

Recherche de réservoirs de la leptospirose à Madagascar par la technique d'amplification génique

Ralaiarijaona RL¹, Bellenger E², Chanteau S¹, Roger F³, Pérolat P⁴, Rasolofo Razanamparany V¹

RESUME □ La présence de leptospirose avait été suspectée à Madagascar à la suite des premières enquêtes sérologiques dans les années 1950, réalisées chez des bovins et chez des patients. Cependant, aucun réservoir de leptospires n'avait pu être mis en évidence par la bactériologie. Dans cette étude, il a été fait appel à la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui consiste à amplifier un fragment d'ADN du gène *rrs* de *Leptospira interrogans* pour rechercher l'éventuel réservoir animal de leptospires à Madagascar. Les tests réalisés chez 115 rats, 50 zébus et 13 porcs ont été tous négatifs. Les anticorps ont été également recherchés chez 105 sujets professionnellement exposés à cette infection. La sérologie était négative pour tous sauf pour un sujet faiblement séropositif.

Ces résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un réservoir animal de leptospires. Cette maladie, si elle existe, devrait être rare à Madagascar.

Mots-clés : Leptospirose - Réservoir - Amplification génique - Sérologie - Madagascar.

ABSTRACT : "Use of the polymerase chain reaction technique in detection of Leptospirosis in Madagascar" : A polymerase chain reaction (PCR) technique was used for detection of the *Leptospira interrogans rrs* gene in kidney tissue from 115 rats, 50 zebu cattles and 13 pigs in an attempt to identify a possible animal reservoir of leptospirosis in Madagascar. In addition, serological testing of 105 individuals in close contact with animals was carried out. The PCR analysis was negative for all the samples tested and only one person was found seropositive at a low titer. The findings suggest that leptospirosis, if prevalent in Madagascar, is likely rare.

Key-words : Leptospirosis - Reservoir - Polymerase chain reaction - Serology - Madagascar.

INTRODUCTION

La leptospirose est une zoonose provoquée par des bactéries du genre *Leptospira* présente sur tous les continents, mais surtout dans les régions chaudes et humides. Bien que la maladie existe dans les pays voisins de la région Océan Indien comme La Réunion, les Seychelles ou les Comores [1,2,3], et bien que les conditions climatiques et pluviométriques lui soient favorables, elle ne semble pas poser de problème majeur à Madagascar. Les enquêtes antérieures dans différentes régions de l'île ont montré une sérologie positive pour différents sérogroupes (Pomona, Grippotyphosa, Ictero-hemorrhagiae, Canicola, Tarassovi, Australis, Hebdomadis, Bataviae) chez quelques bovins et autres animaux domestiques, laissant ainsi suspecter la présence de la leptospirose à Madagascar [4,5,6]. Chez l'homme, une étude sérologique systématique chez des sujets d'Antananarivo a montré un taux de prévalence très bas [7]. L'unique cas clinique avec confirmation sérologique pour Australis a été observé lors d'une

enquête portant sur 40 patients présentant des symptômes compatibles avec une leptospirose [5]. Il s'agissait d'un sujet n'ayant jamais quitté le pays [8]. Cependant, ce cas n'a pu être confirmé par la bactériologie. Par ailleurs, la recherche de leptospires chez des rats de l'espèce *Rattus rattus*, qui est le réservoir mondial le plus commun, et chez des chauve-souris *Pteropus rufus* capturés à Antananarivo, n'a jamais permis d'isoler le germe [5,7].

Les raisons pour lesquelles la leptospirose ne s'est pas installée dans l'île, alors que toutes les conditions (chaleur, rizières, rongeurs, bovins...) semblent réunies pour son développement, ne sont pas élucidées. En fait, les conditions spéciales nécessaires à l'isolement et la culture de la bactérie (milieu de culture, exigence dans le transport des prélèvements) pourraient expliquer pourquoi le germe n'a jamais pu être isolé et pourquoi aucun réservoir sauvage n'a pu être mis en évidence. Au début des années 1990, une méthode de détection de leptospire, par amplification du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16S de *L. interrogans* (par la technique de "Polymerase Chain Reaction" ou PCR), a été mise au point [9]. Cette méthode rapide a une sensibilité comparable à celle de la culture et de la microagglutination microscopique [10], mais

¹ Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 - Antananarivo - Madagascar.

