



# Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises : apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et de l'incidence

Patrick Hochedez

## ► To cite this version:

Patrick Hochedez. Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises : apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et de l'incidence. Santé publique et épidémiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066010>. <tel-01176154>

**HAL Id: tel-01176154**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01176154>**

Submitted on 15 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Épidémiologie

**Ecole doctorale Pierre Louis de Santé Publique à Paris**

**ED 393 Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale**

*Equipe d'accueil : UMR-S 1136 Equipe Epidémiologie clinique de l'infection à VIH  
stratégies thérapeutiques et comorbidités*

**Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises :  
apports du diagnostic par biologie moléculaire dans  
l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et  
de l'incidence**

Par Patrick Hochedez

Dirigée par le Pr Eric Caumes et le Pr Raymond Césaire

Présentée et soutenue publiquement le 13 Janvier 2015

Devant un jury composé de :

Pr Eric Caumes, Directeur de thèse

Pr Raymond Césaire, Directeur de thèse

Pr Jean Louis Herrmann, Rapporteur

Pr Jérôme Salomon, Rapporteur

Dr Karine Lacombe, Examineur

Dr Paul-Henri Consigny, Examineur



## RESUME

La leptospirose est la zoonose bactérienne la plus répandue dans le monde et son incidence est plus forte dans les régions tropicales où les conditions de la transmission sont particulièrement favorables. Les animaux domestiques et sauvages, en particulier le rat, constituent le réservoir animal de la maladie et la contamination peut survenir dans des situations diverses comme les travaux agricoles, la pratique de sport aquatiques, ou la vie quotidienne dans les bidonvilles où la maladie représente un problème de santé publique émergent selon l'OMS. On estime qu'il y aurait chaque année plus de 500 000 cas dans le monde avec un taux de mortalité pouvant excéder 10% dans certaines régions. Il apparaît fondamental de disposer de moyens diagnostics de certitude à la phase aiguë de la maladie, car le traitement antibiotique a plus de chance d'être efficace lorsqu'il est prescrit précocement et la prise en charge des défaillances viscérales, comme l'atteinte rénale ou pulmonaire, nécessitent une prise en charge spécifique en service de réanimation. Dans ce travail, nous avons utilisé le diagnostic par biologie moléculaire (RT-PCR) pour contribuer à mieux connaître l'épidémiologie de la leptospirose aux Antilles. Dans les deux premiers articles, nous rapportons pour la première fois aux Antilles la survenue de cas groupés de leptospirose après des événements sportifs (course à pied, canyoning), s'étant déroulés en forêt tropicale après des périodes de pluies inhabituelles. La présence d'abrasions cutanées a été identifiée comme facteur de risque de l'infection et ces travaux nous ont permis de mettre en avant l'intérêt d'une confirmation diagnostique précoce pour informer rapidement les personnes exposées, débiter le traitement antibiotique en phase aiguë, et diffuser des informations de prévention auprès des pratiquants de ces activités dont la popularité est croissante. Dans le troisième article, nous rapportons grâce à une étude de cohorte prospective portant sur 102 patients diagnostiqués par PCR en temps réel, l'association entre l'élévation de la concentration sanguine de leptospires mesurée à l'admission et la sévérité de la maladie aux Antilles. Un seuil critique de 6.5 log<sub>10</sub> (leptospires/ml) pouvait être considéré pour les cas sévères. Les Principaux éléments cliniques relevés à l'admission et associés à la sévérité, pouvant être utilisé pour mieux orienter la prise en charge des patients étaient : l'hypotension, les anomalies auscultatoires, l'ictère et l'anurie. L'identification de l'espèce *Leptospira interrogans*, le sérovar Icterohaemorrhagiae /Copenhageni, et la présence de rats à domicile était associée à la sévérité. En conclusion, l'utilisation du diagnostic par biologie moléculaire nous a permis de contribuer à l'étude de facteurs de risque et des facteurs pronostiques, mais aussi à mieux connaître le poids réel de la maladie aux Antilles.

