

LA LEPTOSPIROSE BOVINE, GÉNOTYPAGE ET DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES CAS D'ICTÈRE CONGÉNITAL SUR AVORTONS BOVINS*

Delooz Laurent^{1,2}, Czaplicki Guy¹, Grégoire Fabien¹, Dal Pozzo Fabiana², Pez Floriane³,
Kodjo Angeli⁴, Saegerman Claude²



RÉSUMÉ

La leptospirose est une maladie animale présente dans le monde entier, avec un impact économique majeur sur l'industrie de l'élevage et une capacité zoonotique importante. La maladie représente un défi majeur dans les pays en voie de développement car les personnes et les animaux vivent souvent en étroite association. Le sérotype Hardjo de *Leptospira* dont l'hôte principal est le bétail a fait l'objet de nombreuses études, mais il existe peu de données sur d'autres sérotypes en circulation ou émergents. Pour mieux comprendre la maladie chez les bovins et comment la prévenir et/ou la contrôler, il est nécessaire d'identifier le génotype et le sérotype de *Leptospira* en circulation. Cet article présente les résultats de plusieurs investigations réalisées sur une collection historique belge de cas d'ictère congénital chez des fœtus avortés de bovins provenant de l'épisode émergent de leptospirose de 2014 [Delooz *et al.*, 2015]. Les résultats ont révélé que *L. Grippytyphosa* et *L. Australis* étaient les sérogroupes les plus répandus avec respectivement 17/42 et 13/42 tests de micro-agglutination positifs pendant cet événement émergent associé au même schéma clinique. L'étude confirme également que l'ictère congénital est associé à *L. kirschneri* et *L. interrogans* et permet le génotypage de l'ADN obtenu de ces deux espèces.

Mots-clés : avortement, bovins, ictère, génotypage, *Leptospira*, leptospirose, Belgique.

ABSTRACT

*Leptospirosis is a global disease of animals, with potential major economic impact on livestock industry and important zoonotic capacities. The disease represents a major challenge in the developing countries as humans and animals frequently live in close association. The serovar Hardjo of Leptospira whose primary host is cattle has been studied extensively, but few data exist on other current circulating or emerging serotypes. To better understand the disease in cattle and how to prevent and/or control it, it is necessary to identify the genotype and the serotype of circulating Leptospira. This paper presents results of several investigations performed on a historical Belgian collection of congenital jaundice in bovine aborted fetuses coming from the leptospirosis emerging episode of 2014 [Delooz *et al.*, 2015]. The results revealed that *L. Grippytyphosa* and *L. Australis* were the most prevalent serogroups with respectively 17/42 and 13/42 positive MAT during this emerging event associated with the same clinical pattern. The study also confirms that congenital jaundice is associated with *L. kirschneri* and *L. interrogans* and provides the genotyping of DNA obtained from these two species.*

Keywords: Abortion, Cattle, Icteric, Genotyping, *Leptospira*, Leptospirosis, Belgium.



Reçu le 7 octobre 2019, accepté le 7 novembre 2019

* Texte de la communication orale présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 24 mai 2019

¹ Association régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA) asbl, 5590 Ciney, Belgique

² Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis applied to veterinary science (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH) Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, 4000 Liege, Belgium

³ BioSellal, 69007 Lyon, France

⁴ Laboratoire des Leptospires, VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy-l'Etoile, France

INTRODUCTION

En Belgique, le programme national de surveillance fondé sur la déclaration obligatoire des avortements et les analyses ultérieures de leurs produits a atteint plusieurs objectifs, notamment la surveillance officielle de la brucellose bovine, mais aussi le suivi des autres maladies abortives bovines. Certains agents pathogènes émergents ou ré-émergents ont pu être identifiés, notamment le virus de la fièvre catarrhale du mouton de sérotype 8, *Brucella abortus* et plus récemment le virus Schmallerberg.

Depuis juillet 2014, la Wallonie, région du sud de la Belgique, a été confrontée à une situation inattendue avec une augmentation importante de cas d'ictère congénital chez les fœtus avortés de bovins [Delooz *et al.*, 2015]. Au cours des six dernières années, les avortements associés à l'ictère ont été notifiés (figure 1), mais l'incidence mensuelle des cas est restée stable. De juillet à décembre 2014, les pathologistes de l'ARSIA ont signalé une augmentation du nombre de fœtus bovins avortés atteints d'ictère, avec une incidence significativement plus élevée que les mois et années précédents (figure 2). Le panel standardisé d'analyses visant à étendre le diagnostic n'a pas permis d'identifier l'étiologie. D'autres analyses ont révélé des taux élevés d'anticorps contre les sérogroupes Australis et Grippytyphosa de *Leptospira* chez des vaches après avortement de fœtus ictériques. La sérologie effectuée au cours de l'émergence a identifié des sérogroupes sans fournir d'informations sur le génotype des souches de *Leptospira* pathogènes impliquées. L'hypothèse d'une infection par des leptospires a donc été posée [Delooz *et al.*, 2015].

