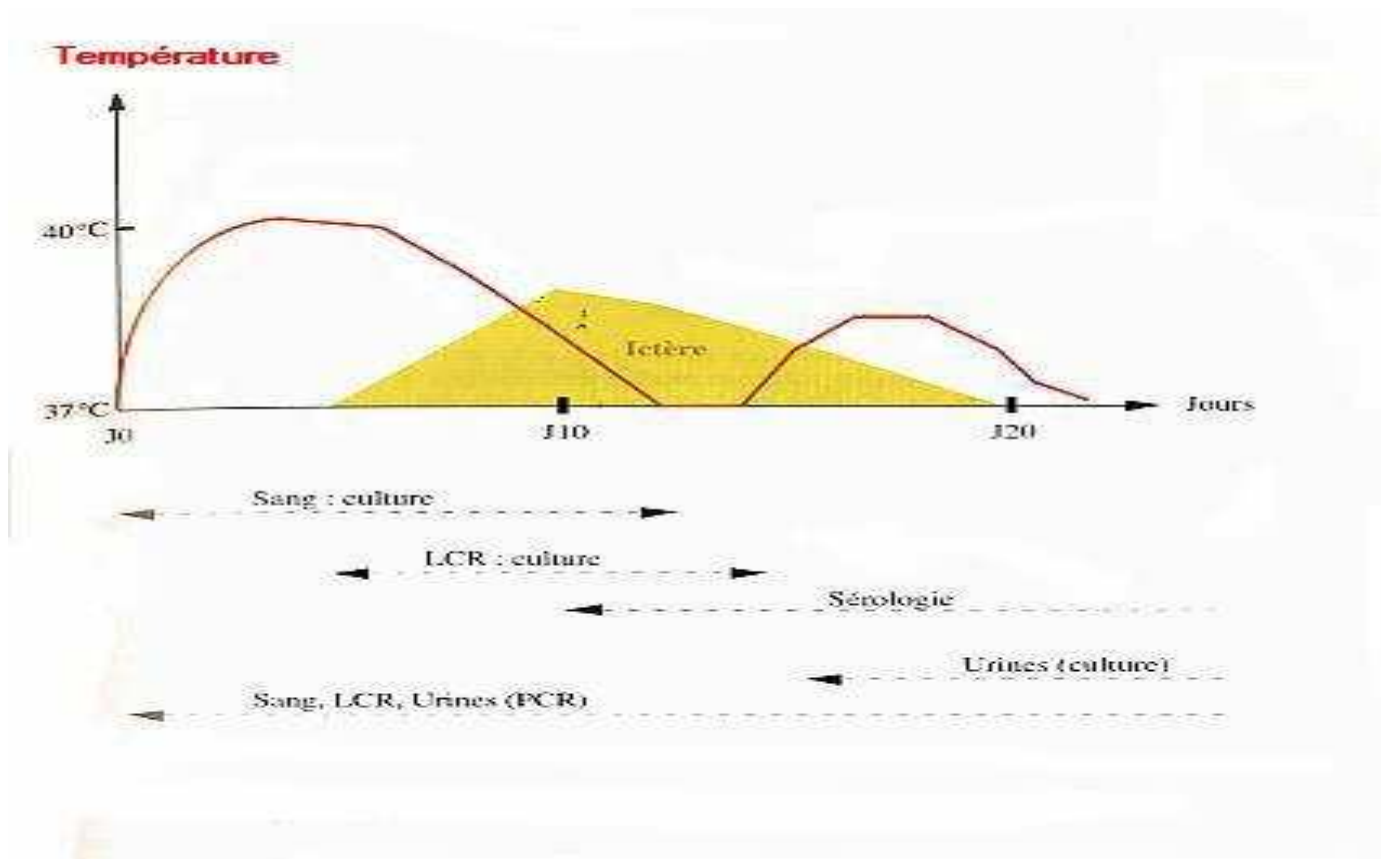


Figure 4 : Chronologie des prélèvements à réaliser pour le diagnostic de la leptospirose

II.8. Le diagnostic [19]

Le diagnostic de la leptospirose peut être clinique ou biologique.

II.8.1. Diagnostic clinique [19]

Etant donné l'extrême polymorphisme de la maladie, de la fièvre pseudo-grippale à l'hépatonéphrite, de nombreuses affections peuvent réaliser des tableaux cliniques proches.

Il s'agit de :

- hépatite virale,
- paludisme,
- dengue, chikungunya, etc.

II.8.2. Diagnostic biologique [19]

Le diagnostic renferme le diagnostic spécifique et le diagnostic non spécifique.

II.8.2.1. Diagnostic non spécifique [19]

Il s'agit des différentes analyses effectuées au laboratoire des centres hospitaliers sur le sang, les urines et le liquide céphalorachidien (LCR) du malade. Les résultats de ces analyses permettent une orientation subjective vers la leptospirose.

Cependant les éléments qui peuvent attirer l'attention sont :Thrombopénie, CPK augmentées contrastants avec des transaminases peu élevées, auxquelles s'ajoutent de façon rare une élévation des Triglycérides et abaissement des HDL cholestérol . Ces 2 derniers points reflètent l'interaction des leptospires avec le métabolisme des lipides.

II.8.2.2 Diagnostic spécifique

Ce diagnostic biologique est réalisé avec des tests de référence peu disponibles dans les laboratoires.

En Algérie, seul l'Institut Pasteur qui réalise de test sérologique de référence : Test de Micro agglutination communément appelé réaction de *Martin* et *Petit*.

Le diagnostic spécifique regroupe trois (03) diagnostics différents :

A/. Diagnostic bactériologique

L'examen direct au microscope à fond noir, réalisé sur le sang, le LCR ou encore les urines, permet d'observer la présence de fins spirochètes.

La culture du sang ou le LCR sur le milieu spécifique EMJH (Ellinghausen, Mc Cullough, Jonhson et Harris), est lente et difficile puisque le délai d'observation est de deux mois avant de conclure à la négativité de la culture.

Compte tenu de la difficulté du diagnostic bactériologique par isolement et identification du germe, le diagnostic de la leptospirose est assuré essentiellement par la sérologie.

B/. Diagnostic sérologique

Ce diagnostic est réalisé à partir du 6^e jour par différents tests :

-Test de dépistage appelé encore test de macroagglutination sur lame avec l'antigène thermorésistant dit « TR » (test de dépistage).

-Test de confirmation ou test de micro-agglutination (MAT) appelée encore réaction de Martin et Petit : ce test est utilisé pour les sérums positifs ou douteux

au « TR », avec une gamme d'antigènes, pour la détermination du (des) sérotype (s) en cause, lorsque le seuil de positivité est supérieure ou égale à 1/100. (voir matériel et méthodes)

D'autres examens sérologiques utilisent pour le dépistage de la maladie il s'agit de :

- Technique ELISA utilise *L.biflexa* souche Patoc non pathogène
- Test de Lepto-dipstick, un test rapide sur bandellettes où sont fixées les antigènes *L biflexa* permettant ainsi de capter les IgM anti-leptospires présents dans les sérums de patients. Les IgM sont ensuite mis en évidence par réaction colorée.

La sérologie des leptospiroses est d'interprétation difficile pour les raisons suivantes :

- la positivité des réactions est souvent tardive (15^e jour et plus), ceci est dû à l'antibiothérapie précoce,
- l'absence d'une évolution significative du taux d'anticorps,
- la sensibilité du test TR vis-à-vis de certains sérotype, et
- les phénomènes de co-agglutination.

C/. Amplification génique (PCR)

Cette amplification concerne le gène rrs codant l'ARN ribosomiale 16 S. Vu la longueur des délais des cultures et l'apparition tardive des anticorps spécifiques, l'intérêt de la PCR est évident ainsi que la RT-PCR. Elle permet un diagnostic direct en 48 heures sur le plasma, le LCR ou encore les urines dès l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie.

II.9. Traitement [19]

Le traitement symptomatique, notamment en terme de réanimation (respirateurs, dialyse ...), est très important.

Il est parfois écrit que les formes bénignes ne requièrent pas de traitement antibiotique. Cependant la possibilité de complication notamment oculaire paraît une indication formelle .

Penicilline G: 6 Million UI (2 Million UI x 3)/ 24 h par intraveineuse pendant 7 à 8 jours.

Ampicilline : 0,5 à 1g x 3 / jour.

Amoxicilline : 0,5 x 3 / jour.

Doxycycline 100 mg x 2 / jour pendant 7 jours

Dans des cas d'hyper-exposition de courte durée, une antibio-prophylaxie a pu être proposée à la dose hebdomadaire de 200 mg d'antibiotique.

Compte tenu de l'incubation courte, il semblerait préférable de doubler la prise et de distribuer la doxycycline bi-hebdomadairement (2X 200 mg).

L'antibiothérapie précoce réduit la durée et la sévérité des symptômes.

II.10. Prophylaxie [19]

Il faut éviter les zones humides polluées par les rongeurs, ainsi que les baignades en eaux douces méconnues.

La protection des personnes exposées (éboueurs, égoutiers) par des bottes, lunettes ou encore vaccin spécifiquement dirigé contre l'Icterohaemorrhagiae, est efficace mais peu utilisée par ces personnes.

Cependant, selon le service d'Epidémiologie Institut Pasteur Algérie, la vaccination contre la leptospirose est inexistante en Algérie.

III. MATERIEL ET METHODES [4]

A/-MATERIEL

Le matériel utilisé au cours de cette étude est constitué essentiellement de matériel biologique, de consommables ainsi que de certains appareillages.

-Matériel biologique

Nous avons utilisé 290 sérums de malades provenant de différents secteurs sanitaires et CHU.

Alors que pour l'étude épidémiologique le nombre de prélèvements est limité à 100 sérums confirmés positifs.

Les sérums de malades sont titrés par les souches de leptospires de références contrôlées (appelées également antigènes vivants).

Une batterie de 16 souches de référence choisie et fournie par le CNRLIPP-France-permet l'identification du séro groupe en cause lors d'une infection à Leptospires.

Les souches sont repiquées en milieu EMJH tous les 07 jours.