**Mots clés :** leptospirose, PCR en temps réel, leptospiémie, Martinique, *Leptospira interrogans*, sérovar Icterohaemorrhagiae

## SUMMARY

Leptospirosis is a bacterial zoonosis of worldwide distribution whose incidence is higher in tropical areas where its transmission is easier. Domestic and wild animals, especially rats, are the maintenance hosts and human contamination occur in different settings, such as agricultural work, water-sports practice, or daily activities in slum where it is an emerging health issue according to WHO. It is estimated that more than 500 000 cases occur each year, with fatality rates up to 10% in some areas. Availability of rapid diagnostic tools during acute phase of the disease is top-priority, since antibiotic is more efficient when given early, and leptospirosis-related organ failure, like kidney or lung failure, require specific treatment in intensive care unit. In this work, we rely on molecular diagnosis (RT-PCR) to contribute to the study of leptospirosis epidemiology in the Caribbean. In the first two papers, we describe for the first time in the Caribbean outbreaks of leptospirosis after sporting events in the tropical forest of Martinique (trail running, canyoning) after unusually heavy seasonal rainfalls. The occurrence of cutaneous abrasions was identified as a risk factor for infection and data from those outbreaks suggest that rapid diagnostic assays such as PCR are particularly appropriate in this setting for early diagnosis, information of exposed participants, treatment during acute phase of the disease and epidemiological investigation. In the third paper, we report for the first time in the Caribbean, using a cohort study of 102 patients with PCR-confirmed leptospirosis, that leptospiremia at the time of admission was associated with severity of the disease. A critical threshold of 6.5 log<sub>10</sub> (leptospires/ml) could be considered for severe cases. The main clinical findings at the time of admission that were associated with severe leptospirosis and that could be used to identify at risk patients included: hypotension, chest auscultation abnormalities, icterus, and oligoanuria. Identification of *Leptospira interrogans* species, serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni, and the presence of rats in the house or in the surrounding vicinity were associated with severity. To conclude, detection methods using RT-PCR allowed us to contribute to the study of risk and prognostic factors, but also to have a better understanding of leptospirosis public health impact in the Caribbean.

**Keywords:** leptospirosis, RT-PCR, leptospiremia, Martinique, *Leptospira interrogans*, serovar Icterohaemorrhagiae

## REMERCIEMENTS

Je voudrais sincèrement remercier :

Le Pr Eric Caumes, codirecteur de cette thèse à Paris

*Pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien pendant ce travail et toutes ces années depuis mon passage comme interne à la Pitié-Salpêtrière. धन्यवाद dhanyabad (merci népali)*

Le Pr Raymond Césaire, codirecteur de cette thèse à Fort de France

*Pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien pendant ce travail de thèse en Martinique.*

Le Pr Jérôme Salomon, Rapporteur

*Pour avoir accepté de rapporter ce travail et pour sa disponibilité et ses encouragements depuis mon clinicat à l'hôpital Raymond Poincaré de Garches.*

Pr Jean Louis Herrmann, Rapporteur

*Pour avoir accepté de rapporter ce travail et pour sa disponibilité.*

Le Dr Karine Lacombe, examinateur

*Pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour sa disponibilité.*

Le Dr Paul-Henri Consigny, examinateur

*Pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour sa disponibilité.*

Le Dr Claude Olive, chef du service de bactériologie du CHU de Martinique

*Pour m'avoir si bien accueilli dans son laboratoire, pour avoir partagé sa passion de la microbiologie et ses connaissances, pour ses conseils précieux.*

Le Dr Rafaëlle Théodose, bactériologiste au CHU de Martinique

*Pour sa disponibilité et ses conseils précieux tout au long de ce travail.*

A Mme Dorothée Haug et toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie du CHUM