La leptospirose est une maladie transmissible des animaux et de l'Homme, causée par le spirochète *Leptospira*. Tous les leptospires pathogènes étaient auparavant classés comme membres de l'espèce *Leptospira interrogans*. Cependant, le genre a été réorganisé et *Leptospira* pathogène est maintenant classé en 23 espèces [Adler, 2010 ; Levett, 2001 ; Morey *et al.*, 2006] dont on distingue plus de 300 sérovars compris dans 24 sérogroupes [Levett, 2015]. Il est également important de préciser que des leptospires d'un même séro groupe peuvent appartenir à deux espèces différentes et inversement [Brenner *et al.*, 1999]. Le diagnostic de la leptospirose en laboratoire peut être complexe

et implique des tests conçus pour détecter des anticorps spécifiques dirigés contre *Leptospira*, pour isoler directement les leptospires, pour détecter leurs antigènes et pour détecter l'ADN de *Leptospira* dans les tissus ou liquides organiques des animaux [OIE, 2014].

Chez les bovins, la séroprévalence du séro groupe Sejroe est l'une des plus étudiées et varie fortement d'un pays à l'autre avec 33 % en France [Ayrat *et al.*, 2014], 30 % aux Pays-Bas [Hartman *et al.*, 1989] et jusqu'à 83,59 % en Irlande [Ryan *et al.*, 2012]. De plus, des anticorps dirigés contre *L. serovar Hardjo* ont été trouvés dans 9,2 % des laits de tank de troupeaux bovins laitiers, avec une incidence plus élevée dans le sud du pays [Dom *et al.*, 1991]. En France, le test d'agglutination microscopique (ou MAT) réalisé sur des échantillons prélevés dans 394 troupeaux bovins a permis de déterminer la répartition des trois sérogroupes circulants dominants (Australis, Sejroe, Grippytyphosa) [Ayrat *et al.*, 2014]. Dans cette partie de l'Europe, la leptospirose est répandue et pourrait être responsable d'événements pathologiques chez l'Homme [Mori *et al.*, 2014] et chez les animaux [Delooz *et al.*, 2015].

La leptospirose est une cause connue d'avortements et l'infection peut être accompagnée d'une grande variété de signes cliniques. Cependant, l'ictère foetal n'a pas été observé pendant les infections expérimentales [Ellis et Michna, 1977 ; Ellis *et al.*, 1986 ; Smith *et al.*, 1997]. À partir des observations récentes sur le terrain, l'hypothèse de l'association de l'ictère foetal bovin avec la leptospirose a été formulée [Delooz *et al.*, 2015]. Actuellement, il existe peu d'informations épidémiologiques concernant les différents sérotypes de *Leptospira* qui circulent parmi les bovins en Belgique. Bien que les manifestations de la maladie puissent être très différentes selon la souche et l'espèce animale, il est important d'identifier la souche pathogène afin d'aborder les meilleures mesures de prévention et de contrôle et ainsi prévenir la transmission potentielle à l'Homme [Evangelista et Coburn, 2010].

L'objectif de ces travaux était de caractériser l'infection à *Leptospira* détectée dans les cas d'avortements bovins associés à l'ictère foetal qui s'est produite dans le sud de la Belgique en 2014.

Figure 1

Répartition géographique des cas d'avortement ictériques, de 2008 à 2014 (N=152)
 Légende : les points blancs correspondent aux cas ictériques où une analyse complémentaire (MAT et/ou RT-PCR) est effectuée ;
 les points noirs correspondent aux cas ictériques sans analyse complémentaire.

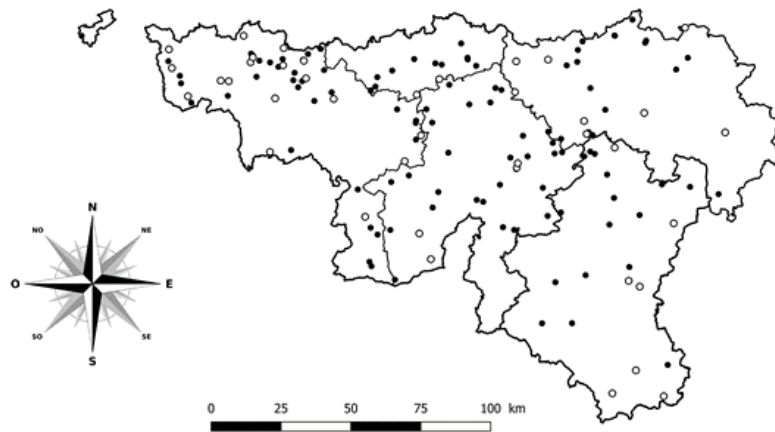
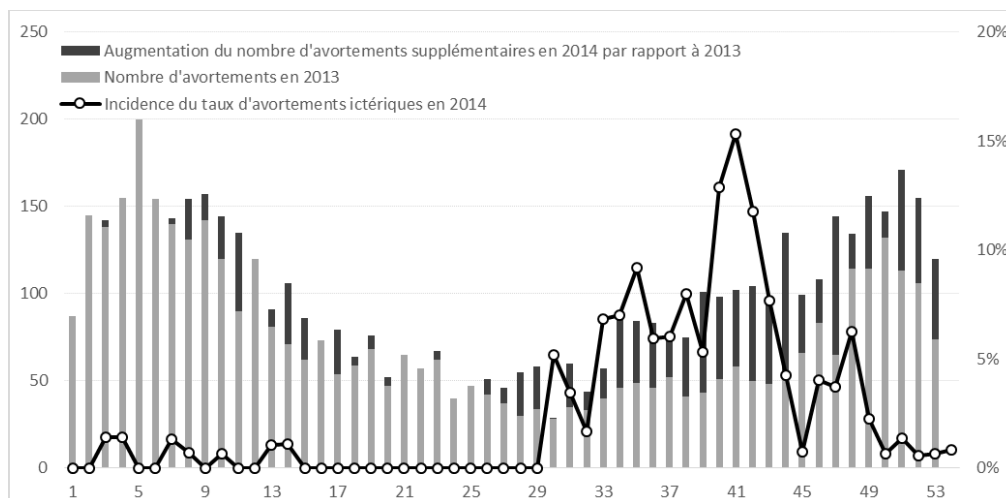