Les principaux antigènes vivants utilisés en MAT sont indiqués dans la liste suivante :

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1- AUSTRALIS | 9- HEBDOMADIS |
| 2- AUTUMNALIS | 10- ICTEROHAEMORRHAGIAE |
| 3- BATAVIAE | 11- PANAMA |
| 4- CANICOLA | 12- SEMARANGA (Patoc) |
| 5- BALLUM | 13- POMONA |
| 6- CYNOPTERI | 14- PYROGENES |
| 7- GRIPPOTYPHOSA | 15- SEJROE (sejrœe) |
| 8- SEJROE (hadjobovis) | 16- TARASSOVI |

Autre matériel

- Centrifugeuse réfrigérée
- Bain –marie
- Spectrophotomètre
- Agitateur magnétique
- Microscope à fond noir
- pH-mètre
- Microplaques en plastique à 96 puits à fond plat.
- Microscope à fond noir.
- Tube à hémolyse 0,5 ml non stériles.
- Multipette plus EPPENDORF (micropipette à réservoir), Peptus*
- Combitips* 2,5 ml non stériles.
- Pipettes jetables 1 ml .
- Cônes jaunes et cônes bleus.
- Micropipettes 200 ml, et 1000 ml.
- Pipette multicanaux.
- Filtres à usage unique, adaptable à une seringue de 2 ml, de porosité 0,45 µm et\ou 0,22 µm.
- Système de filtration NALGENE relié à une pompe à vide.
- Seringue jetable 2 ml.
- Seringue Cornewell 10 ml stérile.
- Etuves 28°C et 37°C.
- Hotte à flux laminaire.
- Anse de platine.
- Lame en verre de qualité supérieure.

B/-REACTIFS

- 1- Immunsérums de lapin.
- 2- Eau physiologique tamponnée, pH = 7,6
- 3- Eau bidistillée stérile.
- 4- Milieu EMJH (**E**llinghausen-**M**ccullough modifié par **J**ohson et **H**arris).
- 5-Formol 37% (Merck)
- 6-Tampon PBS 1X (voir en annexe)
- 7-Sérum de lapin
- 8-Merthiolate 20% Sigma (voir en annexe)

1/. Immunsérums de lapin :

Les immunsérums de référence sont produits par les centres de référence, selon les méthodes recommandées par le sous-comité de taxonomie, et permettent de vérifier l'identité d'un séro groupe connue.

Au cours de notre étude, nous avons bénéficié de ces immunsérums de référence par un don du Centre National de Recherches des Leptospires de l'Institut Pasteur de Paris (CNRLIPP)-France-

2/. Eau physiologique tamponnée pH = 7,6

Elle est composée de tampon Sørensen et d'eau physiologique à 0,85 % (voir annexe).

3/. Eau bidistillé stérile.

Cette eau est obtenue par un distillateur Millipore et doit être stérilisée à 120°C pendant 20 minutes.

4/. Milieu EMJH [1]

C'est le milieu de Ellinghausen – Mc Cullough modifié par Johnson et Harris (EMJH) qui est le plus utilisé pour l'isolement et l'entretien de leptospires.

C/-METHODES

a/-Préparation du milieu EMJH

Il est composé d'un supplément albumineux et d'une base (commercialisée par DIFCO –France-), mélangée dans un rapport de 1 sur 9.

1-Préparation du supplément albumineux [2]

La préparation du supplément albumineux nécessite d'abord la préparation des solutions stock donné par le tableau 1

Tableau 1 : Préparation des solutions stocks

Composition des solutions-stocks en grammes pour 100 ml d'eau distillée		Volume de solution-stock en ml pour 100 ml de supplément
Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,4	1
Mg Cl ₂ , 6H ₂ O	1,5	1
Ca Cl ₂ , 2H ₂ O	1,5	1
Pyruvate de sodium	10	1
Glycérol	prêt à l'emploi	2
Tween 80	prêt à l'emploi	12,5
Vitamine B ₁₂	0,02	1

Préparer chacune des solutions-stocks ci-dessus pour 100 ml d'eau distillée, autoclaver à 110°C pendant 20 minutes.

Il est à noter que la solution de la vitamine B₁₂ doit être stérilisé par filtration en utilisant des filtres de porosité 0,22 µm.

2-Préparation de 100 ml de supplément albumineux pour l'EMJH

L'albumine bovine est très longue à dissoudre, il est donc préférable de commencer par mettre 50 ml d'eau bidistillée stérile avec les 10 g d'albumine bovine (BSA) dans un bêcher. Pour accélérer la dissolution, il est possible d'augmenter la température à 37°C pendant environ une heure, dans le but d'éviter la mousse.

Une fois la BSA dissoute, ajouter les solutions stocks comme indiqués dans le tableau ci dessus.

Pour le glycérol et le Tween 80 qui sont liquides et visqueux, il est nécessaire de les peser dans un becher. Le reliquat est récupéré par deux lavages successifs avec l'eau bidistillée.

Préparer extemporanément 10 ml d'une solution de F_eSO_4 , à 0,5 % et l'ajouter au supplément puis compléter le volume à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

Enfin ajuster le pH à 7,4 (NaOH 10 N), et conserver le supplément au congélateur à $-20^{\circ}C$

3-Préparation proprement dite du milieu EMJH

Dissoudre 2,3 g de base dans 900 ml d'eau bidistillée stérile puis ajouter 100 ml de supplément albumineux (préparer au préalable) et ajuster enfin le pH à 7,5 .

Le milieu ainsi obtenu est filtré à $0,22 \mu m$ grâce au système de filtration NALGENE, puis repartit en tubes à vis sous un volume de 9 ml.

Notons cependant qu'il est impératif de rincer le matériel, avant son utilisation, avec de l'eau bidistillée stérile, afin d'éliminer les traces de détergents pouvant gêner la croissance des leptospires.

Contrôle du milieu EMJH [3]

Une fois le milieu préparé, il subit 3 contrôles successifs avant de pouvoir l'utiliser au laboratoire :

a- Contrôle du pH

Le pH du milieu doit être ajusté à la valeur de 7,5. Selon le CNRLIPP un pH compris entre 7,3 et 7,7 est acceptable, puisque cette fourchette optimise la croissance des leptospires.

b- Contrôle de stérilité

Le contrôle de stérilité consiste à vérifier l'absence de contamination qui pourrait se développer à la température de 37°C pendant 48 heures, et aussi l'absence de leptospires aquicoles qui pourraient se développer à 28° C pour une durée de 2 mois.

c- Contrôle de fertilité :

Après le test de stérilité à 37°C, 6 tubes de milieu EMJH (9ml) sont ensemencés chacun avec 0,1 ml des souches suivantes (souches de référence utilisées pour le diagnostic sérologique de la leptospirose), il s'agit de :

- 1- Ballum**
- 2- Canicola**
- 3- Icterohaemorrhagiae**
- 4- Sejrøe (hardjobovis)**
- 5- Hebdomadis**
- 6- Sejrøe (sejrøe)**

Les six (06) tubes sont incubés à la température de 28°C pendant 7 jours puis des observations hebdomadaires à l'aide du microscope à fond noir, permettent d'évaluer la culture et l'absence de contamination.(Fig 7)

L'observation se fait en trois temps différents pour chacune des souches :

J 1 : premier jour

J 7 : septième jour d'incubation

J 21 : après vingt et un jour d'incubation

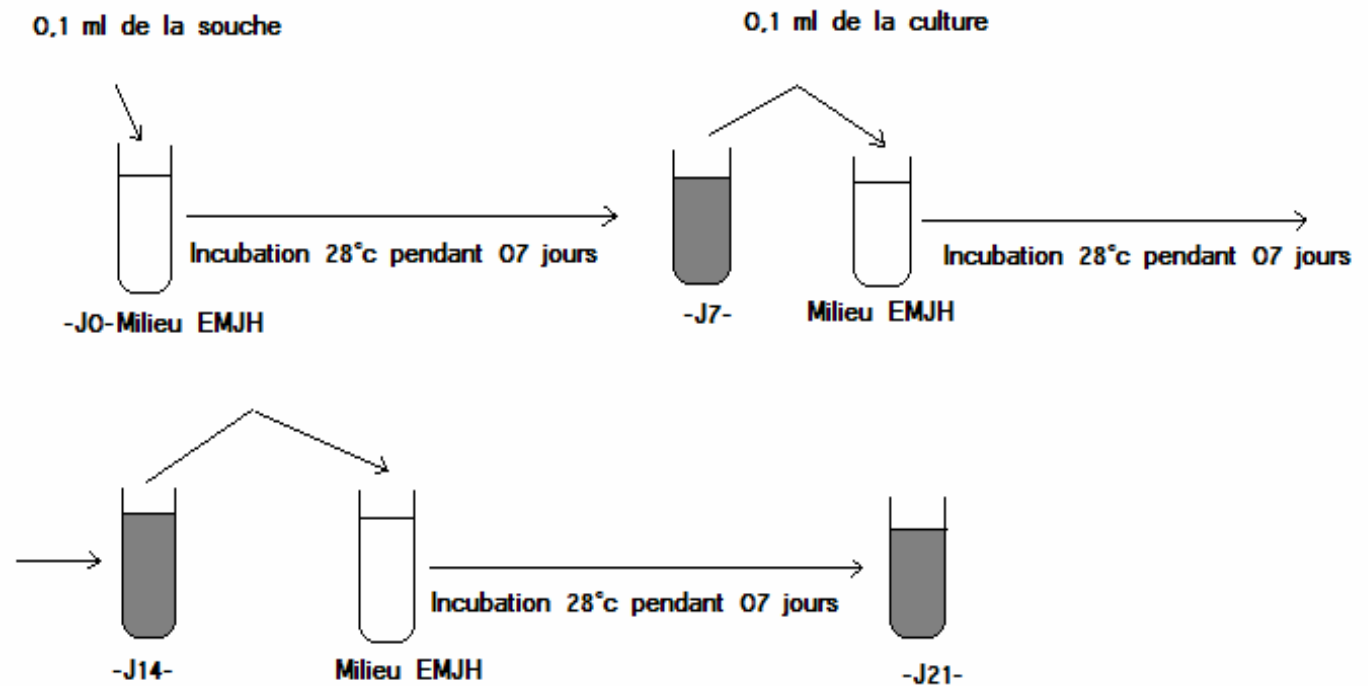


Figure 6 : Schéma récapitulatif du contrôle de fertilité d'une souche

J 0 : Observation au microscope pour évaluer la culture et l'absence de contamination au premier jour.

