



Rapport annuel d'activité

2015

**Centre National de Référence
de la Leptospirose**

Année d'exercice

2014

Responsables : M. Picardeau
P. Bourhy

Techniciennes : F. Zinini
S. Brémont
A. Landier

Secrétaire : S. Murguet

Nous remercions :

Dr. D. Van Cauteren et A. Septfons (InVS)
Dr C. Delmas (CHU de Toulouse)
Dr M. Brun (Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier)
Dr L. Collet (CH de Mayotte, Mamoudzou)
Dr. H.P. Mallet (Direction de la santé, Papeete)
O. Schaal (Laboratoire Biomnis, Lyon)
Dr J.M. Estavoyer (CHRU de Besançon)
Dr A.C. Gourinat et Dr C. Goarant (Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa)
Dr J.P. Grangeon (Direction des affaires sanitaires et sociales de la Nouvelle-Calédonie)
Dr A. Berlioz-Arthaud (Institut Pasteur de la Guyane)
Dr C. Herrmann (CHU Les Abymes, Pointe-à-Pitre)
Dr R. Théodose, Dr C. Olive et Dr P. Hochedez (CHU de Fort de France)
Dr M.C. Jaffar-Bandjee (CHD Félix Guyon, Saint Denis de la Réunion)
Dr A. Kodjo (VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile)
Dr A. Léon (Laboratoire départemental Frank Duncombe, Caen)
Dr F. Pagès (ARS Océan Indien)
Dr A. Michault (GH Sud Réunion, Saint Pierre de la Réunion)
Dr S. Trombert-Paolantoni (Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise)

pour leurs précieuses collaborations pour l'élaboration du rapport annuel

Résumé

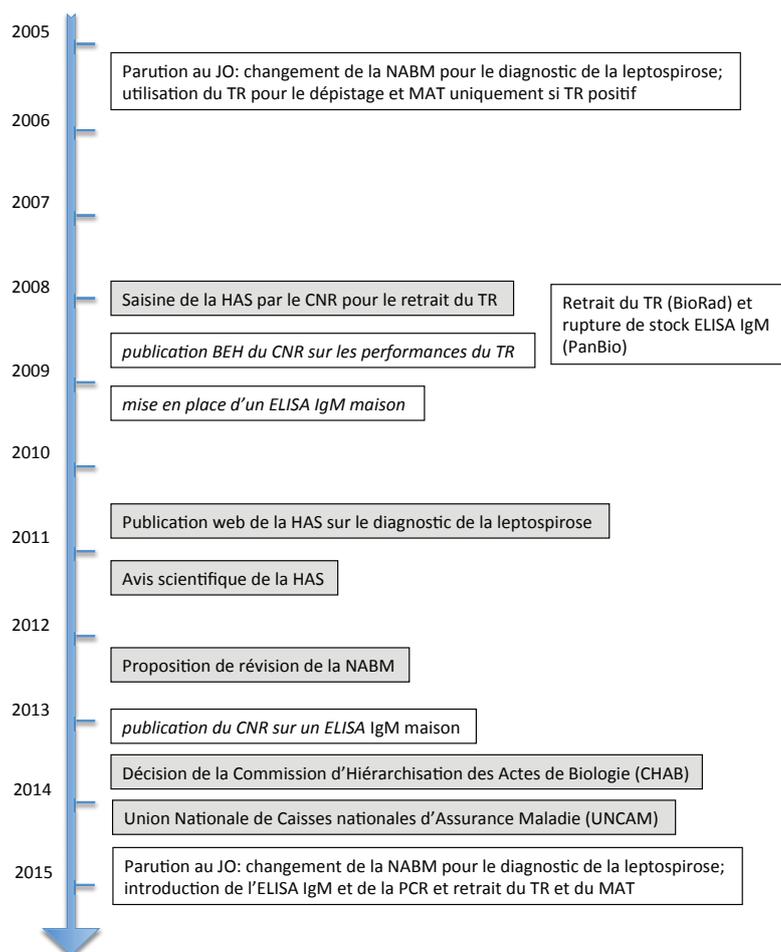
Au cours de l'année 2014, le CNR de la Leptospirose qui est aussi un Centre Collaborateur de l'OMS de la Leptospirose a reçu plus de 4 000 échantillons pour identification bactérienne ou diagnostic de la leptospirose par sérologie ou PCR.

Pour l'année 2014, un total de 628 cas de leptospirose a été recensé en Métropole, soit une incidence estimée de 0,98 / 100 000 habitants, soit la plus forte incidence enregistrée depuis qu'une surveillance est mise en place en Métropole. Cette année record fait suite à une incidence pour 2013 qui était déjà la plus élevée depuis la 2^{ème} guerre mondiale. Cette augmentation du nombre de cas est retrouvée dans d'autres pays européens et pourrait être due au réchauffement climatique et à l'augmentation des comportements à risques (sports aquatiques, etc). Comme les années précédentes, le sérotype Icterohaemorrhagiae est le principal sérotype retrouvé chez les cas diagnostiqués par la sérologie par micro-agglutination (MAT). Pour ce qui est des départements et territoires ultramarins, 761 cas ont été recensés dans les régions Outre-Mer (Martinique, Guadeloupe, Guyane, Polynésie, Mayotte, Ile de La Réunion, Nouvelle Calédonie). L'incidence est de 10 fois (La Réunion, Nouvelle-Calédonie) à plus de 30 fois (Polynésie Française, Mayotte, Guyane, Guadeloupe, Martinique) plus élevée qu'en Métropole. On retrouve le caractère saisonnier de la leptospirose avec l'apparition de pics épidémiques lors de la saison des pluies ou de phénomènes climatiques inhabituels tels que les ouragans. Le sérotype Icterohaemorrhagiae est dominant dans la plupart des régions mais on retrouvera, exceptionnellement, des particularités locales comme à Mayotte. Dans l'ensemble, on notera une sous-estimation du nombre de cas largement dépendante du système de surveillance mis en place et de la sensibilisation des médecins locaux à la maladie. Il faut aussi noter que depuis septembre 2014, il y a un changement de la nomenclature des actes de biologie médicale pour le diagnostic de la leptospirose : la technique de MAT n'est plus remboursée et la PCR et l'ELISA IgM sont maintenant remboursés par l'assurance maladie. Cette modification devrait entraîner, à court terme, une perte d'information sur les souches qui circulent ; en effet, seul le MAT qui n'est maintenant plus remboursé peut aujourd'hui permettre d'identifier le sérotype.

1 Missions et organisation du CNR

Le Centre National de Référence (CNR) de la Leptospirose, qui est aussi un Centre Collaborateur de l'OMS, contribue à la surveillance épidémiologique de la leptospirose humaine en France métropolitaine et d'outre-mer. Il assure l'alerte en cas de recrudescence inhabituelle ou d'apparition de cas groupés. Il a également une mission d'expertise en garantissant l'identification des souches isolées en pathologie humaine, en développant des techniques permettant d'améliorer à la fois le diagnostic de la maladie et le typage des souches.

Figure 1: Changement de la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale pour le diagnostic de la leptospirose.



Depuis le changement de la nomenclature des actes de biologie médicale pour le diagnostic de la leptospirose en 2005, le test de macroagglutination TR était utilisé en première intention comme test de dépistage. Le test de référence de microagglutination MAT n'était donc pas remboursé s'il était utilisé en première intention (hors nomenclature). Le CNR a montré que les performances de ce test TR n'étaient pas satisfaisantes (Picardeau *et al.* 2008. Impact du changement de nomenclature médicale sur le diagnostic et la surveillance de la leptospirose en France. BEH n°37) et il a saisi la HAS pour le retrait de ce test de la nomenclature en 2008. A la même période, la commercialisation du test TR fut stoppée en raison de problèmes de stabilité du réactif et une procédure dérogatoire provisoire a été mise en place par l'Assurance Maladie pour ne pas s'opposer à la prise en charge du MAT en absence de réalisation du test de dépistage. A partir de 2009, le CNR a développé un nouveau test ELISA IgM qui remplace avantageusement le test TR et permet le diagnostic précoce de la leptospirose (Bourhy *et al.* 2013. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. J. Med. Microbiol. 62:

822-827). Depuis le dépôt de notre dossier pour la révision de la nomenclature, la HAS a émis un avis et rédigé un document sur le diagnostic de la leptospirose. Le dossier a ensuite été évalué par la Commission de Hiérarchisation des Actes de Biologie médicale (CHAB) en 2013 et une décision a été prise par l'Union Nationale de Caisses nationales d'Assurance Maladie (UNCAM) début 2014. Le Journal Officiel du 14 août 2014 a publié un changement de la NABM pour le diagnostic de la leptospirose : la PCR (B100) et l'ELISA IgM (B40) sont maintenant remboursés par l'assurance maladie ; par contre le MAT ne figure plus parmi les actes remboursés. Cette modification est applicable au 4 septembre 2014 (**Figure 1**).

Le CNR est engagé depuis plusieurs années dans une démarche Qualité. Suite au dépôt d'un dossier auprès du COFRAC pour l'accréditation de la technique de microagglutination ou Microscopic Agglutination Test (MAT) à la norme ISO 15189, le CNR de la leptospirose a été audité les 14-17 octobre 2013. Le CNR de la leptospirose et 4 autres CNRs de l'Institut Pasteur et la CIBU ont ainsi obtenu l'accréditation ISO 15189 en mars 2014 sous la dénomination de Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LRE-MS). Nous avons maintenant déposé un dossier pour l'accréditation de la technique ELISA IgM et nous avons été évalués par le COFRAC les 26-28 janvier 2015. Nous avons mis en place un contrôle européen (en plus du contrôle MAT international déjà existant) pour le MAT, l'ELISA IgM et la PCR.