Figure 2

Tendances du taux de fœtus avortés ictériques et du nombre absolu d'avortements notifiés



I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CONCEPTION DE L'ÉTUDE

Dans le cadre du programme belge de surveillance passive de la brucellose bovine, 42 cas d'avortement bovin collectés entre octobre 2011 et décembre 2014 ont été inclus dans cette étude. Ils proviennent de 39 élevages bovins répartis sur les cinq provinces wallonnes. Ils ont été inclus dans l'étude en fonction du diagnostic d'ictère congénital (N=41) ou de la

positivité PCR vis-à-vis de *Leptospira* pathogène (N=1).

Les informations issues de l'anamnèse, telles que la date d'échantillonnage, le numéro d'identification du troupeau, la race bovine, le mois de gestation et la parité ont été encodées dans le système de gestion des informations de laboratoire (SGL) ou dans une base de données Access. Aucun de ces troupeaux n'a

appliqué la vaccination contre les espèces de *Leptospira* et, de plus, aucun vaccin *Leptospira* n'est autorisé à la commercialisation en Belgique. La localisation géographique de chaque cas d'avortement a été possible grâce aux coordonnées Lambert et au système belge d'identification et de traçabilité des mouvements du bétail (SANITRACE).

2. ANALYSES DE LABORATOIRE

Un panel standardisé d'analyses a d'abord été appliqué pour effectuer le diagnostic en laboratoire

de l'avortement bovin sur les fœtus soumis. La détection directe et/ou indirecte des agents pathogènes a été effectuée, comprenant des bactéries (*Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira borgpetersenii* et *interrogans* serovar Hardjo, *Listeria monocytogenes*, *Neospora caninum*, *Salmonella* Dublin), des virus (bluetongue virus serotype 8 (BTV-8), herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1), herpèsvirus bovin de type 4 (BoHV-4), virus de la diarrhée virale bovine (BVDV), virus de la maladie de Schmallenberg), plusieurs agents mycotiques et de nombreuses autres bactéries opportunistes (tableau 1).

Tableau 1

Liste des agents pathogènes et méthodes de diagnostic du panel standardisé d'analyses

Agents pathogènes	Foetus		Sérum foetal	Sérum maternel
	Prélèvements	Méthodes	Méthodes	Méthodes
<i>Brucella</i> spp.	Liquide de caillette	Culture		SAW /ELISA Ag
<i>Campylobacter foetus</i> spp.	Liquide de caillette	Culture		
<i>Coxiella burnetii</i>	Liquide de caillette	PCR**		ELISA Ac
<i>Listeria monocytogenes</i>	Liquide de caillette	Culture		
Agents mycotiques	Liquide de caillette	Culture		
Bactéries opportunistes	Liquide de caillette	Culture [§]		
<i>Salmonella</i> spp.	Liquide de caillette	Culture		
BTV-8	Encéphale	PCR*		
<i>Neospora caninum</i>	Encéphale	PCR	ELISA Ag	ELISA Ag
Schmallenberg virus	Encéphale	PCR*		
BoHV-4	Rate	PCR		ELISA Ag
BVDV	Rate	ELISA Ag		ELISA Ag
<i>Leptospira</i> serovar Hardjo				ELISA Ag

Légende : PCR, Polymerase chain reaction ; Ac, Anticorps ; Ag, Antigène ; SAW, Séro-agglutination de Wright ; [§] Seule la présence d'une culture pure sur gélose au sang indique la présence de bactéries opportunistes ; * Appliqué uniquement en cas de suspicion (anomalies congénitales) ; BVDV, Bovine Viral Diarrhoea Virus ; BTV-8, Bluetongue virus serotype 8 ; BoHV-4, Bovine herpesvirus 4.