*Pour leur travail minutieux, leur gentillesse et leur aide dans la réalisation de cette thèse.*

Le Dr Mathieu Picardeau, directeur du CNR de la leptospirose à l'Institut Pasteur

*Pour sa disponibilité, ses conseils précieux et pour avoir partagé ses connaissances sur le vaste monde des leptospires.*

Le Dr Pascale Bourhy, CNR de la leptospirose à l'Institut Pasteur

*Pour sa disponibilité, ses conseils et ses encouragements tout au long de ce travail.*

Le Pr André Cabié, chef du service de Maladies Infectieuses du CHUM

*Pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour son soutien et son aide méthodologique, pour avoir partagé ses connaissances sur la recherche clinique.*

A M Jacques Rosine, épidémiologiste

*Pour son soutien, ses encouragements et son aide dans les enquêtes épidémiologiques.*

Au Dr Hossein Mehdaoui, au Dr Ruddy Valentino et l'équipe de réanimation du CHUM

*Pour leur disponibilité, et pour avoir partagé leurs connaissances sur la prise en charge des leptospiroses sévères*

Aux co-auteurs des articles inclus dans cette thèse

*Pour leur contribution à ces articles et tout le travail fait ensemble.*

Au Dr Fatiha Najioullah et toute l'équipe de virologie

*Pour leur accueil et leur disponibilité.*

A M. Janick Jean-Marie et toute l'équipe du Centre d'Investigation Clinique et d'Epidémiologie Clinique (CIC-EC) Antilles-Guyane

*Pour leur aide sans faille lors de la mise en place des protocoles de recherche clinique et pour leur soutien méthodologique.*

Le Dr Sylvie Merle et l'équipe de Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation (DRCI) du CHU de Martinique

*Pour leur aide méthodologique lors de la rédaction des protocoles de recherche clinique.*

Le Ministère de la Santé avec la participation du Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Sud-Ouest Outre-Mer (PHRCI 2011)

*Pour le financement de la recherche.*

Mes collègues du service du service des Maladies Infectieuses et Tropicales de Fort de France

*Pour m'avoir accueilli dans leur équipe, pour leur soutien et leur amitié.*

Je voudrais adresser mes remerciements sincères aux patients qui ont acceptés de participer à la recherche clinique.

Je voudrais dédier cette thèse à ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé malgré l'éloignement.

# TABLE DES MATIERES

RESUME.....	3
SUMMARY .....	4
REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	8
ABREVIATIONS .....	10
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES PUBLICATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	14
1. ETAT DE L'ART.....	18
1.1 Agent causal .....	18
1.1.1 Microbiologie.....	18
1.1.2 Taxonomie.....	20
1.2 Epidémiologie .....	22
1.2.1 Cycle de la leptospirose et transmission à l'homme .....	22
1.2.2 Une maladie tropicale répandue mais négligée.....	24
1.3 Physiopathologie .....	30
1.3.1 Inoculum.....	30
1.3.2 Facteurs de virulence bactériens .....	30
1.3.3 Facteurs liés à l'hôte.....	31
1.3.4 Principales lésions tissulaires au cours de la leptospirose.....	32
1.4 Manifestations cliniques.....	36
1.4.1 Forme anictérique pseudo-grippale.....	36
1.4.2 Complications viscérales.....	37
1.4.3 Facteurs pronostiques de décès au cours de la leptospirose.....	41
1.4.4 Diagnostic différentiel.....	42
1.5 Diagnostic biologique .....	43
1.5.1 Les tests biologiques usuels .....	43
1.5.2 Cinétique des leptospires et des anticorps dans le sang .....	43
1.5.3 Diagnostic bactériologique direct : mise en évidence des leptospires ou de leur ADN .....	44
1.5.4 Diagnostic sérologique.....	50
1.5.5 Identification .....	51
1.5.6 Conclusions du rapport d'évaluation de la HAS sur le diagnostic biologique de la leptospirose, 2011.....	52
1.6 Traitement .....	54
1.6.1 Le traitement antibiotique .....	54
1.6.2 Le traitement des défaillances viscérales .....	56
1.7 Prévention.....	57
1.7.1 Vaccination.....	57
1.7.2 Prophylaxie médicamenteuse.....	58