Depuis janvier 2013, l'InVS a mis en place le transfert régulier et automatisé des résultats biologiques des principaux laboratoires de biologie médicale (CERBA et BIOMNIS) pour 11 maladies dont la leptospirose. Les données ainsi disponibles tous les mois (et non plus une fois par an, après demande auprès des laboratoires pour la rédaction du rapport annuel, comme cela était le cas avant 2013) devraient permettre une meilleure surveillance épidémiologique. Le transfert régulier de ces données de l'InVS au CNR a été mis en place début 2015.

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

- Techniques développées ou en développement

Génotypage par amplification de régions contenant des séquences répétées ou Variable Number of Tandem Repeats (VNTR). Cette technique que nous avons déjà développée pour les espèces pathogènes *L. interrogans*, *L. kirschneri*, et *L. borgpetersenii* (Salaun *et al.* 2006 JCM 44:3954-62) est maintenant appliquée à l'espèce pathogène *L. santarosai* (Hamond *et al.* 2014. A Multi Locus VNTR Analysis assay provides high discrimination for genotyping *Leptospira santarosai* strains. J Mol Microbiol. sous presse).

Un test de diagnostic rapide (TDR) de type immunochromatographique pour la détection des IgM a été mis au point et validé en collaboration avec les équipes de la plateforme 5 de l'Institut Pasteur, l'Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie et notre CNR. L'antigène utilisé et breveté est le même que celui utilisé pour notre ELISA IgM maison à savoir *L. fainei* sérovar Hurstbridge. Ces bandelettes prototypes ont donné des résultats très encourageants avec une sensibilité de 90 % et une spécificité de 94 % (Goarant *et al.* 2013, Sensitivity and specificity of a new DipStick assay for the serological diagnosis of human leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis 7: e2289). Une étude à plus grande échelle est en cours avec une production des TDR à l'Institut Pasteur de Madagascar. Ces bandelettes ont été envoyées à l'île de La Réunion et Mayotte. Le but de cette étude est la validation de ce test dans plusieurs laboratoires répartis à travers le monde, afin de mettre à disposition un test fiable utilisable facilement dans les pays en voie de développement où le test de référence n'est pas disponible.

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

L'ELISA IgM maison que nous avons développé (Bourhy *et al.* 2013. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol.62:822-7) a été transféré dans de nombreux laboratoires :

- Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine - ULB (Bruxelles, Belgique)
- CHU de Fort de France (Martinique)
- Institut Pasteur de Madagascar
- Institut Pasteur d'Alger (Algérie)
- Institut Pasteur de Casablanca (Maroc)
- Universidad Federal Fluminense (Rio de Janeiro, Brésil)

2.2 Activités d'expertise de l'année 2014

Métropole (1 souche)

CNR de la Leptospirose (à partir d'un prélèvement envoyé pour PCR)

1 souche de *L. kirschneri* sérovar Grippytyphosa

Martinique (2 souches)

CHU de Fort-de-France

1 souche de *L. santarosai* séro groupe Celledoni génotype I

1 souche de *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageneri génotype A

Mayotte (33 souches)

CH Mamoudzou

12 souches de *L. borgpetersenii* séro groupe Mini

6 souches de *L. mayottensis* génotype ST5/ST7 (séro groupe indéterminé)

5 souches de *L. mayottensis* (séro groupe indéterminé)

1 souche de *L. borgpetersenii* séro groupe Pomona génotype (ST10/ST15)

1 souche de *L. kirschneri* séro groupe Grippytyphosa génotype ST6

Typage génotypique (37 ADNs extraits de prélèvements sanguins)

Polynésie Française (7 ADNs)

CH de Polynésie française

1 ADN de *L. interrogans* sérovar Ballico (séro groupe Australis)

1 ADN de *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni

5 ADNs de *L. interrogans* (séro groupe/sérovar indéterminé)

Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.

Dr Marie-Christine Jaffar Bandjee, Centre Hospitalier Felix Guyon, Ile de La Réunion

2 souches de leptospires

Dr. Damien Dubois, Institut Fédératif de Biologie, Toulouse

9 souches de leptospires

Dr. Jim Matsunaga, Veterans Affairs Greater Los Angeles, Los Angeles (Etats-Unis)

6 souches de leptospires

Dr. Elsie Wunder - Yale School of Public Health, New Haven (Etats-Unis)

18 souches de leptospires

Anissa Amara-Korba, Institut Pasteur d'Alger, Algérie

28 souches de leptospires

Dr. Hoang Thi Thu Ha, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam

24 souches de leptospires

Ronan Jambou, Institut Pasteur de Madagascar, Madagascar

1 souche de leptospire

Dr. Chantal Roure Sobas, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon

9 souches de leptospires

Mme Oriane Schaal, BIOMNIS, Lyon

2 souches de leptospires

Participation à un essai inter-laboratoires (6 sérums) :

Dr. Rudy Hartskeerl, KIT Biomedical Research, Amsterdam, Pays-Bas

Dr. Marcella Mori, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Bruxelles, Belgique

Dr. Angeli Kodjo, Laboratoire des Leptospires, Campus Vétérinaire - VetAgro Sup, Marcy l'Etoile

M. Merlet, Laboratoire ACSEDIATE, Maisons-Alfort

Envois hebdomadaires d'une série de 12 antigènes

Autres expertises

Contrôle de lots de milieu de culture pour leptospires (EMJH) commercialisés par la société Bio-Rad®.

Contrôle de l'identité de la souche rentrant dans la composition du vaccin humain par la société Imaxio.

Contrôle de l'identité des souches rentrant dans la composition du vaccin chien par la société Merial.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

L'activité diagnostique est assurée par :

- Le CNR

Le CNR contribue largement au diagnostic de la maladie par la sérologie et l'identification des cultures. Les prélèvements sont envoyés au CNR directement par les laboratoires privés ou hospitaliers ou sont reçus par l'intermédiaire du laboratoire CERBA. Pour chaque demande de sérologie, le CNR effectuait l'ELISA IgM et le MAT. Cependant, depuis septembre 2014 et le changement de nomenclature des actes de biologie médicale, l'ELISA IgM est maintenant utilisé comme test de dépistage, puis le MAT est utilisé pour confirmer les sérums positifs ou douteux. En 2014, le CNR a aussi mis en place le diagnostic par PCR. Pour 2014, le CNR a réalisé 3 744 analyses sérologiques humaines, 135 PCR, ainsi que le typage de 120 souches ou ADNs pour typage (**Figure 2**). Pour les identifications, on notera une augmentation des demandes de génotypage à partir d'ADNs extraits de prélèvements sanguins.

- Un réseau de partenaires biologistes pratiquant le diagnostic :

En Métropole :

- Toulouse : Laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU (Dr C. Delmas). 2 cas dépistés en sérologie MAT.

- Lyon/Paris : Laboratoire Biomnis (Mme O. Schaal) : Pour 2 402 échantillons testés en MAT, 177 positifs en sérologie MAT. A partir de septembre 2014, mise en place d'un ELISA IgM (kit Serion) : 463 analyses de dépistage par ELISA IgM : 401 résultats négatifs (<15) - 12 résultats limites (compris entre 15 et 20) - 50 résultats positifs (>20 UI/ml). Pour la PCR, 32 échantillons positifs sur 420 testés. Le nombre d'échantillons positifs par PCR ou sérologie est stable par rapport à l'année précédente. L'ensemble de ces analyses concerne la métropole et les territoires d'Outre-Mer.

- Cergy-Pontoise : Laboratoire CERBA (Dr S. Trombert-Paolantoni) : 969 PCR ont été réalisées dont 61 se sont révélées positives. 5 339 demandes de sérologies ont été reçues ; parmi celles-ci, 546 se sont révélées positives (+189 douteux) par dépistage des IgM (kit ELISA Serion). L'ensemble des analyses concerne la métropole et les territoires d'Outre-Mer.

En Outre-mer :

- Guadeloupe. Le CHU de Pointe-à-Pitre (Dr C. Herrmann-Storck) a réalisé 679 analyses (ELISA IgM et/ou PCR) en 2014 (1 037 analyses en 2013) : 13 échantillons ont été positifs par PCR et 114 séropositifs par ELISA IgM (kit Serion). Les ELISA positifs ou douteux sont envoyés au CNR pour infirmation/confirmation du diagnostic par le MAT.

- Martinique : le CHU de Fort-de-France a diagnostiqué 19 cas par PCR (232 demandes) et a aussi isolé deux souches.

- Guyane. Institut Pasteur de la Guyane (Dr A. Berlioz-Arthaud) : 218 sérologies ont été traitées par ELISA IgM (PanBio) et 25 sérums positifs/douteux ont été envoyés au CNR pour infirmation/confirmation du diagnostic par le MAT.

- La Nouvelle-Calédonie : le Centre de Biologie Médicale (Dr A.C. Gourinat) de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) effectue la totalité des diagnostics de Nouvelle-Calédonie. Pour 2014, 20 cas confirmés, 19 par PCR et 1 par sérologie.