3. TEST DE MICROAGGLUTINATION

Le MAT (test de micro-agglutination) a été réalisé sur les 42 sérums maternels prélevés sur les vaches au moment de l'avortement, en utilisant vingt-quatre sérovars représentant 14 sérogroupes d'espèces pathogènes de *Leptospira* : Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Australis, Bratislava, Munchen, Autumnalis, Bim, Castellonis, Bataviae, Canicola, Hebdomadis, Panama, Mangus, Pomona, Mozdok, Pyrogenes, Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, Wolffi, Tarassovi, Cynopteri, Vanderhoedoni, et Grippotyphosa (tableau 2). D'après les observations enregistrées par Chappel et ses collaborateurs en 2004, les titres de 160 ou plus ont été définis comme des réactions d'agglutination positives chez les

ruminants. Le critère d'évaluation était la dilution la plus élevée du sérum dans laquelle une agglutination de 50 % s'est produite.

4. DÉTECTION DE L'ADN DE *LEPTOSPIRA* PATHOGÈNES (REAL-TIME PCR)

Pendant l'autopsie, un fragment de rate, de rein, de foie et de placenta a été prélevé sur chaque avorton, mis en commun et conservé à -20°C. L'analyse par PCR a été effectuée sur 26 pools d'organes prélevés sur des fœtus ictériques, prélevés dans les échantillons historiques d'avortement décrits dans le plan d'étude (non disponibles pour 16 autres fœtus).

Tableau 2
Liste des sérovars testés (n=24) selon le séro groupe (n=14)

Sérogroupe	Sérovar	Sérogroupe	Sérovar
Australis	Australis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Bratislava		Copenhagani
	Muchen		Icterohaemorrhagiae
Autumnalis	Autumnalis	Panama	Panama
	Bim		Mangus
Ballum*	Castellonis	Pomona*	Pomona
Bataviae*	Bataviae		Mozdok
Canicola*	Canicola	Pyrogenes	Pyrogenes
Cynopteri	Cynopteri		Sejroe
Grippityphosa	Grippityphosa	Tarassovi*	Saxkoebing
	Vanderhoedoni		Hardjo
			Wolffi
			Tarassovi

Légende : * sérogroupes présentant un intérêt mineur non pris en compte dans l'analyse suivante

L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide des processeurs de particules magnétiques KingFisher TM Flex 96 (Thermo Scientific TM, Royaume-Uni) et du kit d'isolement universel LSI MagVet TM (Life Technologies, Royaume-Uni) et a été suivie d'une détection d'ADN de *Leptospira* pathogène par un test PCR commercial (TaqVet TM Pathogenic Leptospira®, Thermofisher, France) dans un pool d'organes selon les instructions du fabricant [Levett *et al.*, 2005].

Les réactions PCR ont été réalisées avec un Stratagene Mx3500P (Agilent Technologies, USA). Selon les instructions du fabricant, un échantillon a été considéré comme positif lorsque la valeur seuil du cycle (= Ct) était inférieure à 46.

5. MÉTHODE DE GÉNOTYPAGE DE *LEPTOSPIRA* PAR MLST (MULTILOCUS SEQUENCE TYPING) ET NGS (NEXT-GENERATION SEQUENCING)

Parmi 10 échantillons choisis au hasard (groupe des échantillons positifs en PCR temps réel), le génotypage a été réalisé dans le laboratoire Biosellal de Lyon (France) selon le schéma MLST consensuel développé par Boonsilp et ses collaborateurs [2013]. Les amplicons PCR obtenus ont été purifiés à l'aide de billes AMPure XP d'Agencourt 1,8X (Beckman Coulter). Le

fluorimètre Qubit 2.0 (technologies Life) a été utilisé pour quantifier et normaliser les concentrations d'amplicons, en tenant compte des différentes longueurs de fragments d'amplicons ; il a été suivi d'un regroupement équimolaire de tous les loci MLST pour chaque échantillon.

La préparation des bibliothèques Illumina a été réalisée avec 1 ng d'amplicons regroupés selon le protocole Nextera XT (version janvier 2015) et les bibliothèques ont été séquencées à l'aide du Séquenceur personnel MiSeq (Illumina). Les analyses bioinformatiques ont été effectuées à l'aide de l'atelier de génomique de la CLC (CLC Bio, Qiagen, Aarhus, Danemark).

La combinaison des séquences de ces sept loci a été comparée à une base de données publique, les bases de données de MLST de *Leptospira* spp. Cette publication a utilisé le site Web *Leptospira* MLST (<http://pubmlst.org/leptospira/>) développé par Keith Jolley et situé à l'Université d'Oxford [Jolley et Maiden, 2010]. Il est situé à l'Imperial College de Londres et a été financé par le Wellcome Trust à l'aide des protocoles Boonsilp et collaborateurs [2013] (MLST schème 1) pour déterminer les espèces de *Leptospira* et de séro groupe. En bref, chaque locus MLST séquencé pour un échantillon a été assigné à des numéros d'allèles et combiné en un profil allélique qui est ensuite assigné à un type de séquence unique (ST).