J 7 : Observation au microscope pour évaluer la culture et l'absence de contamination au septième jour.

J 21 : Observation au microscope pour évaluer la culture et l'absence de contamination après 21 jours.

B /- Test de Macro agglutination sur lame à l'antigène Thermo-Résistant

C'est une réaction d'agglutination macroscopique sur lame, qui utilise un antigène thermorésistant (TR), actuellement fabriqué et commercialisé par une firme étrangère Biorad* (France). [1]

La réalisation du test est relativement simple puisque il s'agit de déposer 35 µl de sérum pur à tester avec 35 µl de réactif antigène thermorésistant sur une lame propre puis mélanger soigneusement le sérum et l'antigène en animant la lame d'un mouvement de rotation pendant quatre minutes. (voir figure 5)

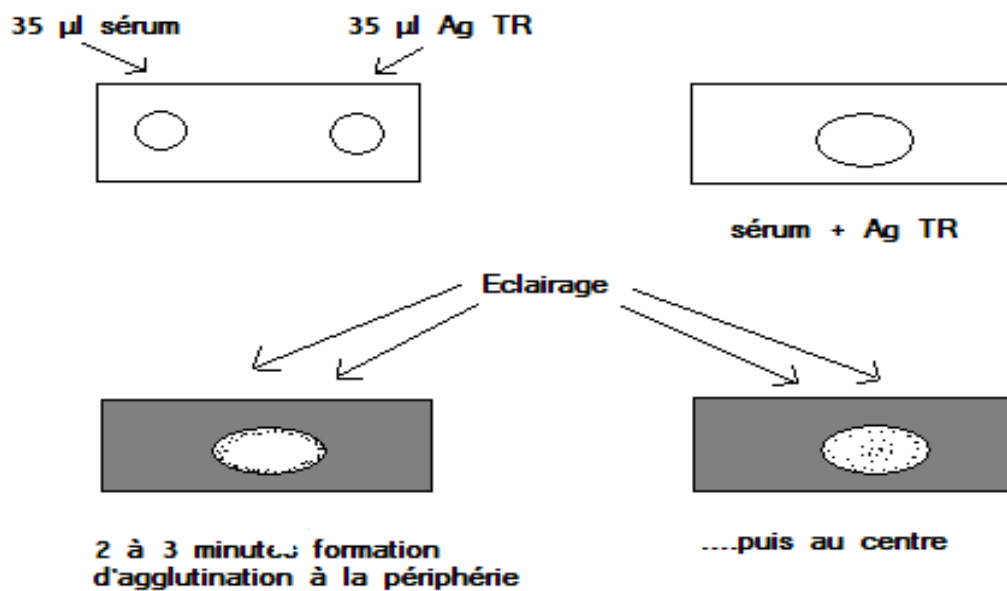


Figure 5 : Schéma récapitulatif du test de macroagglutination sur lame

La lecture se fait sur un fond noir avec un éclairage au-dessus ou on voit apparaître, lorsque la réaction est positive, de fines agglutinas d'abord à la périphérie puis au centre de la lame.

Notons que le délai de lecture est maximum de 4 minutes et que toute réaction dépassant ce délai est considérée comme non spécifique.(Fig 6)

C/- Test de microagglutination (MAT)

Il consiste à homogénéiser le sérum à tester avec une culture de leptospires, puis à évaluer au microscope à fond noir le degré d'agglutination.

Ce test se réalise en 2 temps :

Le MAT qualitatif, permet de déterminer le ou les antigènes, qui agglutinent avec les anticorps présents dans le sérum du malade.

Le MAT quantitatif, détermine le titre du sérum en présence de l'antigène ayant donné une réaction positive en MAT qualitatif.

a/. MAT qualitatif :

Sur une microplaque à fond plat, distribuer 25 µl d'eau physiologique tamponnée dans la première rangée, c'est le témoin antigène.

Repartir ensuite 25 µl de sérum à tester préalablement décomplementé au bain marie à 56° C pendant une demi heure, et dilué au 1/25 avec l'eau physiologique tamponnée.

Ajouter enfin en colonne 25 µl de chaque antigène dont la densité au microscope à fond noir est évaluée à deux croix (l'évaluation de la densité optique est de 1 à 4 croix).

Puis recouvrir la microplaque et l'incuber à 37° C pendant une heure à l'obscurité.

Lecture

Evaluer le degré d'agglutination et/ou lyse par estimation de la concentration des bactéries libres par rapport au témoin antigène :

Lorsque la quantité de leptospires libres est comprise entre 50% et 100% : la réaction est négative

Et lorsque celle-ci est inférieure ou égale à 50% : la réaction est positive

Par ce test, on détermine donc, la présence ou l'absence de l'agglutination avec un ou plusieurs sérogroupes.

Lorsque la réaction est positive, on réalise un MAT quantitatif afin de déterminer le titre du sérum vis à vis de chacun des antigènes concernés.

Le schéma suivant résume le MAT qualitatif sur microplaque.

MAT QUALITATIF

SEROGROUPES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Témoins antigène	25µl AG1 ○	25µl AG2 ○	25µl AG3 ○	25µl AG4 ○	25µl AG5 ○	25µl AG6 ○	25µl AG7 ○	25µl AG8 ○	25µl AG9 ○	25µl AG10 ○	25µl AG11 ○	25µl AG12 ○	25µl AG13 ○	25µl AG14 ○	25µl AG15 ○	25µl AG16 ○
	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT
Sérum 1	○	○	○	●	○	○	○	○	○	●	○	●	○	○	○	○
	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1
Sérum 2	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○
	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S1	25µl S2	25µl S2
Sérum 3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3
Sérum 4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4
Sérum x	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx

○ Absence d'agglutination

● Présence d'agglutination

Figure 7 : Schéma récapitulatif du MAT qualitatif

b/. MAT quantitatif :

C'est le même principe que le MAT qualitatif sauf que le sérum à tester déjà dilué au 1/25, subit d'autres dilutions de demi en demi sur la même rangée, et on ajoute à la fin, la même quantité d'antigène ayant donné une réaction positive au MAT qualitatif.

La microplaque est incubée à 37° C pendant 1 heure et la lecture s'effectue de la même manière que le MAT qualitatif :

La dilution maximale donnant une concentration de leptospires libres diminuée de 50%, détermine le titre du sérum avec un seuil positivité de 1/100.

Le schéma suivant résume le MAT quantitatif sur microplaque. (Fig 8)

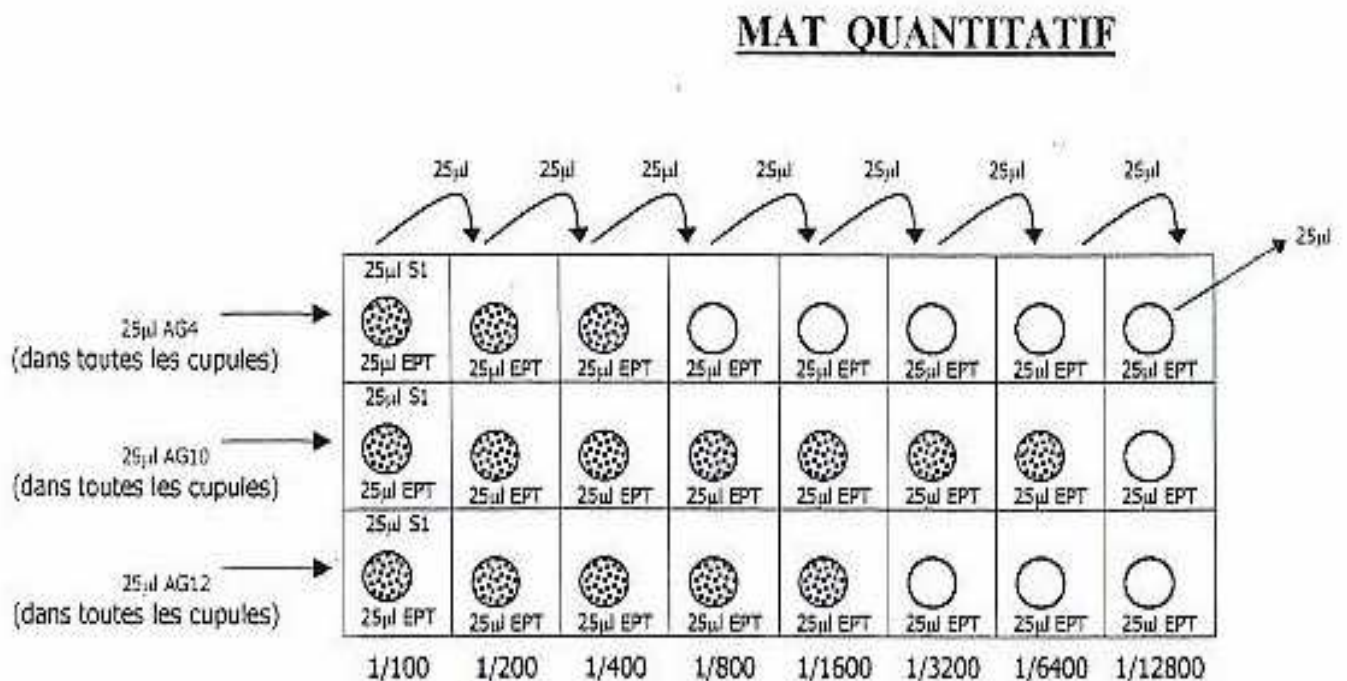


Figure 8 : Schéma récapitulatif du MAT quantitatif

Interprétation :

Le MAT se positive généralement 10 à 12 jours après l'apparition des premiers signes cliniques.

Le seuil de positivité de la réaction a été fixé au 1/100 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

D/-Préparation de l'antigène Thermo-Résistant

1/-Préparation de la culture *L. biflexa* Patoc I [5]

- Prévoir 10 ml de culture *Leptospira biflexa*
- Vérifier l'identité de *L. biflexa* Patoc I avec le sérum homologue. (voir le MAT)
- Ensemencer 1 litre d'EMJH avec 10 ml de sub-culture de la souche saprophyte aquicole *Leptospira biflexa* Patoc I (le volume de l'ergène doit être de 2 litres afin d'assurer une meilleure aération de la culture) puis incuber cette préparation à 28°C et à l'obscurité, éventuellement sur agitation orbitale, pendant 4 à 7 jours afin d'obtenir une culture correspondant à une densité de + 4 au microscope à fond noir.