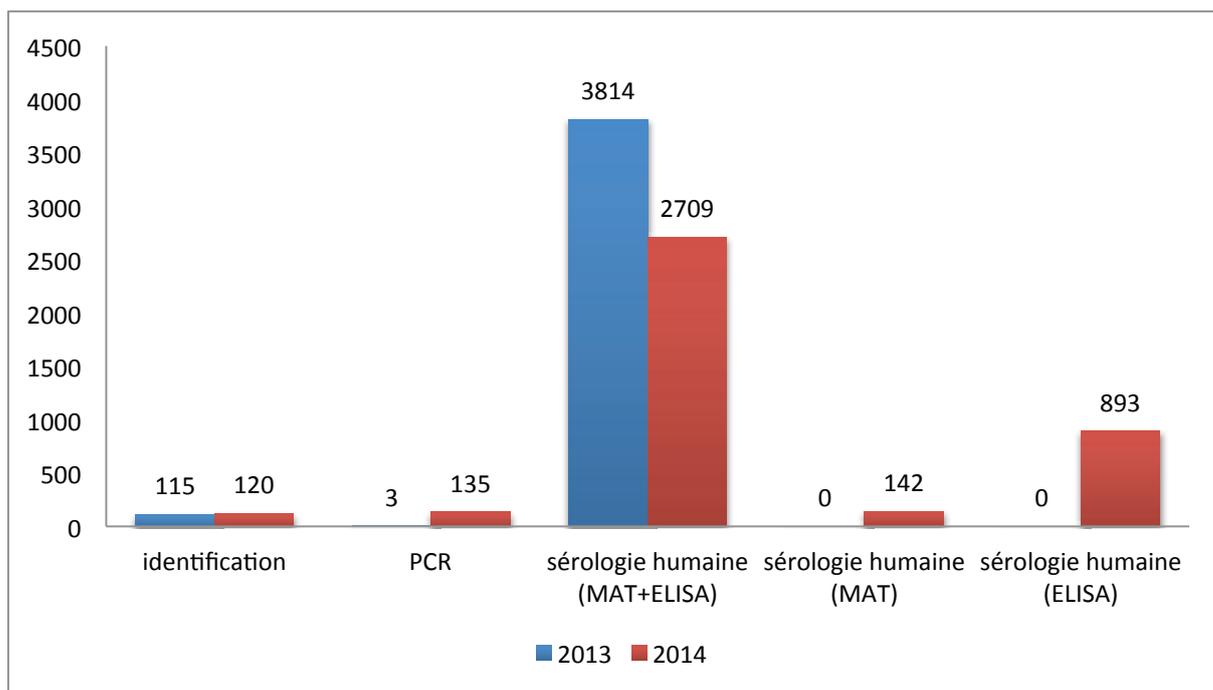
- Ile de La Réunion : 61 cas diagnostiqués par le Laboratoire du CH Sud

Réunion (Dr A. Michault), l'Hôpital Félix Guyon CHR de la Réunion (Dr M.C. Jaffar-Bandjee), le Groupe Hospitalier Est Réunion (15 échantillons positifs) et le Centre hospitalier Gabriel Martin ; dont 54 par PCR (voir rapport Cellule de l'InVS-Région Océan Indien en annexe).

- Mayotte : le Centre Hospitalier de Mamoudzou a effectué 2436 demandes PCR, dont 104 sont positives (Dr L. Collet). Les sérologies ont été envoyées à Cerba et au CNR.

- Polynésie Française : 135 cas diagnostiqués à l'Institut Territorial Louis Mallardé (Dr. D. Musso) et au CH de Polynésie française (Dr. S. Lastère), dont 85 confirmés par PCR et 50 cas probables par ELISA IgM.

Figure 2: Analyses effectuées au CNR en 2013 et 2014.



- Définition des cas

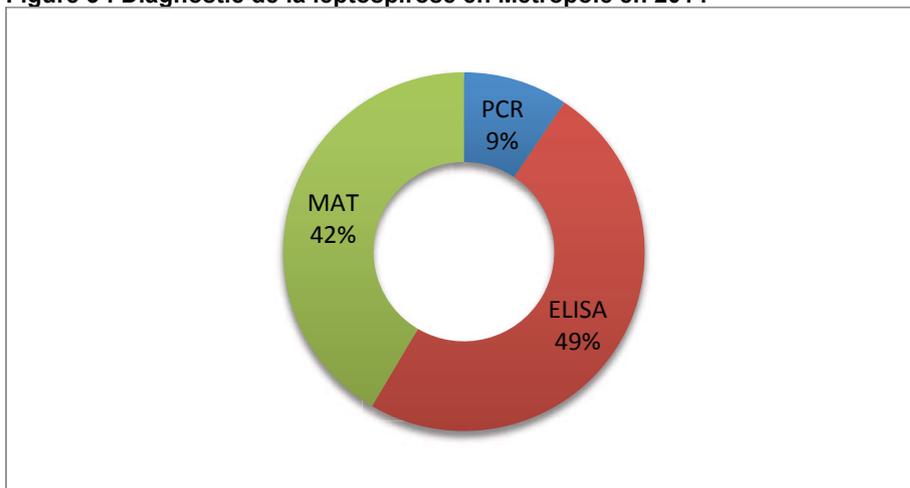
Les cas comptabilisés dans notre rapport incluent les cas avec une clinique évocatrice pour lesquels il a été mis en évidence la bactérie (en culture) ou son génome (par PCR) ou une sérologie positive par ELISA IgM (PanBio, Serion, ou ELISA maison) ou MAT (**Figure 3**). Pour la sérologie MAT, le seuil de 1/100 avec au moins un séro groupe pathogène est retenu en métropole et dans les régions d'outre-mer (Guyane, Martinique, Guadeloupe, Mayotte) excepté La Réunion et la Nouvelle-Calédonie où le seuil de 1/400 est retenu. La détermination du séro groupe est donnée par l'antigène donnant le titre le plus élevé en MAT.

- Analyse de la distribution des cas et analyse des tendances

Pour 2014 en métropole, plus de 75 % des cas sont des hommes, l'âge moyen est de 45 ans (8-85 ans). Pour les cas documentés (262 fiches épidémiologiques remplies reçues au CNR), 94 % des cas n'avaient pas effectué de voyages le mois précédant l'apparition des symptômes. Pour les autres cas, un voyage en région endémique (Asie du Sud-Est, Antilles ou Océan Indien) est reporté.

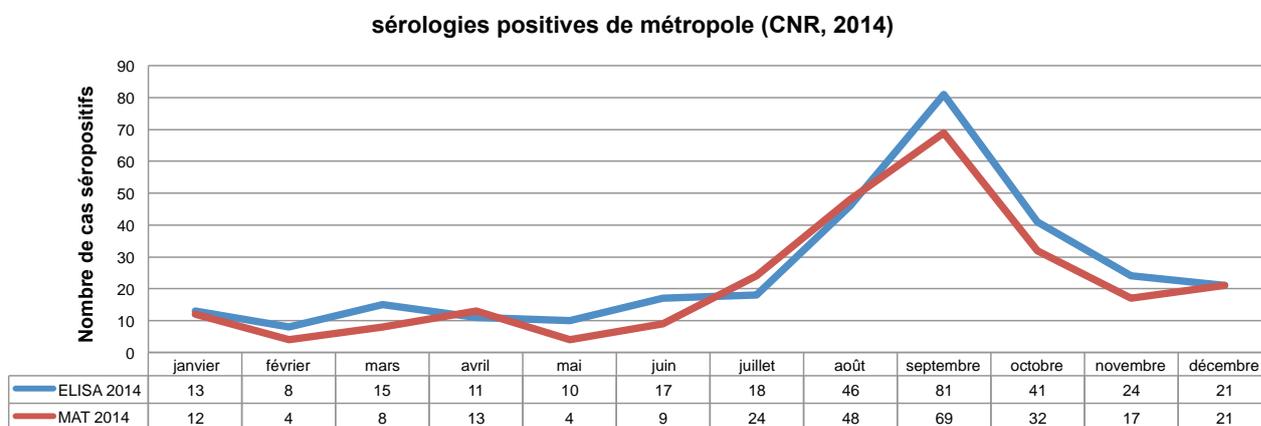
Comme en 2013, environ 10 % des cas en métropole ont été diagnostiqués par PCR sans qu'il soit possible d'identifier le sérovar/sérogroupe en cause. Pour la sérologie, depuis le changement de la nomenclature des actes de biologie médicale, l'ELISA IgM est maintenant utilisé seul, sans confirmation par le MAT.

Figure 3 : Diagnostic de la leptospirose en Métropole en 2014



Le changement de NABM a considérablement modifié le diagnostic de la leptospirose (Figures 2 et 3). Ainsi, l'ELISA IgM est maintenant largement utilisé depuis septembre 2014, remplaçant le MAT. Au CNR, nous utilisons un ELISA "maison" qui a des performances similaires au MAT (Bourhy et al. 2013 JCM) (Figure 4). On sait cependant que l'ELISA IgM détecte les cas positifs plus précocement. Nous devons déterminer la sensibilité et la spécificité des kits ELISA commerciaux utilisés par les laboratoires Biomnis et Cerba afin d'évaluer s'ils contribuent, ou non, à une surestimation du nombre de cas. De par nos analyses sur les 4 derniers mois de 2014 (Figure 4), l'influence du changement du NABM sur la recrudescence du nombre de cas en 2014 semble mineure. Ainsi, en août 2014 (avant le changement de nomenclature), le CNR avait déjà comptabilisé deux fois plus de cas qu'en août 2013.

Figure 4: Sérologies positives par ELISA IgM et MAT parmi les sérums de métropole reçus au CNR en 2014.



Le remplacement progressif du MAT par l'ELISA entraîne une perte d'information sur les sérogroupes infectants. Pour les cas diagnostiqués par le MAT, le sérotype Icterohaemorrhagiae est prédominant, suivi des sérogroupes Canicola, Grippotyphosa et Australis (Figure 5). Pour 53/252 (21%) des cas, le sérotype n'a pu être identifié à cause de réactions croisées ou co-agglutinations. Enfin, 1 seule culture a été isolée en métropole ; la souche appartient à *L. kirschneri* sérovar Grippotyphosa.

Figure 5: Répartition des principaux sérogroupes identifiés par MAT parmi les cas positifs en 2013 (bleu) et 2014 (rouge).

AUS, Australis ; CAN, Canicola ; GRI, Grippytyphosa ; ICT, Icterohaemorrhagiae; HEB, Hebdomadis; BAL, Ballum; SEJ, Sejroe; PAN, Panama; POM, Pomona; PYR, Pyrogenes; DJA, Djasiman; LOU, Louisiana; SHA, Sharmin; SHER, Shermani; BAT, Bataviae; MIN, Mini; SAR, Sarmin; CYN, Cynopteri; JAV, Javanica; CEL, Celddoni; DJA, Djasiman; AUT, Autumnalis; COAGG, co-agglutinations.