II - RÉSULTATS

Parmi les 42 cas d'avortement, à l'aide du panel standardisé d'analyses (tableau 1), il a été possible d'identifier un agent pathogène dans 11 cas : *Anaplasma phagocytophilum* (1), *Coxiella burnetii* (2), *Neospora caninum* (1) ainsi que sept bactéries opportunistes comme *Escherichia coli* (5), *Hafnia alvei* (1) et *Lactococcus lacti* (1). Seul un sérum maternel était séropositif pour *L. serovar Hardjo* en Elisa mais le MAT a révélé des résultats négatifs pour tous les sérogroupes testés, y compris pour le sérotype Hardjo avec de faibles titres de 40.

donné un résultat positif pour au moins un séro groupe (tableau 3). Parmi les échantillons positifs, une agglutination a été observée avec une moyenne de deux sérogroupes et un maximum de cinq sérogroupes par échantillon. Un titre de ≥ 160 a été utilisé pour définir une réaction de séropositivité, aucun résultat positif n'a été observé pour les cinq sérogroupes suivants : Ballum, Bataviae, Canicola, Pomona et Tarassovi. Les résultats ont révélé que les *L. serogroupes* Grippytyphosa et *L. Australis* étaient les plus fréquents avec respectivement 17/42 et 13/42 MAT positifs (tableau 3).

1. TEST DE MICROAGGLUTINATION

Parmi les 42 échantillons de sérum maternel, 29 ont

Tableau 3

Répartition des résultats du MAT sur les sérums de vaches testés selon les différents sérogroupes de leptospires (seuls les sérogroupes dont les résultats sont positifs sont énumérés)

Titre	Grippytyphosa	Australis	Ictero-haemorrhagiae	Autumnalis	Panama	Pyrogenes	Sejroe	Cynopteri	Hebdomadis
Négatif	25	29	36	35	37	40	39	39	41
1/160	4	2	4	2	2	1	2	3	
1/320	3	2	2	3	3	1			1
1/640	4	5		1					
1/1280	6	4		1			1		
Total positif	17	13	6	7	5	2	3	3	1
Total sera testés	42	42	42	42	42	42	42	42	42

2. LEPTOSPIRA INTERROGANS SPP. (RT-PCR)

Sur les 26 échantillons d'organes analysés, l'ADN de *Leptospira* pathogène a été détecté dans 21 cas. Parmi les 21 cas positifs à la PCR, cinq sérums étaient négatifs par rapport aux 24 sérotypes (14 sérogroupes) testés.

En ce qui concerne les cinq cas négatifs de PCR, un MAT positif a été observé dans quatre échantillons. Pour un seul échantillon, la PCR et le MAT étaient négatifs. Les résultats des tests sérologiques (MAT) et de détection moléculaire (RT-PCR) sont résumés au tableau 4.

3. GÉNOTYPAGE MLST DE LEPTOSPIRA

Parmi les 10 échantillons, deux ont été amplifiés et séquencés avec succès pour les sept loci. Pour ces deux échantillons, différents types de séquences (ST) ont été obtenus, le profil ST numéro 110 pour l'échantillon CI-14-06151536-002 et le profil ST numéro 24 pour l'échantillon CI-12-000889-002 (tableau 5). Dans la base de données *Leptospira* MLST, le profil ST numéro 110 correspond à l'espèce *Leptospira kirschneri* et au séro groupe Grippytyphosa (tableau 6), tandis que le profil ST numéro 24 correspond à l'espèce *Leptospira interrogans* et au séro groupe Australis (tableau 6).

Tableau 4
Résultats de l'analyse sérologique et antigénique selon le séro groupe *Leptospira*
(seuls les sérogroupes dont les résultats sont positifs sont énumérés,
le titre le plus élevé de chaque séro groupe étant présenté)

ID	<i>Leptospira interrogans</i> spp. (PCR)	Génotypage (MLST)	Sérogroupes de leptospires								
			AUS	AUT	CYN	GRI	HEB	ICT	PAN	PYR	SEJ
CI-11-023436			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-11-029715			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-12-000889	Pos	<i>L. interrogans</i>	640	-	-	-	-	-	640	320	-
CI-12-001123			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-13-006899			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-13-011101			-	-	-	-	-	-	-	-	160
CI-13-018383			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-13-019237			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-13-022971			-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-13-032292			-	-	-	320	-	-	-	-	-
CI-13-032707			160	-	-	640	-	-	-	-	-
CI-14-034435	Pos		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-034966	Pos		-	-	-	160	-	-	-	-	-
CI-14-037270	Neg		-	-	160	1280	-	-	-	-	-
CI-14-038297			1280	160	-	-	-	160	-	-	-
CI-14-038323			320	-	160	-	-	-	-	-	-
CI-14-038596	Pos		1280	1280	-	-	-	160	640	-	-
CI-14-040708	Neg		160	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-042496			640	-	-	320	-	-	-	-	-
CI-14-042765			-	-	-	160	-	-	-	160	-
CI-14-044328	Neg		-	-	-	640	-	-	-	-	-
CI-14-044569	Pos		-	160	-	-	320	-	-	-	1280
CI-14-044707	Pos		-	-	-	640	-	-	-	-	-
CI-14-046867			-	-	160	1280	-	-	-	-	-
CI-14-047394	Pos		-	-	-	1280	-	-	-	-	-
CI-14-047531	Pos		1280	320	-	-	-	-	160	-	-
CI-14-047968	Pos		1280	320	-	-	-	320	-	-	-
CI-14-048785	Pos		640	-	-	-	-	-	160	-	-
CI-14-049712	Pos		640	640	-	-	-	320	640	-	160
CI-14-050512	Pos		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-050870	Neg		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-057066	Pos		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-057564	Pos	*	-	-	-	640	-	-	-	-	-
CI-14-057925	Pos		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-058607			-	-	-	1280	-	-	-	-	-
CI-14-058713	Pos		-	-	-	1280	-	-	-	-	-
CI-14-061536	Pos	<i>L. kirschneri</i>	320	-	-	1280	-	-	-	-	-
CI-14-062221	Pos	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-063728	Pos	*	-	-	-	160	-	-	-	-	-
CI-14-065178	Pos		-	-	-	160	-	-	-	-	-
CI-14-067483	Pos		640	320	-	-	-	-	-	-	-
CI-14-069253	Neg		-	-	-	320	-	-	-	-	-