Notons cependant qu'une densité bactérienne + 4 au microscope à fond noir correspond à la superposition de deux champs pleins de leptospires.

2/- Traitement de la culture par le formol (Formaldéhyde) [8]

Le formol est un puissant antiseptique même à de faible dose (1/12000), son mécanisme d'action se fait par alkylation des protéines dont il provoque la dénaturation.

La culture est formolée avec 2 ml de solution formaldéhyde à 37% puis laissée à température ambiante durant une période de 4 à 24 heures.

La concentration finale du formaldéhyde étant de $74 \cdot 10^{-3} \%$. [9]

Le but de ce traitement est d'éviter le risque de contamination de la culture d'une part, et d'assurer, d'autre part, une meilleure conservation de l'antigène.

3/-Centrifugation de la culture

La vitesse de centrifugation préconisée dans le protocole de l'IPP-CNR des leptospires, étant de 17000 g soit 15500 tr/min, pendant 1 heure.

Cette vitesse n'a pas été respectée puisque les pots carboxylés de centrifugation sont systématiquement détruits.

De ce fait nous avons diminué graduellement en palier la vitesse de centrifugation pour arriver à une vitesse, qui permet d'obtenir un culot visible sans détruire les pots.

4/- Lavage du culot [5]

- Après la première centrifugation, décanter et laver le culot obtenu dans chaque pot, avec environ 200 ml de tampon PBS 1X.

La centrifugation se fait toujours à froid (+4°C) à 5000 tr/min pendant 20 minutes.

- Refaire la même opération, en lavant le culot avec 200 ml de tampon PBS 1X.

- Enfin reprendre le culot obtenu avec environ 10 ml de PBS et homogénéiser parfaitement par rotation manuelle du flacon ; puis ajouter 20 à 30 ml de PBS et conserver cet antigène concentré 3 semaines à +4°C dans un flacon en verre. (Figure 10)

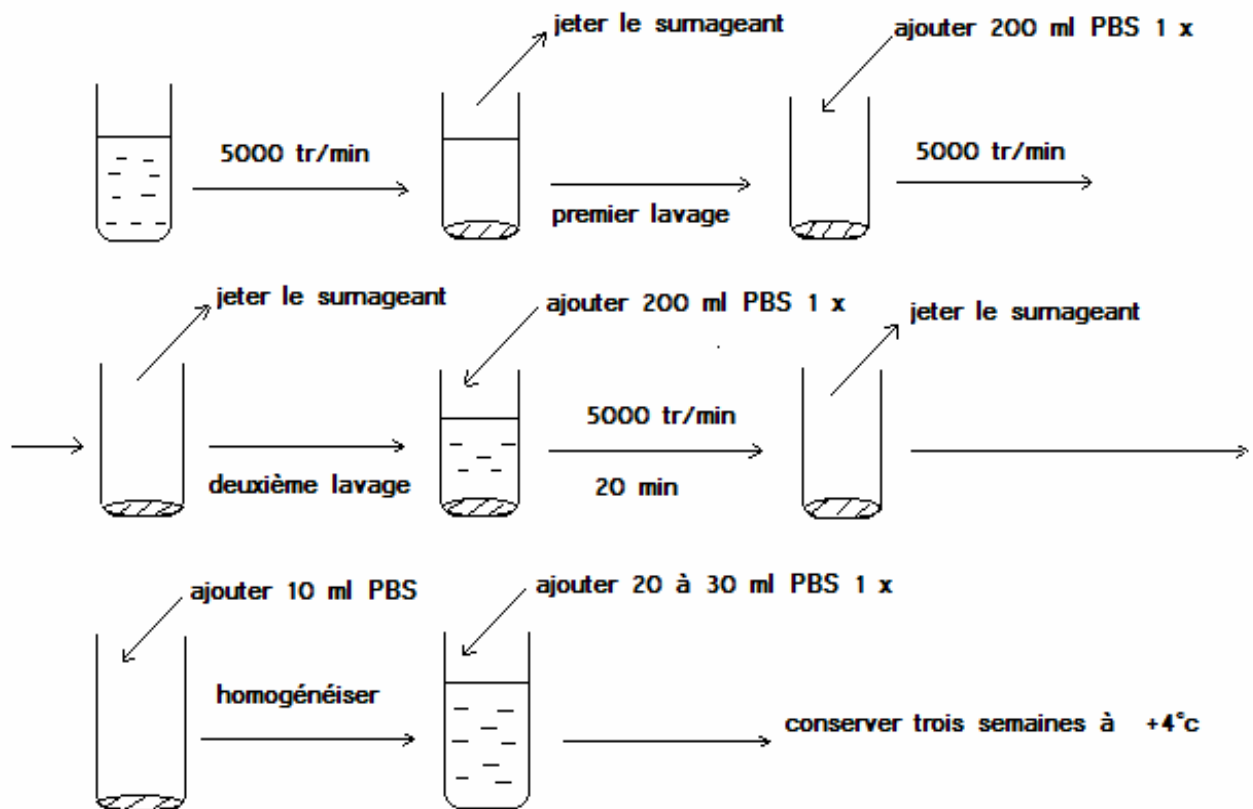


Figure10 : Schéma récapitulatif de l'étape de centrifugation

5/- Traitement thermique de la suspension d'antigène TR [5]

Après le délai de trois semaines à +4°C, la suspension d'antigène est chauffée au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes en agitant fréquemment.

Cette étape a pour but :

- Eliminer les débris protéiniques inutiles et qui peuvent influencer sur la réaction de macro agglutination à l'antigène TR.
- Concentrer au maximum la suspension antigénique pour pouvoir réaliser des dilutions par la suite.

L'antigène ainsi concentré est stocké à +4° C et, selon les besoins du laboratoire, on dilue extemporanément environ 200 ml de cet antigène.

6/- Mesure de la densité optique au spectrophotomètre [5]

L'antigène est standardisé par des dilutions successives avec du tampon PBS 1 X afin d'ajuster sa concentration à une densité optique (DO) de 0,235 en absorbance, et à la longueur d'onde de 620 nm.

Il est à noter que la dilution de l'antigène concentré se fait toujours dans la cuve du spectrophotomètre.

7/- Etape finale du réactif antigène TR

Une fois la densité optique est ajustée, on additionne à l'antigène, du sérum de lapin stérile à la concentration finale de 1 à 3% et du merthiolate, comme conservateur, à la concentration finale de 0,12%. [5]

Rappelons que ce produit est très toxique par inhalation, par contact avec la peau et/ou par ingestion.

Donc la pesée et la dilution du Merthiolate nécessitent une hotte chimique.

Le produit se présente sous forme de poudre légèrement beige.

La solution une fois préparée doit être filtrée sous hotte et conservée à + 4°C, et à l'abri de la lumière.

Contrôle de qualité de l'antigène TR produit : [5]

Le contrôle effectué pour tester l'antigène TR est validé par le test de macroagglutination décrit au préalable.

A. Réactions :

Il faut tester en parallèle le lot d'antigène à valider et l'antigène TR produit par Biorad* en appliquant le test de macroagglutination décrit au préalable.

Pour cela on utilise environ 20 sérums de patients ayant une sérologie de leptospirose négative (TR Biorad* négative, MAT négative) et au minimum 10 sérums de patients ayant une sérologie positive (TR Biorad* positive, MAT positive).

Il faut réaliser en même temps deux réactions avec l'eau physiologique tamponnée (Témoins négatifs) et deux réactions avec le sérum témoins positif (fourni avec l'antigène TR Biorad*).

B. Interprétation :

L'interprétation des résultats obtenus avec l'antigène produit par rapport à l'antigène TR Biorad* regroupe trois cas de figure :

1^{er} cas : Les résultats obtenus sont concordants avec l'antigène TR Biorad, les résultats sont satisfaisants, le nouvel antigène TR IPA peut être mis en service.

2^e cas : De fausses réactions positives sont décelées avec les sérums négatifs ou il y a une auto-agglutination de l'antigène. Dans ce cas, ajoutez 1% de sérum de lapin, et laissez stabiliser 48h à température ambiante pour effectuer à nouveau la procédure de contrôle.

Si les faux positifs persistent, le lot est éliminé.

3^e cas : Les réactions effectuées avec les sérums positifs ne donnent pas lieu à une agglutination, le lot est éliminé.

C. Conservation :


- L'antigène concentré (avant la mesure de la densité optique) se conserve 03 ans à +4°C.
- L'antigène dilué (après la mesure de la densité optique) se conserve 01 an à +4°C.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

A/-Optimisation de la vitesse de centrifugation

Les vitesses de centrifugation testées arbitrairement sont représentées dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Conversion de la force centrifuge en vitesse de centrifugation



Force centrifuge relative (FCR) en g m/s²	Vitesse de centrifugation tours/min	Observation de l'éclat des pots
17000	15500	détruits
14000	13000	détruits
11000	11000	fissurés
8000	10000	déformés
2000	5000	intactes

La force centrifuge relative (FCR) ou accélération centrifuge en g en un point à centrifuger est en fonction de la vitesse en tours/minutes du rotor et de la distance en mm entre l'axe du rotor et le point considéré selon la formule 1 :

$$FCR = 11,18 \cdot 10^{-7} \cdot r \cdot v^2 \quad (\text{formule 1})$$

avec : r = distance en mm entre l'axe du rotor et le point considéré (rayon).
 v = vitesse de rotation en tours/min.