2.	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	59
3.	<b>RESULTATS</b> .....	60
3.1.	<i>Article 1</i> - Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique .....	60
3.2.	<i>Article 2</i> - Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011 .....	67
3.3.	Article 3 – Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and <i>Leptospira interrogans</i> serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique .....	76
4.	<b>SYNTHESE ET DISCUSSION</b> .....	97
4.1	Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques... ..	97
4.2	Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs pronostiques .....	99
4.3	Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude de l'incidence .....	101
5.	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	103
6.	<b>ARTICLES ET POSTERS ECRITS PENDANT LA THESE</b> .....	106
6.1	Publications liées au travail de thèse sur la leptospirose.....	106
6.1.1	Articles .....	106
6.1.2	Posters présentés en congrès .....	106
6.1.3	Rapport d'évaluation technologique. Diagnostic biologique de la leptospirose ... ..	107
6.1.4	Etude sur l'incidence de la leptospirose aux Antilles .....	107
6.1.5	Chapitres de livres .....	107
6.2	Publications non liées au travail de thèse .....	107
7.	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	108
8.	<b>ANNEXES</b> .....	116
8.1	Résumé du Protocole de Recherche Clinique LEPTO.....	116
8.2	Illustration des sites de trail et de canyoning .....	122
8.3	Fiches d'informations destinées aux pratiquants des sports à risque de leptospirose (recto/verso) .....	123
8.4	Résumé du Protocole de Recherche Clinique Ciné LEPTO .....	125

## ABREVIATIONS

ARS	Agence Régionale de Santé
CIRE	Cellule de l'Institut de veille sanitaire en Région
EDTA	Ethylène-Diamine Tétra-Acétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CNRL	Centre National de Référence de le Leptospirose
HAS	Haute Autorité de Santé
HLA	Human Leukocyte Antigen
LERG	Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group
MAT	Micro-Agglutination Test
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	PCR quantitative
RT-PCR	Real Time PCR, PCR en temps réel
SPHS	Severe Pulmonary Hemorrhage Syndrome
T <sub>m</sub>	Melting temperature, température de fusion
WHO	World Health Organisation
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 - Situation géographique de la Martinique. ....	16
Figure 2 - Carte pluviométrique de la Martinique, 2009 (Météo France).....	16
Figure 3 - Vue en microscope à fond noir (A) et en microscope électronique (B, C) de leptospires (Bourhy 2012). ....	19
Figure 4 - Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Leptospira</i> (L.) .....	21
Figure 5 - Représentation schématique du cycle de la leptospirose (Bourhy 2012). ....	23
Figure 6 - Rongeurs présents en Martinique. ....	24
Figure 7 - Répartition des principaux sérogroupe identifiés par MAT en 2013.....	26
Figure 8 - Répartition dans l'année des cas de leptospirose en Métropole. ....	26
Figure 9 - Nombre de cas de leptospirose en France métropolitaine et en outre-mer par année (Picardeau 2013). ....	29
Figure 10 - Atteinte rénale dans un modèle animal. ....	33
Figure 11 - Atteinte hépatique dans un modèle animal.....	34
Figure 12 - Atteinte pulmonaire dans un modèle animal. ....	35
Figure 13 - Radiographie thoracique d'un patient présentant une hémorragie intra-alvéolaire au cours d'une leptospirose sévère.....	39
Figure 14- Evolution schématique de la leptospirose et des anticorps au cours de la leptospirose (Picardeau 2013). ....	44
Figure 15 - Cinétique de la leptospirose au cours de l'infection.....	47
Figure 16 - Détection des leptospires à partir de prélèvements sanguins par culture ou amplification génique. ....	48
Figure 17 - Courbes de fusion .....	49