Légende : * Amplification et séquençage impossibles ; AUS, Australis ; AUT, Autumnalis ; CYN, Cynopteri ; GRI, Grippotyphosa ; HEB, Hebdomadis ; ICT, Icterohaemorrhagiae

Tableau 5
Nombre d'allèles uniques à chaque locus et
types de séquences des deux souches de leptospires pathogènes

Échantillons	Nombre d'allèles uniques à chaque locus							Type de séquence MLST
	glmU	pntA	sucA	tpiA	pfkB	mreA	caiB	
CI-14-061536-002	19	20	13	22	31	18	23	110
CI-12-000889-002	1	4	2	1	5	3	4	24

Tableau 6
Liste des souches, des sérogroupes et des sérovars correspondants dans la base de données MLST de leptospires appartenant aux profils ST 110 et 24

Souche	Profil ST	glmU	pntA	sucA	tpiA	pfkB	mreA	caiB	Sérogroupe	Sérovar
<i>L. Kirschneri</i>										
Kipod 179	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Vanderhoedeni
M631	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
Duyster	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Vanderhoedeni
Moska V	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
181 PG	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
617 PG	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
859 PG	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
1106 PG	110	19	20	13	22	31	18	23	Grippotyphosa	Grippotyphosa
<i>L. interrogans</i>										
Jez Bratislava	24	1	4	2	1	5	3	4	Australis	Bratislava
München C 90	24	1	4	2	1	5	3	4	Australis	Muenchen
Jalna	24	1	4	2	1	5	3	4	Australis	Jalna

III - DISCUSSION

Les résultats du MAT et de la PCR appuient l'hypothèse que l'ictère observé chez les fœtus était dû à une infection par des leptospires. De plus, aucune autre cause d'avortement n'a été identifiée malgré la grande diversité des analyses.

Le MAT est le test sérologique de référence, particulièrement approprié pour la réalisation d'études épidémiologiques, puisqu'il peut être appliqué aux sérums de n'importe quelle espèce animale et que la gamme d'antigènes utilisés peut être étendue ou réduite au besoin [Levett, 2004]. La plupart des cas de leptospirose sont diagnostiqués par sérologie et les anticorps sont détectables dans le sang environ 5 à 7 jours après l'apparition des signes cliniques. Dans nos conditions,

l'échantillonnage a été effectué au moment de l'avortement mais la présence d'ictère indiquait une infection antérieure qui pourrait expliquer le titre relativement élevé observé en MAT.

Australis et Grippotyphosa sont identifiés comme les deux sérogroupes prédominants dans cette étude. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de deux autres études récentes, en Allemagne sur les chiens [Mayer-Scholl *et al.*, 2013] et en France sur les chiens et les bovins [Ayrat *et al.*, 2014]. En France, les deux sérogroupes infectieux prédominants impliqués dans la leptospirose clinique bovine et canine de 2008 à 2011 sont également Australis et Grippotyphosa pour ces deux espèces.

En moyenne, les sérums montrent une réaction positive à deux sérogroupes avec un maximum de cinq. En effet, les MAT constituent un test complexe à maîtriser, à exécuter et à interpréter. Il s'agit d'un test spécifique au séro groupe, mais l'interprétation des MAT est compliquée par le degré élevé de réaction croisée qui se produit entre les différents sérogroupes, particulièrement dans les échantillons en phase aiguë. Cette réaction "paradoxe", dans laquelle les titres les plus élevés sont détectés chez un séro groupe non apparenté au séro groupe infectieux, est également courante et étudiée [Blanco *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 1997]. La large réactivité croisée dans la phase aiguë est suivie d'une spécificité relative des sérogroupes dans les échantillons en phase convalescente [Levett, 2001]. Ensuite, une moyenne de deux sérogroupes par échantillon semble relativement élevée par rapport à d'autres études où un seul sérotype est mis en évidence. Mais cette observation plaide en faveur d'une réaction paradoxale due aux IgM lors d'une infection aiguë. Malheureusement, les sérums appariés ne sont pas disponibles pour confirmer avec certitude le séro groupe infecté. De plus, un résultat positif ne permet pas d'identifier avec certitude la cause des avortements et il est impossible de dater l'infection, la cinétique de réaction par rapport aux différents sérovars peut varier [Levett, 2001].