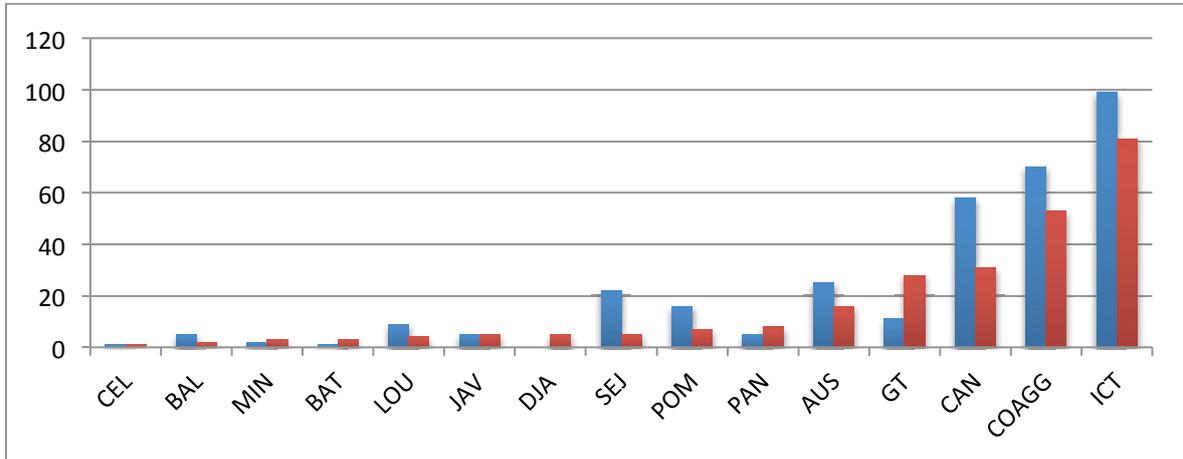


Tableau 1 : Répartition du nombre de cas (lieu d'hospitalisation ou de domicile des patients) en France métropolitaine par départements et régions.

Régions	Département	nbre de cas							
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Alsace		7	4	3	9	6	10	7	10
	67 Bas-Rhin	5	3	1	6	3	6	1	7
	68 Haut-Rhin	2	1	2	3	3	4	6	3
Aquitaine		21	23	17	18	13	15	23	45
	24 Dordogne	4	4	2	5	3	2	1	5
	33 Gironde	6	9	5	3	1	4	7	19
	40 Landes	1	3	1	6	2	2	1	1
	47 Lot-et-Garonne	2	2	3	0	1	0	7	8
64 Pyrénées-Atlantiques	8	5	6	4	6	7	7	12	
Auvergne		7	8	4	5	3	2	7	8
	03 Allier	7	3	2	4	0	2	2	4
	15 Cantal	0	2	0	0	0	0	5	1
	43 Haute-Loire	0	0	0	0	1	0	0	1
63 Puy-de-Dôme	0	3	2	1	2	0	0	2	
Bourgogne		13	16	9	10	8	8	3	12
	21 Côte-d'Or	2	7	3	3	2	1	0	2
	58 Nièvre	1	1	1	1	1	1	0	3
	71 Saône-et-Loire	8	7	3	6	5	4	3	4
	89 Yonne	2	1	2	0	0	2	0	3
Bretagne		22	23	11	9	9	37	22	46
	22 Côtes-d'Armor	7	3	4	5	1	5	5	9
	29 Finistère	6	2	2	2	0	7	6	10
	35 Ille-et-Vilaine	5	16	2	2	5	23	6	18
	56 Morbihan	4	2	3	0	3	2	5	9
Centre		9	9	8	4	5	14	9	39
	18 Cher	1	0	2	2	2	0	4	4
	28 Eure-et-Loir	1	0	0	1	0	3	1	4
	36 Indre	2	1	0	0	1	1	1	8
	37 Indre-et-Loire	2	5	4	1	1	4	0	13
	41 Loir-et-Cher	1	2	2	0	1	5	1	3
45 Loiret	2	1	0	0	0	1	2	7	
Champagne-Ardenne		19	14	20	5	1	14	3	21
	08 Ardennes	8	7	6	0	1	7	1	11
	10 Aube	2	3	10	1	0	4	0	1
	51 Marne	9	1	4	3	0	3	2	8
	52 Haute-Marne	0	3	0	1	0	0	0	1
Corse		2	2	1	1	0	3	6	6
	2A Corse-du-Sud	1	1	1	1	0	1	5	6
	2B Haute-Corse	1	1	0	0	0	2	1	0
Franche-Comté		20	14	3	20	13	26	44	21
	25 Doubs	11	7	1	10	4	11	29	12
	39 Jura	6	4	1	5	2	5	9	2
	70 Haute-Saône	1	2	0	4	5	7	5	6
	90 Territoire de Belfort	2	1	1	1	2	3	1	1
Ile-de-France		45	63	36	38	49	55	37	93
	75 Paris	5	17	11	22	17	24	20	25
	77 Seine-et-Marne	1	0	1	1	1	6	1	6
	78 Yvelines	4	1	1	4	1	2	4	9
	91 Essonne	1	3	0	2	1	3	3	2
	92 Hauts-de-Seine	5	3	3	0	1	3	2	6
	93 Seine-Saint-Denis	1	0	2	3	0	3	0	4
	94 Val-de-Marne	25	37	16	3	27	12	4	35
	95 Val-d'Oise	3	2	2	3	1	2	3	6
Languedoc-Roussillon		6	4	4	5	4	2	9	11
	11 Aude	0	0	1	0	0	0	0	0
	30 Gard	0	0	1	0	2	1	1	2
	34 Hérault	5	4	1	3	1	1	3	2
	48 Lozère	1	0	0	1	0	0	0	2
	66 Pyrénées-Orientales	0	0	1	1	1	0	5	5

(suite tableau)

Régions	Département	nbre de cas							
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Limousin		9	5	1	4	3	3	3	6
	19 Corrèze	3	1	1	3	3	3	2	3
	23 Creuse	0	2	0	1	0	0	1	1
	87 Haute-Vienne	6	2	0	0	0	0	0	2
Lorraine		8	5	14	3	4	3	6	17
	54 Meurthe-et-Moselle	3	0	9	0	1	0	4	9
	55 Meuse	1	1	1	0	1	0	0	4
	57 Moselle	2	3	3	1	0	1	2	3
	88 Vosges	2	1	1	2	2	2	0	1
Midi-Pyrénées		10	14	14	10	10	11	19	26
	09 Ariège	0	0	1	1	1	0	0	2
	12 Aveyron	0	2	0	1	0	1	2	7
	31 Haute-Garonne	7	8	8	6	2	8	5	10
	32 Gers	1	0	0	0	0	1	0	0
	46 Lot	2	0	1	1	5	0	0	5
	65 Hautes-Pyrénées	0	4	0	0	1	1	4	1
	81 Tarn	0	0	3	0	0	0	3	1
	82 Tarn-et-Garonne	0	0	1	1	1	0	5	0
Nord, Pas-de-Calais		19	31	7	22	10	19	13	35
	59 Nord	12	30	6	22	8	18	10	31
	62 Pas-de-Calais	7	1	1	0	2	1	3	4
Basse-Normandie		25	12	10	6	6	18	10	38
	14 Calvados	11	4	5	2	3	8	5	17
	50 Manche	10	7	5	4	2	6	3	13
	61 Orne	4	1	0	0	1	4	2	8
Haute Normandie		5	4	0	3	7	9	4	16
	27 Eure	0	0	0	2	1	0	0	5
	76 Seine-Maritime	5	4	0	1	6	9	4	11
Pays de Loire		24	22	9	17	23	33	34	53
	44 Loire-Atlantique	4	4	3	5	7	8	9	8
	49 Maine-et-Loire	5	8	1	8	6	5	12	9
	53 Mayenne	1	0	0	0	2	1	1	3
	72 Sarthe	10	3	4	2	3	6	6	14
	85 Vendée	4	7	1	2	5	13	6	19
Picardie		5	3	2	6	6	9	3	17
	02 Aisne	2	0	0	2	1	3	0	6
	60 Oise	1	2	1	2	1	3	2	4
	80 Somme	2	1	1	2	4	3	1	7
Poitou-Charentes		14	9	6	10	5	14	19	27
	16 Charente	2	0	2	2	0	2	2	5
	17 Charente-Maritime	4	2	2	2	3	3	7	4
	79 Deux-Sèvres	6	5	1	5	1	4	8	9
	86 Vienne	2	2	1	1	1	5	2	9
Provence-Alpes-C.d'Azur		14	12	4	14	11	11	12	30
	04 Alpes-de-Haute-Prov.	0	0	0	0	0	0	0	1
	05 Hautes-Alpes	0	0	1	0	1	0	0	0
	06 Alpes-Maritimes	1	4	1	1	1	1	0	1
	13 Bouches-du-Rhône	6	2	2	8	7	4	8	11
	83 Var	3	4	0	5	1	3	4	10
	84 Vaucluse	4	2	0	0	1	3	0	7
Rhône-Alpes		23	44	14	62	32	31	92	50
	01 Ain	6	10	3	6	4	4	11	8
	07 Ardèche	1	0	0	0	0	0	3	1
	26 Drôme	0	5	4	1	2	1	14	5
	38 Isère	3	9	2	9	6	4	21	4
	42 Loire	0	2	1	0	1	3	5	0
	69 Rhône	5	11	2	41	13	10	26	29
	73 Savoie	4	5	2	2	6	4	8	2
	74 Haute-Savoie	4	2	0	3	0	5	4	1

Tableau 2: Incidence de la leptospirose par région en Métropole. Les incidences supérieures à l'incidence moyenne annuelle sont colorées.