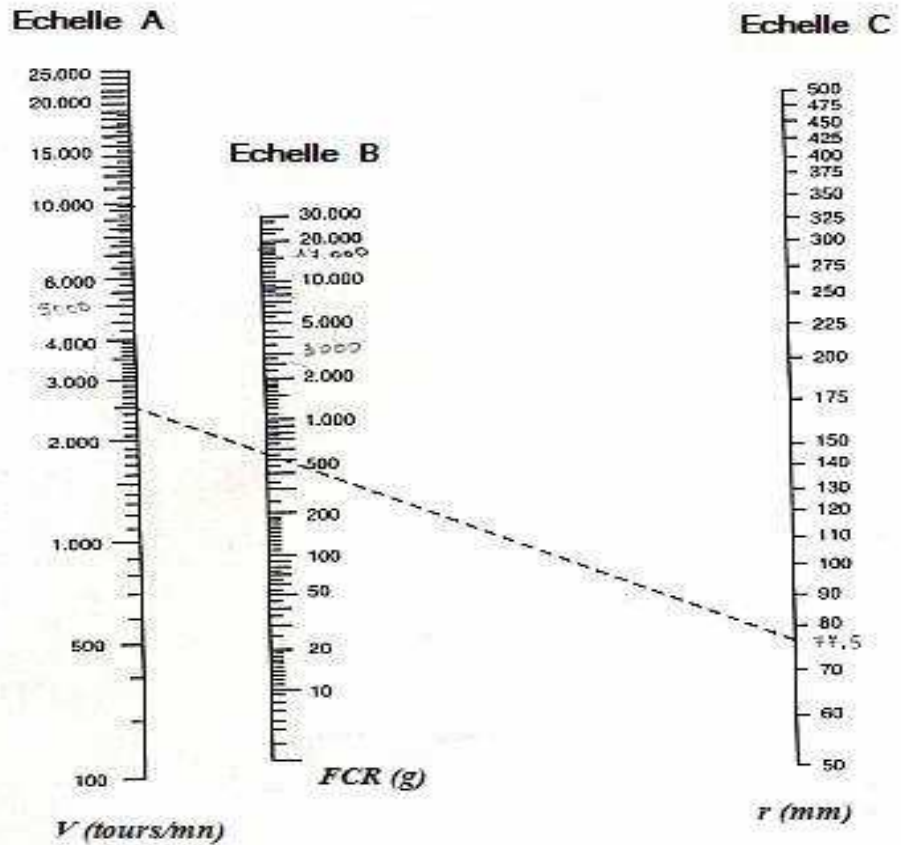


Figure 9 : Tableau de conversion tours/min en G

Ce tableau permet de connaître rapidement la force centrifuge relative (FCR) sans calcul.

Pour connaître la force centrifuge relative (FCR), porter la vitesse de rotation sur l'échelle A, la distance entre l'axe du rotor et le point considéré ($r = 77,5$ mm) sur l'échelle C et relier ces deux points entre eux pour lire sur l'échelle B, la valeur de la FCR ($g = 9,8 \text{ m/s}^2$).

Nous concluons que la vitesse de centrifugation sélectionnée est de 2000 g.

B/- Production de l'antigène TR

1. Etude comparative de l'antigène TR produit avec l'antigène TR importé

Le test de macro-agglutination à l'antigène TR est l'un des premiers tests proposés pour le dépistage sérologique de la leptospirose. Il est simple et très rapide à mettre en œuvre.

Toute fois il ne peut être utilisé comme test unique, tous les sérums positifs à la réaction de macro-agglutination doivent être confirmés par le test de micro-agglutination MAT (technique de référence par excellence).

Le tableau suivant représente le pourcentage des sérums positifs en fonction du temps.

L'agglutination est exprimée arbitrairement en 1+, 2+, 3+ et 4+

On note 6 % de sérums positifs au sérotype Grippotyphosa et 94 % de sérums positifs aux autres sérotypes identifiés avec un temps d'apparition des agglutinas plus allongée allant de 3 à 4 minutes pour le sérotype Grippotyphosa.

Tableau 3 : Variation du degré d'agglutination des deux antigènes testés sur 100 sérums en fonction du temps.

Temps min	1 min	2 min	3 min	4 min
Réactif				
Antigène Biorad *	6 % - 94 % +	6 % - 94 % ++	6 % - 94 % +++	6 % + 94 % +++
Antigène produit	6 % - 94 % ++	6 % - 94 % +++	6 % + 94 % ++++	6 % + 94 % ++++

Le graphe suivant représente la variation du degré d'agglutination en fonction du temps pour les deux réactifs :

* Antigène Biorad *

* Antigène IPA

Cette variation concerne deux entités différentes pour chacun des réactifs à tester.

Il s'agit du :

- pourcentage de sérums positifs confirmés avec le sérotype Grippotyphosa (6 %).

- pourcentage de sérums positifs confirmés avec les autres sérotypes (94 %).

On remarque une similitude des graphes concernant les deux réactifs pour un même pourcentage.

Notons, cependant qu'une meilleure qualité d'agglutination (agglutinas plus visible) est observée en un temps plus court pour l'antigène IPA par rapport à l'antigène Biorad. (Fig 11)

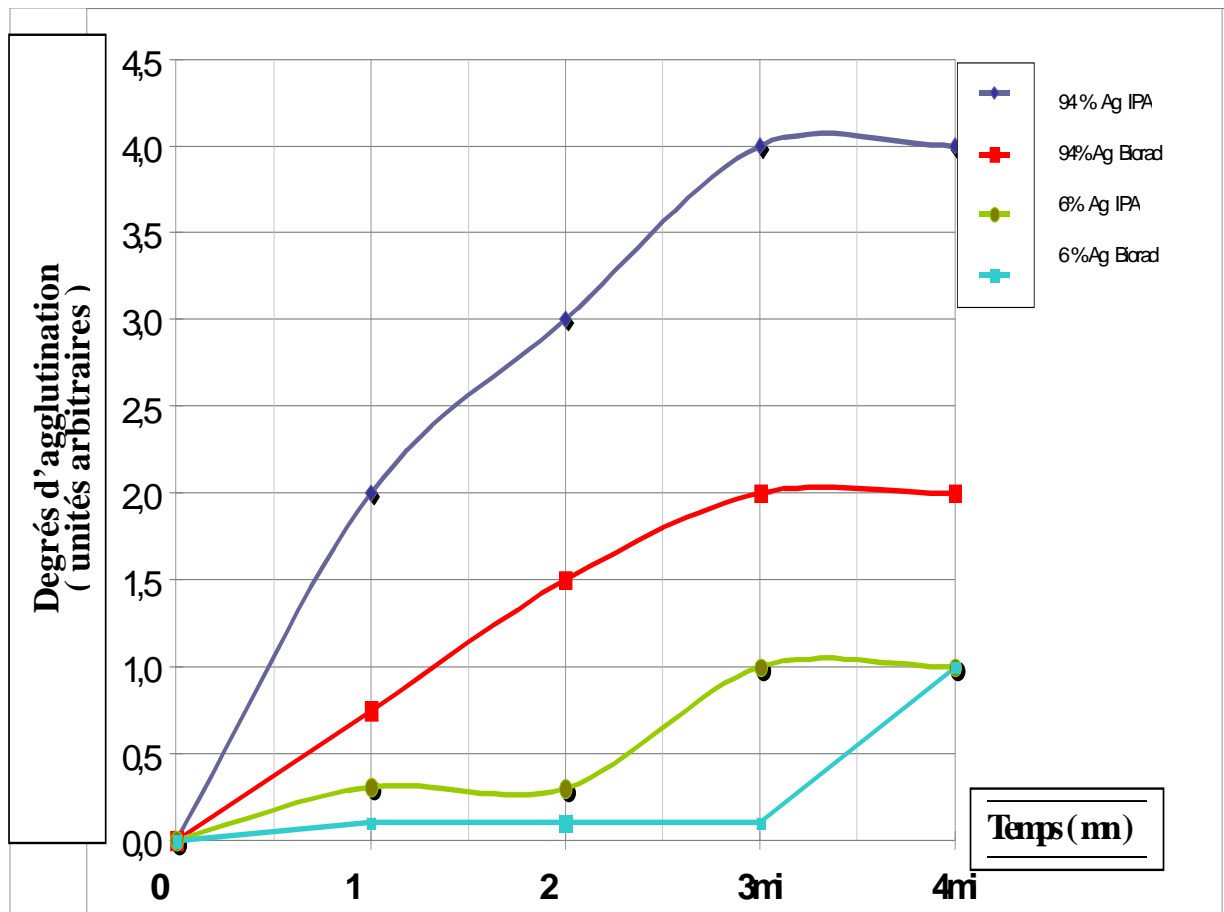


Figure 11 : Variation du degré d'agglutination des deux antigènes testés sur 100 sérums en fonction du temps.

L'interprétation de ces résultats est probablement liée à la concentration du réactif. Pour cela, nous avons essayé d'approfondir cette étude afin de mieux comprendre la différence du temps d'apparition des premiers agglutinas, en mesurant la DO au spectrophotomètre. Celle-ci a révélé les résultats suivants :

DO_I Ag Biorad = 0,117

DO Ag produit = 0,234

Nous Concluons que la DO de l'antigène produit est 2 fois plus supérieure que celle de l'antigène Biorad. Ce qui laisse supposer qu'il est plus concentré.

Généralement les premiers agglutinas apparaissent avant la fin de la première minute (30 secondes environ). C'est le cas de 94 % des sérums positifs, alors que dans 6 % des cas, la période d'observation requiert quelques minutes (limite acceptée 4 minutes). [6]

C'est le cas du séroroupe Grippytyphosa identifié par la suite grâce à la technique de micro-agglutination sur plaque MAT. (voir tableau 4)

On constate que chez les patients infectés par le séroroupe Grippytyphosa, les titres obtenus sont faibles de l'ordre de 100 UI/ml d'ou l'explication la plus logique des résultats obtenus, concernant un faible degré d'agglutination pour un temps plus allongé variant de 2 à 3 minutes.

Ces résultats concordent parfaitement avec l'étude réalisée par MAILLOUX et al. (1978).

Pour conclure, l'antigène TR (Biorad, IPA) de la souche Patoc I est un facteur valable permettant une orientation préliminaire pour la détection de la leptospirose, indépendamment des sérogroupes infectants. [7]

2/- Comparaison du test de Micro agglutination avec le test de Macro agglutination sur lame étude sur 100 prélèvements positifs.

L'analyse des résultats démontre que sur 100 prélèvements positifs au test de macro agglutination, seuls 95% ont été confirmés par le test de micro agglutination (MAT).