Afin d'assurer l'implication des bactéries dans le processus abortif, la PCR a été réalisée et l'ADN bactérien a été détecté dans la grande majorité des cas. À la suite de ces analyses PCR, différents profils combinant PCR et MAT sont observés. Ces profils peuvent dépendre du délai entre l'infection et l'avortement, de l'immunité des animaux infectés, du type de sérogroupes concernés ou des tests de laboratoire.

Au total, dans la grande majorité des cas, les deux analyses apportent une réponse positive et soutiennent le diagnostic de leptospirose.

En raison des difficultés associées à l'identification sérologique des isolats de leptospires, les méthodes moléculaires d'identification et de sous-typage ont suscité un grand intérêt [Terpstra, 1992 ; Herrmann, 1993]. La reclassification des leptospires pour des raisons génotypiques est correcte du point de vue taxonomique et constitue une base solide pour les classifications futures. Le génotypage de deux espèces de *Leptospira* est un point clé qui permet de connaître avec certitude l'espèce infectante. *Leptospira interrogans* et *Leptospira kirschneri* ont été génotypés et ont une réponse positive au séro groupe Australis et Grippytyphosa

respectivement. Ces résultats concordent avec ceux de la base de données *Leptospira* MLST.

Au cours de cet épisode en 2014, de nombreuses questions ont été posées quant à la distribution presque simultanée sur un vaste territoire d'une maladie qui n'a pas le pouvoir de dissémination d'un arbovirus. La maladie est maintenue dans la nature par l'infection chronique des hôtes réservoirs. Les hôtes du réservoir les plus importants sont les petits mammifères, qui peuvent transmettre l'infection aux animaux d'élevage domestiques, aux chiens et à l'Homme. Différentes espèces de rongeurs peuvent servir de réservoir des sérogroupes mis en évidence dans cette étude [Levett, 2001]. Des variations distinctes dans les hôtes des réservoirs et les sérovars qu'ils transportent se produisent partout dans le monde [Hartskeerl et Terpstra, 1996]. Actuellement, la source de l'infection reste inconnue et complique donc l'utilité de la mise en œuvre des mesures préventives. Dans les fermes touchées, un seul cas de fœtus avorté de bovins a été identifié dans 95 % des fermes, avec un maximum de trois cas dans une ferme [Delooz *et al.*, 2015]. Cela permet d'émettre l'hypothèse que l'infection ne se propage pas à l'ensemble du troupeau par d'autres bovins qui ne semblent donc pas être des hôtes d'entretien potentiels. Le spectre des signes cliniques est extrêmement large. Auparavant, on considérait que des syndromes distincts étaient associés à des sérogroupes spécifiques. Cependant, cette hypothèse a été remise en question par certains auteurs et les études suivantes ont réfuté cette hypothèse [Levett, 2001]. Grippytyphosa et Australis sont les deux principaux sérogroupes révélés lors de cet événement émergent associé au même schéma clinique, ce qui rejoint l'idée que les syndromes ne sont pas associés à des sérogroupes spécifiques. Cependant, l'ictère congénital des fœtus avortés est un nouveau signe clinique à ajouter à ceux causés par des leptospires pathogènes.

Les résultats de cette étude ont indiqué que le séro groupe Sejroe était rarement diagnostiqué et que les méthodes de diagnostic de la leptospirose doivent être adaptées pour une meilleure surveillance et une meilleure maîtrise. Ce résultat suggère que le vaccin bovin disponible ciblant ce séro groupe est capable de prévenir une minorité de cas cliniques. Néanmoins, d'autres sérogroupes, tels que Grippytyphosa et Australis, devraient être inclus dans le vaccin pour limiter l'expression clinique des maladies liées à l'infection par *Leptospira* chez les bovins.

IV - CONCLUSION

L'ictère était un signe clinique connu de leptospirose, mais il n'avait jamais été diagnostiqué chez les fœtus bovins dans la littérature. Ce travail permet d'associer deux espèces pathogènes de *Leptospira* (*L. interrogans* ou *L. kirschneri*) à un ictère congénital chez les fœtus avortés de bovins. Ce nouveau signe clinique peut être ajouté au tableau clinique de la leptospirose bovine.

Les leptospires sont souvent difficiles à isoler des bovins infectés et le diagnostic dépend donc généralement de la détection d'anticorps spécifiques. Ces travaux ont montré une méthode réalisable

d'approche diagnostique directe dans des conditions de terrain où le vétérinaire praticien effectue des prélèvements dans des élevages bovins.