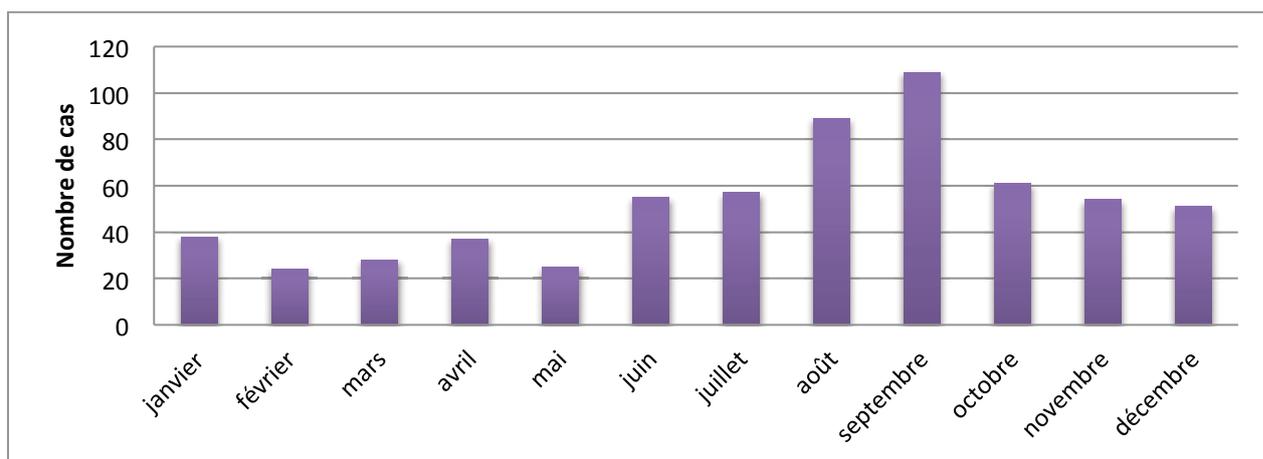
Régions	Pop. * (Khab.)	2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014	
		nbre cas	Incidence /100000 hab.												
Alsace	1861	4	0,22	3	0,16	9	0,49	6	0,32	10	0,54	7	0,38	10	0,54
Aquitaine	3303	23	0,72	17	0,53	18	0,56	13	0,41	15	0,47	23	0,70	45	1,36
Auvergne	1356	8	0,6	4	0,3	5	0,37	3	0,22	2	0,15	7	0,52	8	0,59
Bourgogne	1644	16	0,98	9	0,55	10	0,61	8	0,49	8	0,49	3	0,18	12	0,73
Bretagne	3260	23	0,73	11	0,35	9	0,28	9	0,28	37	1,17	22	0,67	46	1,41
Centre	2573	9	0,35	8	0,31	4	0,16	5	0,2	14	0,55	9	0,35	39	1,51
Champagne-Ardenne	1333	14	1,05	20	1,5	5	0,37	1	0,07	14	1,05	3	0,22	21	1,57
Corse	322	2	0,65	1	0,32	1	0,32	0	-	3	0,98	6	1,86	6	1,86
Franche-Comté	1178	14	1,2	3	0,26	20	1,71	13	1,11	26	2,23	44	3,73	21	1,78
Ile-de-France	11978	63	0,54	36	0,31	38	0,32	50	0,42	55	0,47	37	0,31	93	0,78
Languedoc-Roussillon	2727	4	0,15	4	0,15	5	0,19	4	0,15	2	0,08	9	0,33	11	0,40
Limousin	741	5	0,67	1	0,13	4	0,54	3	0,4	3	0,4	3	0,40	6	0,81
Lorraine	2351	5	0,21	14	0,6	3	0,13	4	0,17	3	0,13	6	0,26	17	0,72
Midi-Pyrénées	2947	14	0,49	14	0,49	10	0,35	10	0,35	11	0,38	19	0,64	26	0,88
Nord, Pas-de-Calais	4052	31	0,77	7	0,17	22	0,55	10	0,25	19	0,47	13	0,32	35	0,86
Basse-Normandie	1479	12	0,82	10	0,68	6	0,41	6	0,41	18	1,23	10	0,68	38	2,57
Haute-Normandie	1848	4	0,22	0	-	3	0,16	8	0,44	9	0,49	4	0,22	16	0,87
Pays de Loire	3658	22	0,62	9	0,25	17	0,48	23	0,65	33	0,93	34	0,93	53	1,45
Picardie	1925	3	0,16	2	0,1	6	0,31	6	0,31	9	0,47	3	0,16	17	0,88
Poitou-Charentes	1792	9	0,51	6	0,34	10	0,57	5	0,28	14	0,8	19	1,06	27	1,51
Provence-Alpes-C.d'Azur	4937	12	0,24	4	0,08	14	0,28	11	0,22	11	0,22	12	0,24	30	0,61
Rhône-Alpes	6393	44	0,71	14	0,23	62	1,01	32	0,52	31	0,2	92	1,43	50	0,78
Total Métropole	63660	341	0,55	197	0,32	281	0,45	230	0,37	347	0,56	385	0,60	627	0,98

* Estimation de la population au 1er janvier 2013 (INSEE)

Pour l'année 2014, l'incidence moyenne est de 0,98 cas/100000 habitants. L'incidence la plus élevée (2,57 cas/100000 h.) est retrouvée en Basse-Normandie (38 cas), qui a toujours été une région à forte incidence lors des années précédentes. On trouve ensuite la Corse (1,86 cas/100000 h; 6 cas), la Franche-Comté (1,78 cas/100000 h; 21 cas), Champagne Ardenne (1,57 cas/100000 h; 21 cas), le Centre (1,51 cas/100000 h; 39 cas) et Poitou Charentes (1,51 cas/100000 h; 27 cas). Au contraire, les régions du Languedoc-Roussillon, Provence-Alpes-Côte d'Azur, Alsace et Auvergne ont les incidences les moins élevées (Tableaux 1 et 2)

La répartition annuelle en Métropole confirme le caractère saisonnier de la leptospirose. Le maximum de cas est retrouvé en août et septembre (**Figure 6**).

Figure 6 : Répartition dans l'année des cas de leptospirose en Métropole



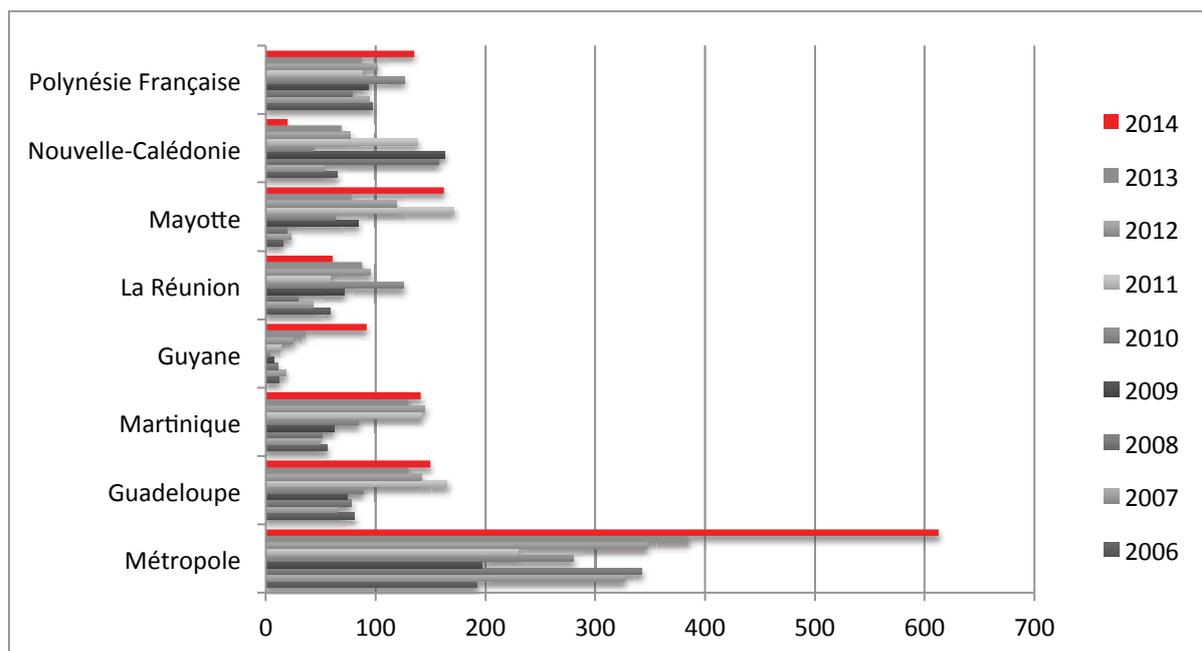
Cas de leptospirose dans les régions Outre-mer

Répartition des cas dans les régions d'Outre-mer en 2014.

Régions	Nombre de cas *	Pop. en K hab.	Incidence / 100 000 hab.
Guadeloupe (971)	150 (130)	404	37,13
Martinique (972)	141 (130)	402	35,07
Guyane (973)	92 (36)	237	38,82
Ile de La Réunion (974)	61 (88)	828	7,37
Mayotte (976)	162 (78)	217	74,65
Polynésie française	135 (87)	274	49,27
Nouvelle-Calédonie	20 (69)	291	6,87
TOTAL OUTRE-MER	761 (618)		

* entre parenthèse les données 2013

Figure 7 : Nombre de cas de leptospirose en France métropolitaine et en Outre-Mer par année.



Dans la Zone Antilles

En Guadeloupe : On observe 150 cas en 2014 (130 cas en 2013 et 142 cas en 2012). 41 % des cas ont été diagnostiqués par sérologie MAT (73 par sérologie IgM et 15 par PCR). Les sérogroupes majoritaires sont Icterohaemorrhagiae (12 cas), Canicola (10 cas), Ballum (12 cas) et Pomona (5 cas). Le plus grand nombre de cas est retrouvé en janvier (32 cas) et décembre (20 cas).