On remarque que 5 cas sur 100 donnent un résultat positif au TR et négative au MAT puisque le titre obtenu est inférieur à la limite acceptée par l'OMS (1/100). Les résultats concordent avec les recherches effectuées par *Mailloux et Col.* [6] confirmant que le test de macroagglutination sur lame est capable de détecter les anticorps de leptospires précocement par rapport au test de référence le MAT.

Tableau 4: Résultats des deux techniques testées sur 100 sérums

Test de micro agglutination (Titre)	Nombre de sérums	Test de macro agglutination TR
Positive 1/100 – 1/400	76	Positive
Positive 1/800 – 1/1600	14	Positive
Positive > 1/1600	05	Positive
Négative < 1/100	05	Positive

Notons cependant que la demande de sérums tardifs concernant les 5 cas a permis de confirmer ultérieurement la réaction du MAT.

La cinétique de production d'anticorps obéit à la loi exponentielle en fonction du temps, mais peut être retardée par l'administration précoce des antibiotiques. [6]

3/- Evaluation du réactif TR pour le dépistage de la leptospirose en 2007

La sensibilité du réactif est définie comme étant la capacité du test à donner des résultats positifs avec les sérums réagissant à certains leptospires.

La spécificité définit la capacité du réactif d'indiquer des résultats négatifs avec les autres sérums qui n'ont réagi avec aucun leptospire (MAT négatif).

L'évaluation mathématique du réactif TR produit du point de vue sensibilité et spécificité est donnée par les formules (1 et 2): [10]

$$\text{Pourcentage de sensibilité : } \frac{a \times 100}{a + b} \quad (2)$$

$$\text{Pourcentage de spécificité : } \frac{d \times 100}{c + d} \quad (3)$$

avec:

- (a) : le nombre de sérums positifs au TR et au MAT
- (b) : le nombre de sérums négatifs au TR et positifs au MAT
- (c) : le nombre de sérums négatifs au TR et négatifs au MAT
- (d) : le nombre de sérums négatifs au TR et négatifs au MAT

L'application de la formule sur l'Antigène TR Biorad* et l'Antigène produit révèle les résultats suivants :

Tableau 5 : Résultats du diagnostic sérologiques sur 290 malades par le test TR et le test MAT

	Test de microagglutination MAT		Test de macroagglutination TR	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Antigène importé	111 (a)	166 (d)	111 (a)	166 (d)
	0 (b)	13 (c)	13 (c)	0 (b)
Antigène produit	105 (a)	166 (d)	105 (a)	166 (d)
	0 (b)	19 (c)	19 (c)	0 (b)

$$\text{Sensibilité \% : } \frac{111 \times 100}{111 + 0} = \mathbf{100 \%}$$

$$\text{Spécificité \% : } \frac{166 \times 100}{13 + 166} = \mathbf{93 \%}$$

$$\text{Sensibilité \% : } \frac{105 \times 100}{105 + 0} = \mathbf{100 \%}$$

$$\text{Spécificité \% : } \frac{166 \times 100}{19 + 166} = \mathbf{90 \%}$$

La sensibilité des deux réactifs est de 100 % alors que la spécificité du réactif Biorad est relativement meilleure que celle du réactif antigène IPA.

C/- Résultats du diagnostic sérologique par le test MAT

Plusieurs techniques sérologiques sont utilisables pour le diagnostic biologique de la leptospirose, et sont caractérisées par une sensibilité et une spécificité propre rendant parfois nécessaire l'utilisation simultanée de deux techniques au cours de la maladie.

La macroagglutination sur lame (antigène TR) et le test de micro agglutination sont les techniques traditionnellement utilisées au laboratoire de l'IPA.

Toute fois, le test de micro agglutination ou réaction d'agglutination lyse (RAL) de **Martin** et **Petit** demeure la technique de référence.

Il faut savoir que plusieurs sérogroupes peuvent être retrouvés dans un même prélèvement. De ce fait, la sélection se fera de façon présomptive avec l'antigène donnant le titre le plus élevé en MAT quantitatif.

La figure n°12 représente la répartition en proportion des différents sérogroupes identifiés sur 100 sérums testés.

Le séro groupe **Icterohaemorrhagiae**, largement prépondérant, est retrouvé dans 66 % des cas positifs.

Ces résultats rejoignent les résultats du Centre National de Référence des Leptospires –France- lors du rapport annuel d'activité en 2004 donnés par **G. Baranton** et **D.Postic** [11]

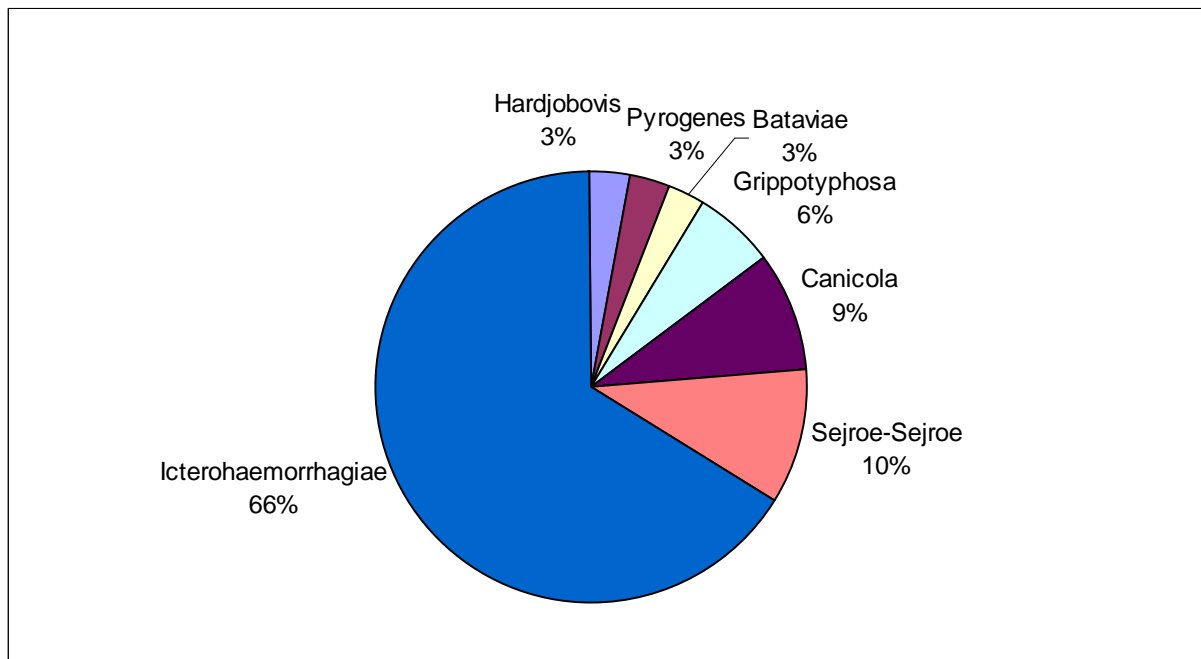


Figure 12 : Pourcentage d'identification des sérogroupes réalisé sur 100 malades –2007-

D/- Etude épidémiologique

Les résultats de l'étude épidémiologique sont donnés grâce à la fiche de renseignements accompagnant chaque prélèvement de malade. (voir en annexe)

1/- Age et sexe des malades :

Les patients sont en grande majorité de sexe masculin, soit 80% des positifs, l'âge moyen est de 38 ans (extrêmes 16 à 80 ans).

La répartition des malades par tranche d'âge est donnée de la façon suivante :

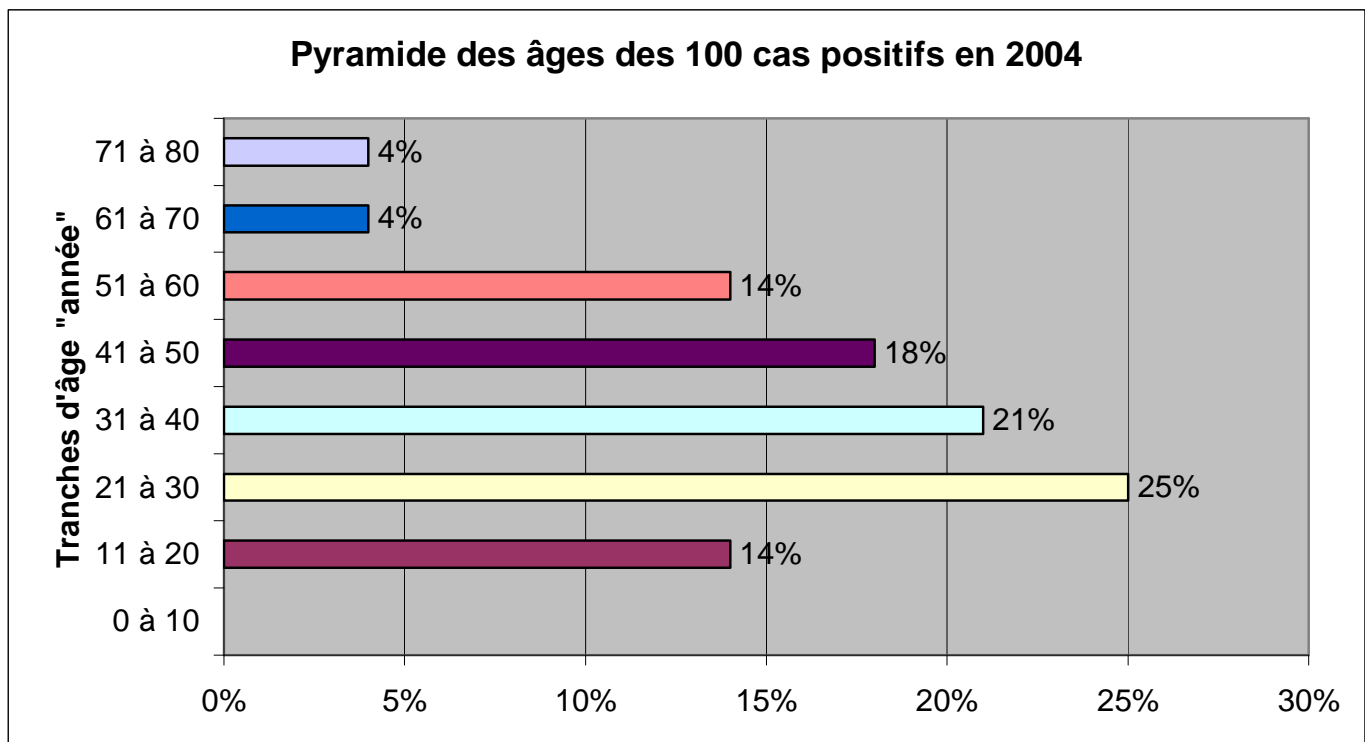


Figure 13 : Répartition des patients par tranche d'âge.