² Centre National de Référence de la Leptospirose, Institut Pasteur de Paris, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15 - France.

³ Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Élevage. Ampandrianomby - 101 Antananarivo - Madagascar.

⁴ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Nouméa - Nouvelle Calédonie.

a l'avantage de pouvoir être réalisée à partir de prélèvements congelés. Elle est de plus indépendante du sérotype de leptospire. C'est cette méthode qui a été utilisée pour rechercher la présence d'ADN de *L. interrogans* dans les reins de rats, de zébus et de porcs. Par ailleurs, la présence d'anticorps chez des travailleurs de l'abattoir d'Antananarivo et d'une fabrique de conserves de viande également située à Antananarivo a été recherchée.

METHODES

La technique d'amplification génique pour la recherche d'ADN de leptospire dans les reins d'animaux peut se résumer ainsi : les reins de rat ou des morceaux de rein de zébu et de porc, sont broyés dans de l'eau physiologique. L'ADN est extrait avec le thiocyanate de guanidine et des particules de silice, selon la méthode décrite par *Boom et al* [11].

La technique de "Polymerase Chain Reaction" ou PCR [9] consiste en l'amplification d'un fragment de 331pb en utilisant les amorces A (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') et B (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'), correspondant respectivement aux nucléotides 38 à 57 et 348 à 368 du gène *rrs* codant l'ARN 16S de *L. interrogans*. Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur filtre et hybridés avec une sonde spécifique selon le protocole décrit par *Mérien et al* [9]. Le fragment de 331pb (Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie) a été utilisé comme témoin positif de la PCR.

RESULTATS

Pour la recherche d'ADN de leptospires, la technique d'amplification d'ADN par PCR a été évaluée sur des reins de rat contaminés artificiellement avec de l'ADN du fragment de 331pb. Cette technique a permis de détecter environ 5.10^{-4} fg d'ADN, équivalant théoriquement à 2 leptospires et comparable au protocole *princeps* [9].

La recherche d'ADN de leptospires par PCR a été faite sur 178 reins d'animaux prélevés de mars à juin 2000 : 115 rats (49 *Rattus rattus* de la région d'Ambositra, province de Fianarantsoa et 66 *R. norvegicus* de la ville d'Antananarivo), 40 zébus de la région de Mahajanga, 10 zébus d'Antananarivo et 13 porcs de la région d'Antsirabe (province d'Antananarivo). Les rats provenaient de captures opérées par le Service Central de la Peste, pour son programme de surveillance. Les

reins de zébus et de porcs ont été recueillis à l'abattoir d'Antananarivo.

Dans tous les cas, le résultat de la recherche d'ADN de leptospire par PCR a été négatif.

En ce qui concerne l'étude sérologique chez des travailleurs exposés au risque d'infection, les sérums de 74 travailleurs de l'abattoir d'Antananarivo et de 31 employés d'une conserverie de viande (sérothèque du Service de Virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar - IPM -, 1995) ont été envoyés au Centre National de Référence des Leptospires de l'Institut Pasteur de Paris. Les anticorps IgM ont été recherchés par la technique ELISA et par le "MicroAgglutination Test" (MAT) vis-à-vis de 16 sérogroupes par la technique de *Martin et Pettit* [12]. La sérologie était négative pour 104 sérums. Un seul sérum a été trouvé positif au 1/400 avec la technique ELISA et au 1/50 vis-à-vis du séro groupe Canicola par la méthode MAT. Il s'agissait d'un employé de la conserverie qui n'avait pas présenté de symptômes particuliers. Ces taux très bas, à la limite du seuil de positivité, pourraient être compatibles avec un début de leptospirose, mais étant en limite de significativité, ils peuvent correspondre à des réactions non spécifiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Bien que la leptospirose soit très répandue, le diagnostic clinique n'est pas aisé, du fait de la variété des manifestations cliniques de la maladie. La sérologie est difficile à interpréter, surtout dans les pays comme Madagascar où la prévalence de l'infection n'est pas connue. Sa présence à Madagascar avait été suspectée il y a des décennies [4,5,6,7], mais à un taux très faible. Mais, jamais le germe n'avait été mis en évidence, vraisemblablement à cause de la difficulté du diagnostic bactériologique. La technique de PCR, qui est pourtant sensible, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de réservoirs de leptospires, du moins dans les régions étudiées c'est-à-dire, Antananarivo, Mahajanga et Ambositra.