En Martinique : 141 cas en 2014. Le nombre de cas est stable par rapport aux deux dernières années (130 cas en 2013, 145 cas en 2012 et 142 cas en 2011). Pour les sérologies, le séro groupe Icterohaemorrhagiae représente la grande majorité (38 cas sur 85)

des sérogroupes déterminés par le MAT, puis les sérogroupes Panama (10 cas) et Ballum (4 cas).

En Guyane : Le nombre de cas est en nette augmentation avec 92 cas en 2014 (4 cas en 2010, 14 cas en 2011, 25 cas en 2012 et 36 cas en 2013). La grande majorité des cas a été diagnostiquée par ELISA IgM (70/92). Pour les sérologies positives par MAT, les sérogroupes identifiés appartiennent à *Icterohaemorrhagiae* (4), *Sejroe* (3), *Louisiana* (2), *Ballum* (1), *Panama* (1), *Djasiman* (1) et *Mini* (1). Aucune souche n'a été isolée de Guyane ces dernières années.

Dans la Zone Océan Indien

A Mayotte : Grâce à la mobilisation des médecins et biologistes locaux (Dr L. Collet), le diagnostic de la leptospirose a été optimisé et l'isolement des souches est fréquent depuis 2007. Ainsi, 33 souches ont été isolées et identifiées par le CNR en 2014. Parmi ces souches, la majorité (72 %) appartient au séro groupe *Mini*, les autres souches appartiennent aux sérogroupes *Pomona* et *Grippotyphosa*. Cette distribution est similaire à celles observées les années précédentes et confirme une épidémiologie atypique avec une prédominance du séro groupe *Mini* et une absence du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*. Le diagnostic s'effectue principalement par PCR sur le sang mais un grand nombre d'ELISA IgM ont aussi été effectués en 2014, ceci pouvant expliquer le nombre élevé de cas (162) identifié par rapport à l'année précédente (78 cas en 2013). En effet, certains tests ELISA manquent de spécificité et peuvent croiser avec la dengue et l'hépatite A.

A l'île de La Réunion : Avec 61 cas, le nombre de cas est en diminution par rapport à 2013 (88 cas). La moitié des cas sont diagnostiqués aux mois de février et mars. Voir rapport en annexe.

Dans la zone Pacifique

En Polynésie : 135 cas en 2014 (87 cas confirmés et 61 cas probables en 2013). Le nombre de cas est constant et se situe à une centaine de cas tous les ans. L'absence de données de MAT ou d'isolement de souches rend difficile le suivi de l'évolution des souches circulantes dans cette région. C'est pourquoi, en collaboration avec Dr S. Lastere (CH Polynésie Française), nous typons les souches directement à partir des extraits d'ADN de sang de patients. Nous avons ainsi pu identifier 2 souches de *L. interrogans* sérovar Bratislava (séro groupe *Australis*) et 7 souches de *L. interrogans* sérovar *Icterohaemorrhagiae/Copenhagani* parmi les 24 extraits testés. Cette étude sera poursuivie en 2015.

En Nouvelle-Calédonie: On note pour 2014, année de "sécheresse", une baisse significative du nombre de cas (de 69 cas en 2013 à 20 cas en 2014). 19 cas sur 20 ont été identifiés par PCR.

3.2 Participation aux réseaux de surveillance

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Depuis janvier 2013, l'InVS a mis en place le transfert régulier et automatisé des résultats biologiques des principaux laboratoires de biologie médicale (CERBA et BIOMNIS Lyon et Paris) pour 11 maladies, dont la leptospirose. Nous avons eu plusieurs contacts avec l'InVS au cours de l'année pour discuter des données à intégrer pour la surveillance de la leptospirose.

L'ARS de Basse-Normandie mène une action de prévention contre la leptospirose et elle a saisi la Cire Normandie afin de cibler la population à risque. Nous avons ainsi été sollicités pour transmettre les données des cas survenus dans la région depuis 2010.

- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Tous les ans, nous transmettons les données de surveillance à l'ECDC via l'InVS.

Le CNR contribue aussi au développement de la thématique de la leptospirose dans les

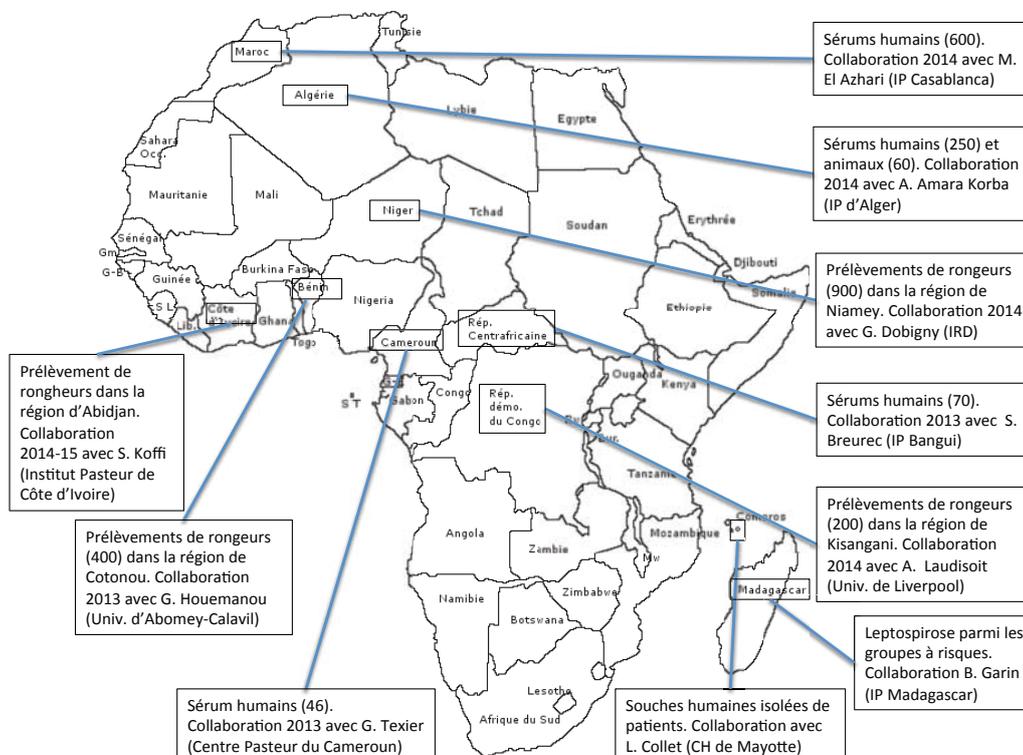
Instituts Pasteur du réseau international (32 Instituts répartis sur les 5 continents) et participe à de nombreux projets collaboratifs avec ces Instituts.

3.3 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Typage moléculaire des souches de leptospires à partir d'extraits d'ADNs d'échantillons biologiques de patients

Le diagnostic par PCR tend à supplanter la sérologie dans de nombreuses régions où la leptospirose est endémique. C'est le cas, par exemple, en Martinique et en Polynésie Française. Cependant, cette technique de diagnostic ne permet pas d'identifier le sérotype. Afin de combler ce vide, nous avons développé différentes techniques moléculaires au cours de ces dernières années permettant l'identification des leptospires directement à partir des échantillons biologiques de patients suspectés de leptospirose. Au cours de l'année 2013, nous avons ainsi procédé au typage génotypique systématique des ADNs provenant du CH de Polynésie française (Dr. S. Lastère) et du CHU de Martinique (Dr. P. Hochedez). Ces ADNs ont été typés par amplification et séquençage de l'ARNr 16S et du gène *secY* pour identification de l'espèce et du génotype et le typage a été complété par l'analyse des VNTR (MLVA) pour les souches appartenant aux espèces *L. interrogans* et *L. kirschneri*. Les données ainsi obtenues sont comparées avec notre base de données de séquences et de profils VNTR afin d'identifier les souches au niveau du sérovar. Ce travail a fait l'objet d'un poster (M. Picardeau "Molecular typing of circulating *Leptospira* strains in the French overseas territories" ILS 2013), d'une publication (Bourhy et al. 2013. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. PLoS Negl Trop Dis.7:e2114) et un manuscrit a été soumis (Hochedez et al. Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique).

Figure 8: Collaborations en cours sur l'étude de la leptospirose en Afrique



Etude de la leptospirose humaine et/ou animale en Afrique.

En Afrique, l'incidence de la leptospirose est mal connue et très peu de publications font état de cas humains, alors que les conditions climatiques et environnementales sont favorables au développement de cette zoonose dans de nombreux pays. Nous avons ainsi récemment publié une étude montrant qu'un nombre important de patients déclarés lors d'une épidémie de peste en République Démocratique du Congo en 2006 étaient séropositifs pour la leptospirose (Bertherat *et al.* 2014. Discovery of a leptospirosis cluster amidst a pneumonic plague outbreak in a miners' camp in the Democratic Republic of the Congo. *Int J Environ Res Public Health*; 11:1824-33).

Au cours de ces dernières années, nous avons été sollicités pour plusieurs enquêtes ponctuelles au Bénin, Cameroun et Madagascar. Ces études ont permis de déterminer si la leptospirose était responsable de fièvres inexplicables (Madagascar et Cameroun) ou de déterminer si les rongeurs de la ville de Cotonou (Bénin) pouvaient constituer un risque pour la santé humaine (**Figure 8**).