2/- Données géographiques des malades :

L'origine géographique des patients diagnostiqués est étroitement liée au secteur rural où ils y habitent. Effectivement la majorité des patients concernés s'exposent de façon quotidienne aux leptospires, ceci est lié à leur activité quotidienne, telle est le cas des femmes au foyer (jardinage, petits élevages domestiques de poules ou de lapins, ou encore le ravitaillement en eau douce).

Le tableau 7 indique le nombre de cas au niveau des différents centres hospitaliers.

Toutefois, on note un pourcentage important (48 %) de patients au niveau du CHU de Tizi Ouzou qui est à l'origine de l'épidémie de la leptospirose dans la localité de Tala Athmane –wilaya de TIZI OUZOU-déclaré en Décembre 2006.

Tableau 7 : Origine géographique des malades

Origine	Effectif	Pourcentage
Région EST CHU tizi Ouzou, CHU Constantine, CHU Jijel, SS Bedjaia, SS Lakhdaria	55	55%
Région OUEST SS Boufarik, CHU Sidi Belabes, SS Koléa, SS Larabâa, Privé, SS Attaf	35	35%
Région CENTRE CHU Béni Messous, CHU Mustapha, CHU Parnet, CHU El-Harrch, CHU Kouba, CHU El- Kettar, SS Rouiba, Privé	10	10%

3/- Contexte clinique :

Dans le cas de la leptospirose l'intervalle de temps en moyenne est de 07 à 12 jours après l'apparition des premiers signes cliniques.
Les principaux signes cliniques sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Principales symptômes cliniques des 100 patients testés.

Symptômes Cliniques Confirmés	
Fièvre	100 %
Ictère	79 %
Syndrome algique	82 %
Atteinte rénale	53 %
Hémorragie	48 %
Syndrome pulmonaire	26 %
Syndrome méningé	14 %
Injection conjonctivale	13 %
Syndrome neuro-encéphalitique	9 %

Les signes les plus fréquemment retrouvés parmi les 100 patients confirmés sont : la fièvre, le syndrome algique, l'ictère, le syndrome rénal et enfin l'hémorragie. On constate que les formes fébriles pures, encore qualifiées de pseudo grippale sont de loin les plus fréquentes.

La gravité de la maladie est due à sa forme la plus caractéristique (fièvre, ictère et atteinte rénale).

Toutefois d'autres présentations cliniques existent, notamment les méningites et les infections pulmonaires.

Ces résultats concordent avec les travaux réalisés par *Fabrice Merien* et col. (2005) dans le cadre de la surveillance de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie. [12]

4/- Distribution mensuelle de la leptospirose humaine des 100 cas positifs.

La recrudescence saisonnière représentée sur la figure ci-dessous est désormais un élément irrégulier du fait du changement climatique en Algérie.

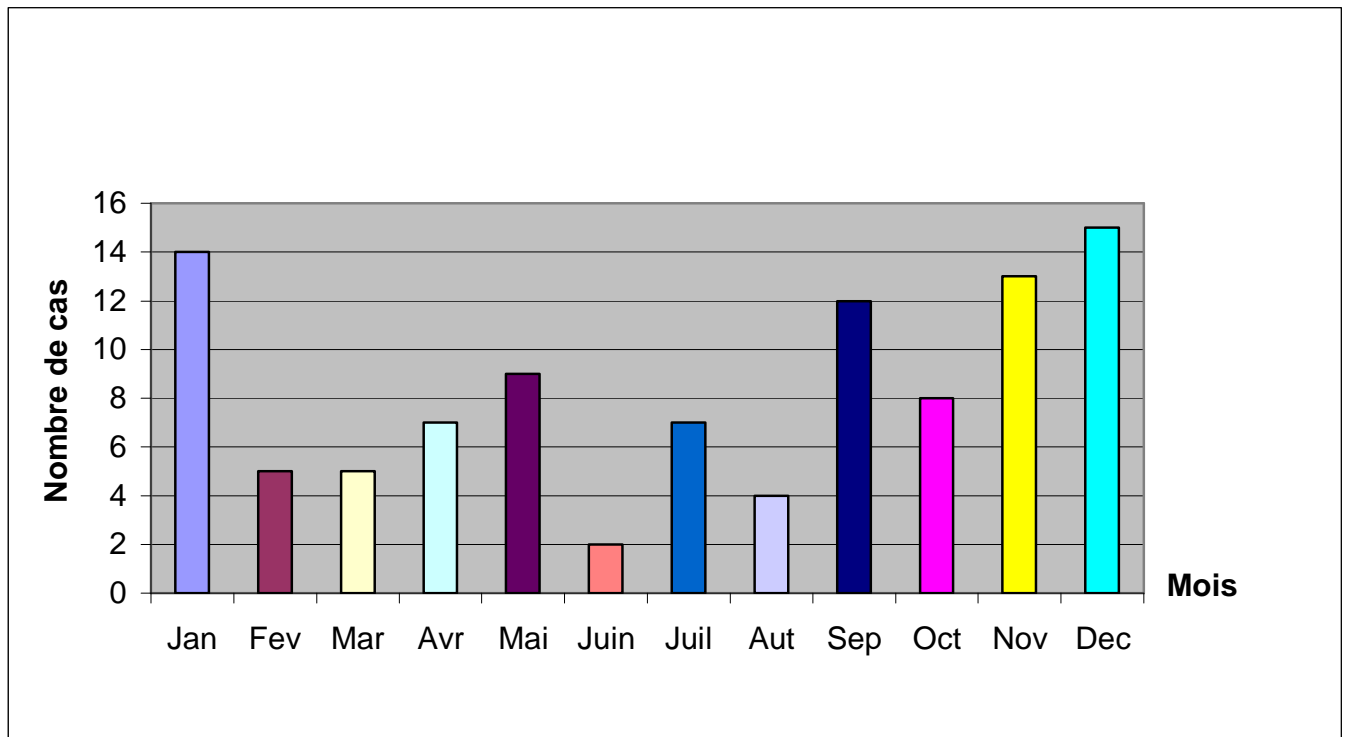


Figure 14 : Distribution mensuelle de la leptospirose des 100 cas positifs

En 2007, on note 59 % des cas diagnostiqués entre le mois de Juillet et Décembre, excepté le mois de sécheresse en Août. Cependant, il apparaît deux pics tardifs significatifs en Janvier et Mai, qui ne sont pas liés à une région particulière mais aux phénomènes météorologique connus comme étant des facteurs importants de

recrudescence de leptospiroses. Par exemple une température modérée et une pluviométrie élevée. [13]

5/- Facteurs à risque

Chez l'homme, les leptospiroses sont principalement des zoonoses professionnelles ou des zoonoses occasionnelles dites domestiques ou de loisirs. (figure 15)

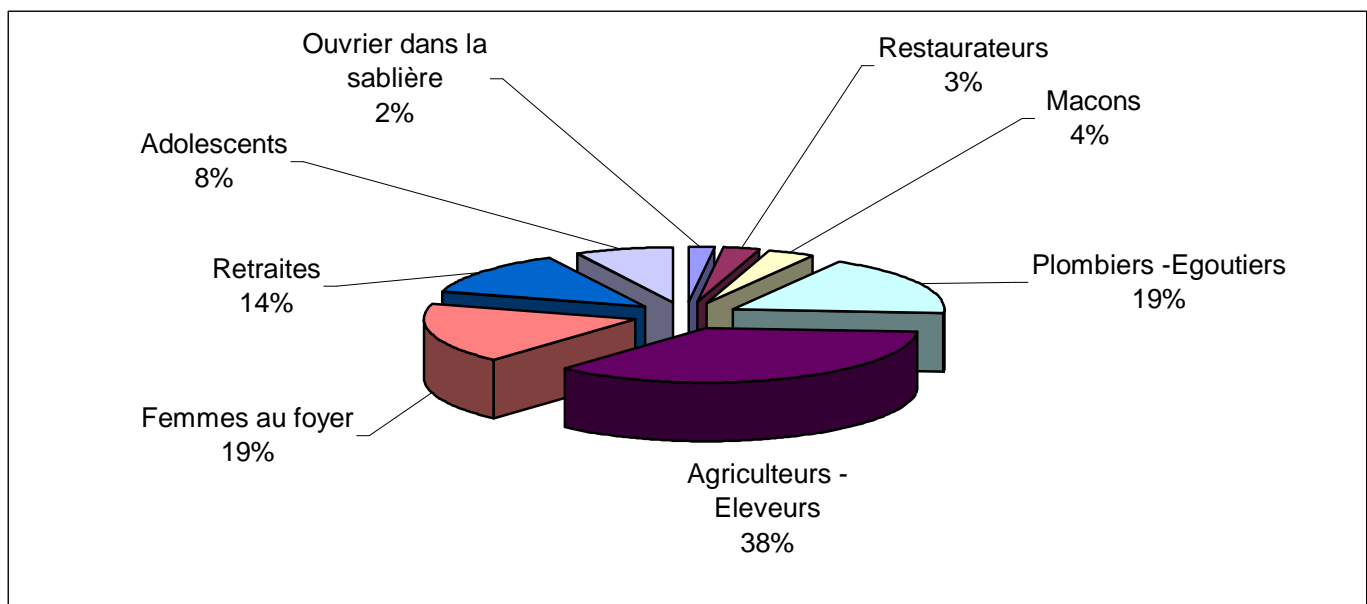


Figure 15 : Répartition des facteurs à risque chez les 100 cas positifs

Désormais le nombre de cas chez les adolescents, les retraités et, les femmes aux foyers (41%) est presque égale à celui des catégories professionnelles à risque (59%) ou prédominent les agriculteurs et éleveurs 38%.