Enfin, bien que les sources d'infection lors de l'émergence restent inconnues, cette étude a fourni des informations utiles dans la connaissance de la leptospirose bovine dans la région du sud de la Belgique. Il semble nécessaire d'être prêt à prendre des mesures de prévention et de contrôle et à étudier davantage l'épidémiologie de cette maladie dans cette région, en particulier chez les rongeurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler B. - *Leptospira* and Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2010, **387**, 1-293.
- Ayral F.C., Bicout D.J., Pereira H., Artois M., Kodjo A. - Distribution of *Leptospira* serogroups in cattle herds and dogs in France. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2014, **91**, 756-759.
- Blanco R.M., dos Santos L.F., Galloway R.L., Romero E.C. - Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2016, **44**, 34-36.
- Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P., Wuthiekanun V., Bailey M.S., Holden M.T., Zhang C., Jiang X., Koizumi N., Taylor K., Galloway R., Hoffmaster A.R., Craig S., Smythe L.D., Hartskeerl R.A., Day N.P., Chantratita N., Feil E.J., Aanensen D.M., Spratt B.G., Peacock S.J. - A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, **7**(1), e1954.
- Brenner D.J., Kaufmann A.F., Sulzer K.R., Steigerwalt A.G., Rogers F.C., Weyant R.S. - 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* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 839-858.
- Chappel R.J., Goris M., Palmer M.F., Hartskeerl R.A. - Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*, 2004, **42**, 5484-5488.
- Delooz L., Mori M., Petitjean T., Evrard J., Czaplicki G., Saegerman C. - Congenital jaundice in bovine aborted foetuses: an emerging syndrome in southern Belgium. *Transboundary and emerging diseases*, 2015, **62**, 124-126.
- Dom P.P., Haesebrouck F., Vandermeersch R., Descamps J., Van Ommeslaeghe K. - Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo antibodies in milk in Belgian dairy herds. *The Veterinary quarterly*, 1991, **13**, 118-120.
- Ellis W.A., Michna S.W. - Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to the Hebdomadis serogroup. *Research in veterinary science*, 1977, **22**, 229-236.
- Ellis W.A., O'Brien J.J., Neill S.D., Bryson D.G. - Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection. *Veterinary microbiology*, 1986, **11**, 293-299.
- Evangelista K.V., Coburn J. - *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future microbiology*, 2010, **5**, 1413-1425.
- Guerra M.A. - Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2009, **234**, 472-478, 430.
- Hartman E.G., Franken P., Bokhout B.A., Peterse D.J. - [Leptospirosis in cattle; milker's fever in

- cattle farmers]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 1989, **114**, 131-135.
- Hartskeerl R.A., Terpstra W.J. - Leptospirosis in wild animals. *The Veterinary quarterly*, 1996, **18** Suppl 3, S149-150.
- Herrmann J.L. - Genomic techniques for identification of *Leptospira* strains. *Pathologie-biologie*, 1993, **41**, 943-950.
- Jolley K.A., Maiden M.C. - BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC bioinformatics*, 2010, **11**, 595.
- Levett P.N. - Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*, 2001, **14**, 296-326.
- Levett P.N. - Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2004, **4**, 435-448.
- Levett P.N., Morey R.E., Galloway R.L., Turner D.E., Steigerwalt A.G., Mayer L.W. - Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, **54**(1), 45-49.
- Levett P.N. - Systematics of *Leptospiraceae* p. 11-20. In Ben Adler. *Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- Lin M., Surujballi O., Nielsen K., Nadin-Davis S., Randall G. - Identification of a 35-kilodalton serovar-cross-reactive flagellar protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-terminal sequencing, gene cloning, and sequence analysis. *Infection and immunity*, 1997, **65**, 4355-4359.
- Mayer-Scholl A., Luge E., Draeger A., Nockler K., Kohn B. - Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector borne and zoonotic diseases*, 2013, **13**, 200-202.
- Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L., Steigerwalt A.G., Mayer L.W., Levett P.N. - Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 2006, **44**, 3510-3516.
- Mori M., Esbroeck M., Depoorter S., Decaluwe W., Vandecasteele S.J., Fretin D., Reynders M. - Outbreak of leptospirosis during a scout camp in the Luxembourg Belgian province, Belgium, summer 2012. *Epidemiology and infection*, 2015, **143**, 1761-1766.
- OIE - Terrestrial Manual, 2014: Leptospirosis. Available atw: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf 2014 (accessed 19 November 2015).
- Ryan E.G., Leonard N., O'Grady L., Doherty M.L., More S.J. - Herd-level risk factors associated with *Leptospira Hardjo* seroprevalence in Beef/Suckler herds in the Republic of Ireland. *Irish veterinary journal*, 2012, **65**, 6.
- Smith C.R., McGowan M.R., McClintock C.S., Corney B.G., Ketterer P.J., Smythe L., Ward W. - Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection of pregnant cattle. *Australian veterinary journal*, 1997, **75**, 822-826.
- Terpstra W.J. - Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leidensia*, 1992, **60**, 79-87.



Remerciements

Nous remercions Magnée D. (ThermoFisher, UK) de nous avoir fourni des kits PCR. Nous remercions l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) d'avoir pris en charge les coûts du protocole de base correspondant au panel d'analyses standardisé. Les auteurs remercient chaleureusement leurs collègues vétérinaires de l'ARSIA, à savoir Christian Quinet (sérologie), Marc Saulmont et Thierry Petitjean (autopsie et microbiologie) pour leur assistance technique.