D'autres enquêtes sont aussi en cours sur des prélèvements humains ou animaux provenant du Maroc, Algérie, République Démocratique du Congo, Niger, République Centrafricaine et Côte d'Ivoire (**Figure 8**). Le CNR reçoit ainsi régulièrement des sérums positifs du Maroc et d'Algérie envoyés par les laboratoires locaux pour diagnostic. Cependant, nous disposons de très peu d'informations sur la situation épidémiologique de la leptospirose dans ces pays. En Algérie, Mme Anissa Amara Korba de l'Institut Pasteur d'Alger travaille depuis plusieurs années sur la leptospirose et elle dispose d'une collection de sérums et de souches isolées de l'homme, de l'animal et de l'environnement. Nous procéderons à l'analyse de ces échantillons pour mieux connaître les souches circulantes dans cette région. A la demande de l'Institut Pasteur de Casablanca, nous devons former une équipe pilote pour la création d'un laboratoire de diagnostic biologique au niveau de l'Institut Pasteur du Maroc. Nous avons ainsi accueilli M. Mohamed Al Azhari au mois de mars 2014. Une enquête séro-épidémiologique sur la leptospirose au niveau des groupes à risque des abattoirs de Casablanca ainsi que chez des patients présentant une fièvre inexplicable sera aussi effectuée afin d'évaluer la prévalence de la leptospirose.

Une étude mammalogique conduite par Gauthier Dobigny (Institut de Recherche pour le Développement, Centre de Biologie pour la Gestion des Populations Campus International de Baillarguet) sur plus de 900 rongeurs prélevés à Niamey (Niger) et le long du fleuve, nous donne l'occasion d'explorer la question. Nous disposons d'échantillons (reins) de rongeurs identifiés et géoréférencés, mais aussi de résultats d'une étude socio-écologique de voisinage qui a été conduite en parallèle. Une autre étude concerne des rongeurs capturés par Anne Laudisoit (University of Liverpool) dans plusieurs régions de la République Démocratique du Congo (Kisangani, Rethy, Epulu et le long du fleuve Congo).

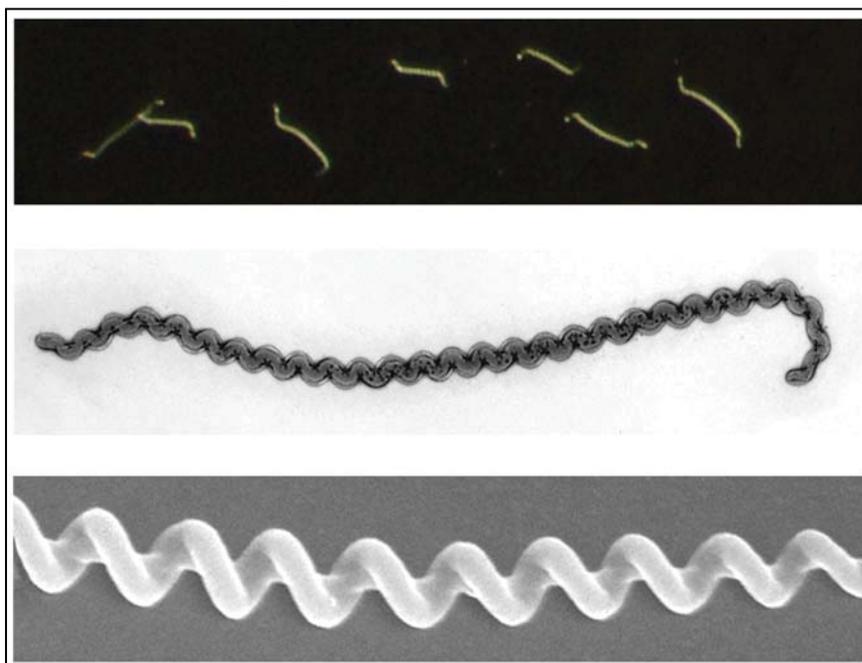
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

Les leptospires pathogènes sont responsables d'une zoonose de répartition mondiale, la leptospirose, où l'homme se retrouve être un hôte occasionnel dans un cycle impliquant les animaux sauvages et domestiques. Le réservoir animal, principalement les rongeurs, excrète les leptospires dans ses urines et contamine ainsi l'environnement hydrique, propageant la maladie à d'autres animaux ou à l'homme.

Les leptospires appartiennent au phylum des spirochètes et sont constituées de bactéries saprophytes et pathogènes. Les spirochètes ont des caractéristiques morphologiques uniques dans le monde bactérien. Les leptospires ont une forme hélicoïdale (**Figure 9**) et possèdent un organe locomoteur interne, l'endoflagelle, qui leur confère une grande mobilité, même dans les milieux les plus visqueux. Le genre *Leptospira* a été initialement divisé en deux groupes : *Leptospira interrogans* sensu lato pour désigner les souches pathogènes et *Leptospira biflexa* sensu lato pour les souches saprophytes et aquicoles. Aujourd'hui, vingt et une espèces de leptospires et plus de 300 sérovars regroupés en une vingtaine de sérogroupes ont été décrits.

Figure 9 : Vue en microscope à fond noir et en microscope électronique de leptospires. Les leptospires ont une longueur de 6 à 20 μm et un diamètre d'environ 0,1 μm . De par leur taille, le microscope à fond noir s'avère indispensable à leur observation.



La leptospirose représente un problème de santé publique majeur dans de nombreux pays, notamment en Amérique Latine et en Asie du Sud-Est. On estime à plus d'un million le nombre de cas sévères de leptospirose chaque année, avec un taux de mortalité de 5 à 20 %. En France métropolitaine, plus de 300 cas annuels sont diagnostiqués. Pour les Départements et Territoires d'Outre-Mer, le taux d'incidence peut être 100 fois plus élevé qu'en Métropole. La France est parmi les pays industrialisés celui qui a le taux d'endémie le plus élevé. Dans les pays industrialisés des zones tempérées, la leptospirose est une maladie qui touche certaines catégories professionnelles exposées (éleveurs, égoutiers, pisciculteurs) et les adeptes de loisirs en plein air (pêche, rafting, canyoning) par contact avec les eaux douces souillées par les urines d'animaux infectés. Un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments cite la leptospirose comme une des affections humaines dont l'incidence est susceptible d'être modifiée par le changement climatique en

France métropolitaine (<http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/SANT-Ra-Rechauffementclimatique.pdf>). Il existe un traitement antibiotique mais celui-ci doit être administré le plus rapidement possible pour éviter les formes les plus graves. Cependant, le diagnostic est souvent tardif au cours de l'infection. En effet, le spectre clinique de la leptospirose peut varier d'un état pseudo-grippal à une insuffisance rénale aiguë et ce syndrome peut être confondu avec d'autres maladies tropicales telles que le paludisme ou la dengue. En France, un vaccin est disponible (Spirolept®). Il s'agit d'une souche du sérovar *Icterohaemorrhagiae* formolée. Le sérovar *Icterohaemorrhagiae* est le plus fréquemment rencontré en clinique humaine et il est responsable des formes les plus graves. Cependant, cette vaccination a une efficacité courte et ne protège pas contre l'ensemble des sérovares.

La plupart des cas de leptospiroses sont diagnostiqués par sérologie ; or les anticorps ne sont détectés dans le sang (ELISA et/ou MAT) que plus d'une semaine après l'apparition des symptômes (**Figure 9**). Le diagnostic bactériologique est peu pratiqué car il nécessite un milieu de culture spécifique et le temps de génération des leptospires est particulièrement long entraînant ainsi une réponse tardive (plusieurs semaines). Aujourd'hui, la détection de l'ADN bactérien par PCR sur des prélèvements biologiques précoces tend à supplanter la sérologie, surtout en Outre-Mer.

Le CNR de la Leptospirose contribue à la surveillance épidémiologique de la leptospirose humaine en France métropolitaine et d'outre-mer. Il assure l'alerte en cas de recrudescence inhabituelle ou d'apparition de cas groupés. Il a également une mission d'expertise en garantissant l'identification des souches isolées en pathologie humaine, en développant des techniques permettant d'améliorer à la fois le diagnostic de la maladie et le typage des souches.

Rappel du cahier des charges du CNR de la Leptospirose (arrêté du 29 nov. 2004)

Il sera particulièrement demandé au Centre National de Référence de la Leptospirose de :

1. Apporter une expertise microbiologique :
 - développer de nouvelles techniques diagnostiques et de typage de *Leptospira*,
 - identifier et typer les souches humaines de *Leptospira*,
 - apporter son expertise aux laboratoires de biologie médicale de ville et hospitaliers pour le diagnostic des leptospiroses (confirmation du diagnostic, typage),
 - collaborer avec les structures en charge de la leptospirose animale (échanges d'informations, de souches, études, etc).
2. Contribuer en lien avec l'Institut de veille sanitaire à la surveillance microbiologique :
 - en s'appuyant sur un réseau de laboratoires de biologie médicale métropolitains et d'Outre Mer,
 - en participant à l'investigation de cas groupés
 - en contribuant aux systèmes de surveillance internationaux, en particulier européens, notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonose 2003/99/CE
3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) ; apparition d'un nouveau phénotype de résistance ; etc

Le CNR de la leptospirose est intégré à l'unité Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur à Paris. Cette unité comprend une équipe de recherche dont les thématiques principales sont la génétique et la virulence des Leptospires. Cette organisation permet des collaborations étroites entre le CNR de la Leptospirose et ce groupe de recherche. Le CNR, de par sa localisation à l'Institut Pasteur, a aussi engagé d'étroites collaborations avec de nombreux Instituts du réseau des Instituts Pasteur (32 Instituts répartis sur les cinq continents), notamment dans les pays où la leptospirose est endémique.

Le CNR de la Leptospirose fait partie d'un des cinq Centres Collaborateurs de l'Organisation Mondiale de la Santé (CCOMS) sur la leptospirose à travers le monde.