Probablement l'absence de la vaccination aux professions exposées contribue à cette augmentation des leptospiroses professionnelles. Les hommes adultes, plus souvent engagés dans des activités à risques, sont plus atteints.

La contamination peut se faire soit par contact avec des animaux infectés ou leurs organes (éleveurs), ou encore par contact avec un environnement contaminé par l'urine des animaux infectés (agriculteurs, égoutiers, plombiers etc...). [14]

Les zoonoses occasionnelles de loisirs résultent principalement des activités domestiques quotidiennes chez les femmes au foyer (petit élevage de poules, jardinage, ou encore ravitaillement en eau de puits ou de rivière dans les zones rurales).

Du même, le nombre de cas chez les adolescents et les retraités est remarquable, ceci est dû probablement aux travaux domestiques, chasse et pêche en eau douce. [15]

CONCLUSION

Ce modeste travail constitue une ébauche d'un dossier scientifique et technique en vue de la production locale de l'antigène thermorésistant, réactif destiné au dépistage de la leptospirose.

Les résultats obtenus reflètent l'importance du réactif dans le dépistage de la maladie et la facilité dans sa production ainsi que dans la réalisation du test de macro agglutination sur lame.

De même, la prise en compte, des résultats sérologiques des 100 cas confirmés par la technique de référence : test de micro agglutination (MAT) ainsi que les informations obtenues par la fiche de renseignements des malades, même si elles ne peuvent être considérées comme représentatives de la situation épidémiologique de la leptospirose en Algérie, permettent cependant de supposer l'impact supérieur du sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

Une concordance des résultats de la réaction de dépistage et la réaction de référence est observée.

Nous concluons ainsi que la réaction macroscopique constitue une méthode de dépistage valable pour les leptospiroses humaines.

L'étude de faisabilité étant réalisée, il serait donc envisageable d'effectuer une étude de rentabilité : étude technico-économique, en vue de la production locale du réactif, en tenant compte des diverses étapes de production (culture de la souche Patoc, ..., conditionnement et stockage du produit final).

Références Bibliographique :

- [1] D. Postic, G. Baranton. Série “Méthodes de laboratoire” Diag.biol.Lepto. Borre. de Lyme Institut Pasteur. 64 – 65. 2000
- [2] D. Postic. Institut Pasteur – CNR des Leptospires. Mode opératoire. Préparation du supplément albumineux pour le milieu E.M.J.H Version B 2001
- [3] D. Postic Institut Pasteur – CNR des leptospires – Mode opératoire Contrôle de l’EMJH Version B 2001
- [4] D. Postic. Institut Pasteur – CNR des Leptospires – Mode opératoire Recherche d’anticorps anti-Leptospires dans un sérum humain par la technique MAT. Version A 2001
- [5] D. Postic . Institut Pasteur – CNR des Leptospires – Mode opératoire Préparation de l’antigène TR Version A 200.
- [6] M. Mailloux, J – Mazzonelli and G. Dorta de Mazzonelli – Thermoresistant Antigene in Leptospirosis – Possibility of a Macroscopic Diagnosis of Leptospirosis with a single Antigen – Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A 229, 238, 241 1971
- [7] M. NICOLESCU Medecine et Maladies Infectieuses – La réaction d’agglutination macroscopique: réaction de dépistage des Leptospiroses humaines – 11, 2, 105- 108 1981
- [8] A. SCHOBERG et al. Use of formaldehyde-PBS for Serum dilution in the Microscopic Agglutination Test (MAT) for Leptospirosis – Zbl-Bakt. Hyg. A257, 493- 497 1984
- [9] Merck. Laboratoire-Reactifs Diagnostica-Catalogue produits chimique- 1990-1991
- [10] Albert Weber, etal- Evaluation of the Slide Agglutination Test for Detection of Leptospira Antibodies in Serum Samples of Slaughter Pigs. Zbl. Bakt. Hyg. 257, 498- 500 1984

- [12] Fabrice Merien, Alain Berlioz- Artharol- La Leptospirose : une zoonose sous surveillance en Nouvelle Calédonie et dans le pacifique, Revue Francophone des laboratoires N°374,
45- 50 Juin- Juillet, 2005
- [13] Mazzonelli J- Baranton G- Bilan 1985 de la leptospirose humaine en France métropolitaine et dans les DOM-TOM- Ball-Soc. Path. Exot., 79, 611, 615, 1986.
- [14] J-P EUZEBY Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire – Leptospira 1999.
- [15] Houpikian P, Perolat P, Baranton G, Brouqui P. Leptospirose Encycl. Med. 8- 039- Q- 10 –p14, 2002.
- [16] OTTO GSEU- The History of leptospirosis : 100 years. Zbt- Bakt. Hyg- A 257, 473- 478,1984.
- [17] M- NICOLESCU – La réaction d’agglutination macroscopique : Réaction de dépistage des leptospiroses humaines- Médecine et maladies Infectieuses, 11, 2, 105- 108, 1981.
- [18] G. Baranton D. Postic : La Leptospirose Actualité, Biologie et santé 2005.
- [19] Profeseur Piere Aubry-Leptospiroses Actualité- 2005 Médecine tropicale Mise à jour 2006.
- [20] Spinu, Topciu, Trinh, Vo Vh. L’homme comme de virus dans une épidémie de Leptospirose survenue dans la jungle. Arch Roum Pathol Ex Microbid 1963 ; 22 1081.1800
- [21] Harison , Fitzgerald WR. Leptospirosis – Canit de sexuallge transmited disease.
- [22] Elder JK. Theinfluence of environmental factors on the survival of zoonotic bacterial pathogene with special reference to Leptospirae . Austral Microbiologist ; 7, 323-324,1986.

- [23] Bolin CA. Koellner . Human to human transmission of *Leptospira interrogans* Fabrice Merien, Alain Berlioz- Artharol- La Leptospirose : une zoonose sous surveillance en Nouvelle Calédonie et dans le pacifique, Revue Francophone des laboratoires N°374, 45- 50 Juin- Juillet, 2005
- [24] Faire S, Adler B, Christophe W, Valentine R. Fatal congenital human Leptospirosis, Zbt bakt Microbid Hyg 1984; 257; 548.
- [25] Louisot P., Biochimie- Edit SIMEP –volume 1,3, 1983.
- [26] FAINE S.; Guide pour la lutte contre la leptospirose. OMS Publication;175 p.Offset N 67, 1987
- [27] RALPH D, MC CLELLAND M. Phylogenic evidence for horizontal transfer and an intervening sequence between species in a spirochete genus. J. Bacteriol. 17(19): 5982 1994.
- [28] ADLER B. and FAINE S. Serological cross-reaction of leptospira lipopolysacharide antigen. Zbl. Bakt.I. Abt. A, 291-301 1979.
- [29] JOHNSON R.C. The biology of parasitic spirpochetes. Acadamic press ,New York, 1976.
- [30] FAIRBROTHER J. M Serological interrelationship of leptospira serova and genus- specific antigens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J.Clin; Microbiol.; 20 (6). 1089, 1093,1984.

[31] G. BARANTON, D. POSTIC La leptospirose. Actualité. Biologie et Santé
volume 5,

Février 2005 France.

[32] KO AI, GALVAO REIS M, RIBEIRO DOURADO CM, JOHSON WD JR,
RILEY LW

Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis,
1999.

ANNEXE

MINISTERE DE LA SANTE
INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

Fiche de renseignements
(accompagnant la demande de sérologie de Leptospirose)

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Lieu d'habitation :

Profession :

Date de début de la maladie :

Date du prélèvement :

Sexe

Cachet de l'hôpital

Symptomatologie :

Syndrome fébrile

Syndrome algique

Atteinte pulmonaire

Atteinte rénale

Syndrome méningé

S. neuro-encéphalique

Ictère

Infection conjonctivale

Suspicion d'hépatite virale

Taux de plaquettes

Autres

Contact avec les animaux :

Rongeurs :

Rats :

Chiens :

Bovins :

Chevaux :

Autres :

Contact avec l'eau douce (préciser) :

Bain :

Pêche :

Sports nautique :

En rivière :

lac ou étang :

Plan d'eau à préciser :

Traitement antibiotique :

Non

Oui

Date :

Nature :

Eau physiologique tamponnée pH = 7,6

Elle est composée de :

Tampon Sörensen -----	160 ml
Eau physiologique à 0,85 % -----	1840 ml

Tampon Sörensen

Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O -----	8,33 g
KH ₂ PO ₄ -----	1,09 g
H ₂ O qsp -----	1 l

Ce tampon est autoclavé 20 minutes à 110°C et conservé à + 4°C.

Le milieu EMJH

La composition de la base EMJH en g/l est donnée en annexe

Na ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,3
NaCl.....	1
NH ₄ Cl.....	0,25
Thiamine.....	0,005

Préparation du tampon PBS ;

PBS 10 X concentré	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	11,33 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	H ₂ O qsp	1 l

Autoclaver 20 minutes à 120° C et diluer au 1/10 au moment de l'emploi.

Préparation du Merthiolate 20 % [25]

Le Merthiolate ou le Thimerosal = Sodium éthyl mercurithiosalicylate =
2 - (C₂H₅ HgS) C₆H₄CO₂ Na.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps.

Ag TR: Antigène Thermorésistant.

CPK : Créatine Phospho Kinase

CuSO₄ : Sulfate de cuivre.

EMJH : Ellinghausen Mc cullough modifié par Johnson et Harris.

FeSO₄ : Sulfate de fer.

H₂O : Molécule d'eau.

HDL cholestérol : Lipoprotéine de Haute Densité cholestérol.

Ig M : Immunoglobuline de type M.

J : Jours.

LCR : Liquide Céphalo Rachidien.

MAT : Micro agglutination test.

MgCl₂ : Chlorure de magnésium.

mg : milligrammes.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaH₂PO₄ : Sodium dihydrogène phosphate.

Na₂HPO₄ : Disodium hydrogène phosphate.

NH₄Cl : Chlorure d'ammonium.

Na OH : Hydroxyde de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

pH : potentiel d'Hydrogène.

PPI : pour préparation injectable.

qsp : quantité suffisante pour.

RAL : Réaction d'Agglutination Lyse.

UI : Unité Internationale.

ZnSO₄ : Sulfate de zinc.