Toutefois, il faut noter qu'une enquête menée en 1966-1967 dans la région de Toliara, zone à climat semi-aride plutôt sec et où de ce fait, hommes et bovins vivent autour de points d'eau assez limités, a montré la présence d'anticorps spécifiques des sérogroupes Tarassovi et Bataviae chez des bovins et des sérogroupes Tarassovi, Grippytyphosa, Australis et Hebdomadis chez des sujets humains suspects ou exposés à cause de leur profession au risque d'infection leptospirosique [6]. La recherche de réservoir chez les rongeurs et chez les bovins

de cette région, où de surcroît le pH des eaux est plus alcalin donc favorable à la survie des leptospires, est à envisager.

Comme il a été décrit que la séroprévalence est très basse au sein d'une population de patients [7] et que de plus, le seul cas humain confirmé par la sérologie avait été observé lors d'enquêtes auprès d'individus suspects [8], les recherches de leptospires par PCR devraient donc être poursuivies chez des populations ou des régions bien ciblées.

En résumé, les résultats obtenus ici confirment les précédentes enquêtes à savoir que, si la leptospirose existe à Madagascar, elle est extrêmement rare. Par conséquent, la mise en évidence de leptospires chez les humains et chez les animaux nécessite l'analyse d'un très grand nombre d'individus. La méthode de PCR, rapide et réalisable sur les grandes séries, est tout à fait adaptée à ce type d'étude. Cette technique a été mise en place à Madagascar. Elle devrait donc permettre de mieux évaluer la place de cette maladie pour laquelle jusqu'à présent aucun diagnostic direct (culture ou PCR) n'a pu être obtenu dans l'île.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Elie J. Vololonirina pour son aide technique, l'Unité de Virologie de l'IPM, le Docteur Guy Baranton (Institut Pasteur Paris) pour leurs conseils.

REFERENCES

- 1- **Mailloux M.** Identification of the first human *Leptospira* strain in island of La Réunion. *Bull Soc Pathol Exot* 1985; **78** : 28-30.
- 2- **Yersin C, Bovet P, Mérien F, Wong T, Panowsky J, Pérolat P.** Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean) : a population-based study. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **59** : 933-940.
- 3- **Laporte P, Michault A, Galtier J, Lefait-Robin R, Aucher P, Baranton G.** La leptospirose à Mayotte. *Bull Soc Pathol Exot* 1990; **83** : 637-641.
- 4- **Kolochine-Erber B, Buck G, Quesnel JJ.** La leptospirose bovine doit être suspectée à Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 1956; **49** : 681-686.
- 5- **Kolochine-Erber B, Brygoo E-R.** Enquête sur les leptospires à Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 1956; **49** : 686-698.
- 6- **Silverie R, Monnier M, Lataste-Dorolle C.** Nouvelle enquête sur la leptospirose à Madagascar. Contribution à l'étude des leptospires humaines, bovines et porcines de la région sud. *Bull Soc Pathol Exot* 1968; **61** : 347-358.
- 7- **Lhuillier M.** Contribution à l'étude des leptospires à Madagascar (étude bactériologique et sérologique). *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1987; **64** : 429-440.
- 8- **Salles P, Brygoo E-R, Saint-Amans.** A propos d'un cas de leptospirose humaine avec confirmation sérologique observé à Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1955; **23** : 19.
- 9- **Mérien M, Amouriaux P, Pérolat P, Baranton G, Saint Girons I.** Polymerase Chain Reaction for detection of *Leptospira spp.* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; **30** : 2219-2224.
- 10- **Mérien M, Baranton G, Pérolat P.** Comparison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination Test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995; **172** : 281-285.
- 11- **Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, Van Der Noorda J.** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; **28** : 495-503.
- 12- **Faines S.** Guide pour la lutte contre la leptospirose. Genève : OMS, 1987 : 175p. (Série de Rapports techniques, n°67).