Référence	Institution	Ville	Pays	Région	Titre
FRA-58	Institut Pasteur	Paris	France	EURO	Centre collaborateur OMS/FAO pour l'Epidémiologie de la Leptospirose
NET-34	Royal Tropical Institute	Amsterdam	Pays Bas	EURO	WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis
IND-91	Indian Council of Medical Research	Port Blair	Inde	SEARO	WHO Collaborating Centre for Diagnosis, Reference, Research and Training in Leptospirosis
AUS-88	Queensland Health Scientific Services	Coopers Plains	Australie	WPRO	WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis
BRA-65	Instituto Oswaldo Cruz	Rio de Janeiro	Brésil	AMRO	WHO Collaborating Centre for Leptospirosis

Le CNR de la Leptospirose est le principal laboratoire français à pratiquer le diagnostic de la leptospirose humaine. Tous les ans, le CNR reçoit environ 4 000 sérums humains pour diagnostic sérologique de la leptospirose. Cette implication directe du CNR dans le diagnostic de la maladie facilite la surveillance et l'alerte. Le CNR collabore avec les autres laboratoires assurant le diagnostic en Métropole (Cerba, Biomnis, CHU Toulouse, hôpital Arnaud de Villeneuve de Montpellier) et Outre-mer (Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Institut Pasteur de Guadeloupe, Institut Pasteur de la Guyane, CH Sud-Réunion, CHD Félix Guyon, CHU Fort-de-France, CHU Pointe-à-Pitre, CH de Mayotte, Institut Territorial Louis Mallardé et CH Polynésie Française à Papeete). Le CNR assure également l'identification de toutes les souches isolées en pathologie humaine en métropole et outre-mer. Il interagit aussi avec le Campus Vétérinaire de Lyon (VetAgro Sup) et le Laboratoire départemental Frank Duncombe (Caen) pour la leptospirose animale.

1.2 Description détaillée de l'équipe :

- Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

Mathieu Picardeau: responsable

Pascale Bourhy: responsable adjoint

Sylvie Murguet: secrétaire

Farida Zinini: technicienne supérieure

Sylvie Brémont: technicienne supérieure

Annie Landier: technicienne supérieure

Fatimata Traore: aide de Laboratoire

Annie Prétesac, Françoise Guinandie, Patrick Denis, Chrystelle Roux et Fatimata Traore : personnel du Laboratoire de préparation

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence :

Liste des techniques pour le diagnostic biologique :

1. Culture à partir de sang, urines ou LCR, sur milieu spécifique Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH).

2. Sérologie par :

- ELISA IgM : ce test « maison » remplace le test de Macroagglutination sur lame ou «TR» (antigène Thermo-Résistant) peu sensible et spécifique (voir Picardeau et al. 2008 BEH 37 : 329-331). Cet ELISA est complémentaire au MAT et aide dans l'interprétation des résultats par les biologistes. Un article décrivant ce test ELISA a été récemment accepté pour publication (voir Bourhy et al. 2013 J. Med. Microbiol. 62: 822-827).

- MAT (Microscopic Agglutination Test): Test de microagglutination dérivé du test d'agglutination-lyse de Martin et Pettit. C'est la réaction de référence permettant la mise en évidence quantitative des anticorps agglutinants totaux. Elle permet non seulement un diagnostic sensible et spécifique mais aussi la détermination du sérotype. Elle a donc un intérêt à la fois diagnostique et épidémiologique. Ce test nécessite l'entretien d'un grand nombre de souches vivantes correspondant aux sérotypes attendus. La «batterie» usuelle comprend, depuis janvier 2012, 24 souches et peut être étendue si l'on suspecte un sérotype ou sérovar plus rare. Les 24 souches ou antigènes utilisés en routine sont détaillés dans le tableau 3. Les autres laboratoires proposant le MAT (Biomnis, CHU de Toulouse Purpan et CHU de Montpellier Hôpital Arnaud de Villeneuve) utilisent 9 antigènes.

3. Diagnostic de la leptospirose par PCR en temps réel (techniques Taqman et SYBR Green) : utilisé en routine depuis début 2014 (utilisation de pièces PCR "marche an avant").

Liste des techniques pour l'identification et le typage :

Le laboratoire du CNR est le seul en France à pratiquer l'identification des souches de leptospires isolées en pathologie humaine. Cette identification nécessite l'entretien et le stockage d'un grand nombre de sérovars ainsi que des antisérums de lapins dirigés contre les souches représentatives des 24 sérotypes décrits chez les pathogènes. Plusieurs méthodes sont utilisées pour chaque souche :

1. Identification du sérotype par microagglutination (MAT) avec des antisérums de lapins.

2. Identification de l'espèce génomique par amplification d'un fragment du gène de l'ARNr 16S ou *secY* et séquençage.

3. Identification du sérovar par la méthode moléculaire rapide de l'analyse du polymorphisme des Variable Number of Tandem Repeats (VNTR). Cette méthode vise à terme à remplacer l'électrophorèse en champ pulsé. Elle a été mise au point par le groupe de recherche de l'Unité Biologie des Spirochètes (Salaün et al. 2006). Cette méthode est applicable aux souches des espèces *L. interrogans*, *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii* et permet l'identification des sérovars les plus fréquemment retrouvés en pathologie humaine.

4. Identification du sérovar par détermination du profil de macro-restriction de l'ADN génomique total par électrophorèse en champ pulsé.

5. Typage par Multi Locus Sequence Typing (MLST).

6. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la technique de microdilution.

Tableau 3 : Antigènes utilisés dans le MAT réalisé au CNR

En gras, les souches utilisées comme antigènes pour le MAT par le Laboratoire BIOMNIS.

N°	ESPECE	SEROGROUPE	SEROVAR	SOUCHE
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
6	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
8	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
9	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
10	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
11	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
12	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
13	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
14	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroë	Sejroë	M 84
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
18	<i>L. weillii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
19	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	ND	2008/01925
21	<i>L. weillii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
22	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
23	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
24	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945

ND: non déterminé

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

sérogroupe (n = 24), sérovars (n > 225) et espèces génomiques (n = 21).

2.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

- Description : nombre de souches, caractérisation

L'Unité Biologie des Spirochètes dispose de 2 collections de souches :

Une collection gérée par le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) et consultable sur <http://www.crbip.pasteur.fr/>

Cette collection comprend 323 souches de référence. L'obtention de ces souches auprès du CRBIP est payante.

Une collection de souches propres à l'Unité comprenant plus de 1 200 souches réparties en souches de référence, souches isolées de produits biologiques humains (environ 500), animales (environ 500) ou environnementales (environ 100). Seuls quelques sérovars ne sont pas représentés. Environ 200 souches de cette collection ont été obtenues du Center for Disease Control and Prevention (CDC). Ces souches ont été identifiées par hybridation ADN/ADN. Cette collection comprend plusieurs aliquots de chaque souche conservés à la fois en congélateur à -150°C et dans une cuve à azote liquide. Le CNR possède les souches de référence de l'ensemble des 22 espèces de leptospires aujourd'hui décrites (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Caractéristiques des vingt deux espèces de leptospires aujourd'hui décrites

Espèce	Sérogroupe	Sérovar	Souche	Source	Origine
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	homme	Belgique
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C	chauve souris	Indonesie
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K	opossum	Panama
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84	souris	Danemark
<i>L. mayottensis</i>	Mini	inconnu	200901116	homme	Mayotte
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni	homme	Australie
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	LT821	rat	Panama
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60	inconnue	Chine
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79601	grenouille	Chine
<i>L. kmetyi</i>	Tarassovi	Malaysia	Bejo-Iso 9	sol	Malaysia
<i>L. wolffii</i>	ND	Khorat	Khorat-H2	homme	Thaïlande
<i>L. licerasiae</i>	Iquitos	Varillal	VAR010	homme	Perou
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68	homme	Etats Unis
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6	cochon	Australie
<i>L. broomii</i>	Hurstbridge	inconnu	5399	homme	Danemark
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC	eau	Etats Unis
<i>L. meyeri</i>	Semarang	Semarang	Veldrat Semarang 173	rat	Indonesie
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1	eau	Italie
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland	eau	Hollande
<i>L. terpstrae</i>	Icterohaemorrhagiae	Hualin	LT 11-33	inconnue	Chine
<i>L. yanagawae</i>	Semarang	Saopaulo	Sao Paulo	eau	Brésil
<i>L. idonii</i>	Hebdomadis	inconnu	Eri-1	eau	Japon

L'Unité possède aussi une collection d'immunsérums de lapins correspondant aux principaux sérogroupes et sérovars de leptospires.

- Conditions de stockage
immunsérums : -20°C
souches : -80°C, -150°C, azote liquide

- Conditions de mise à disposition de ces collections
Les souches de notre collection sont envoyées gracieusement dans le cadre d'une collaboration et sont facturées lorsque la demande n'entre pas dans le cadre des missions du CNR.

2.4 Liste des techniques recommandées par le CNR

Le diagnostic s'effectue par la détection de l'ADN bactérien par PCR dans le sang lors de la première semaine de la maladie ou plus tardivement dans le LCR ou les urines. Plusieurs méthodes de PCR conventionnelle ou en temps réel ont été développées pour la détection des leptospires pathogènes. Une PCR positive indique la présence de leptospires pathogènes dans l'échantillon (si la cible est bien spécifique des espèces pathogènes) mais en aucun cas elle ne permet l'identification directe du sérovar.

La recherche des anticorps s'effectue à partir de la deuxième semaine après l'apparition des symptômes par un ELISA IgM et/ou le MAT. L'ELISA IgM est habituellement plus précoce mais un résultat positif ne donnera aucune indication sur le sérovar/sérogroupe. Il est recommandé de confirmer l'ELISA par le MAT qui est pratiqué par quelques rares laboratoires de référence.

Le diagnostic bactériologique est peu pratiqué car il nécessite un milieu de culture spécifique et le temps de génération des leptospires est particulièrement long, entraînant ainsi une réponse tardive (plusieurs semaines).

Figure 9: Cinétique de la leptospirose au cours de l'infection. L'infection entraîne une bactériémie durant les premiers jours après exposition. Suite à l'augmentation du titre des anticorps agglutinants (phase immune), les leptospires sont éliminés de la circulation sanguine. Les leptospires sont aussi retrouvés dans le LCR et de manière transitoire dans les urines. MAT, microscopic agglutination test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay ; PCR, polymérase chain reaction.