## **LISTE DES TABLEAUX**

<a href="#">Tableau 1</a> - caractéristiques des 21 espèces de leptospires aujourd’hui décrites. D’après rapport CNRL 2012 (Picardeau 2012). .....	21
<a href="#">Tableau 2</a> - Réservoir animal habituel des sérovars les plus communs (Bharti 2003). .....	24
<a href="#">Tableau 3</a> - Répartition des cas dans les régions d’Outre-Mer en 2013 (Picardeau 2013). .....	29

## LISTE DES PUBLICATIONS

Liste des publications réalisées dans le cadre du travail de thèse :

- **Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. Hochedez P**, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, Quénel P, Cabié A. Am J Trop Med Hyg. 2011 Apr;84(4):621-6.
- **Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. Hochedez P**, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. Euro Surveill. 2013 May 2;18(18):20472.

Manuscrit soumis au journal Emerging Infectious Diseases (soumis le 28/06/2014) :

- **Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique. Patrick Hochedez**, Rafaëlle Theodose, Claude Olive, Pascale Bourhy, Guillaume Hurtrel, Nicolas Vignier, Hossein Mehdaoui, Ruddy Valentino, Roland Martinez, Jean-Marie Delord, , Cécile Herrmann, Isabelle Lamaury, Raymond Césaire, Mathieu Picardeau, André Cabié.

## INTRODUCTION

La leptospirose est une zoonose bactérienne de répartition mondiale avec une incidence plus forte dans les régions tropicales où les conditions de la transmission sont particulièrement favorables, particulièrement pendant les périodes de fortes pluviosités. L'épidémiologie de la leptospirose s'est modifiée et si la maladie représente toujours un problème de santé publique majeur en zone rurale, c'est aujourd'hui une pathologie émergente dans les bidonvilles des régions tropicales du fait de l'urbanisation non contrôlée, la surpopulation, les mauvaises conditions d'hygiène et la pullulation des rats qui constituent son principal réservoir animal (Faine 1999; Levett 2001; Bharti 2003). L'homme est un hôte accidentel dans un cycle impliquant les animaux domestique et sauvages, qui contaminent l'environnement par leurs urines. On distingue habituellement les régions tempérées où l'incidence varie de 0,1 à 1 /100 000 et les régions tropicales où l'incidence est supérieure à 10/100 000 (Ricaldi 2013). Cependant, cette incidence est sous-estimée du fait de sa présentation initiale souvent non spécifique, de l'absence de moyen diagnostique fiable et de l'absence de système de surveillance dans de nombreux pays d'endémies.

Les formes sévères de la maladie sont encore associées à une mortalité élevée, liée à plusieurs facteurs comme les difficultés diagnostiques, le retard thérapeutique, l'absence d'infrastructure pour la prise en charge des cas sévères, et d'autres facteurs moins connus comme la virulence de certaines souches ou la susceptibilité de l'hôte. Les atteintes viscérales les plus sévères de la maladie sont l'insuffisance rénale et l'hémorragie pulmonaire, toutes deux nécessitant une prise en charge réanimatoire qui n'est pas disponible dans toutes les zones d'endémie, et sont associées à une mortalité pouvant dépasser 50% (Trevejo 1998; Panaphut 2002; Paganin 2007; Gouveia 2008).

La leptospirose demeure un problème majeur de santé publique et la mise à disposition d'outils diagnostiques rapides, la prise en charge thérapeutique précoce et la mise en place de mesure de prévention adaptée restent une priorité dans la majorité des régions d'endémie. Au début des années 2000, les premières séquences complètes du génome de *Leptospira* ont été rapportées en Chine et au Brésil, deux pays où la maladie a un poids important et ces travaux sont prometteurs pour avancer dans la compréhension de la pathologie (Ren 2003; Nascimento 2004). Cependant, si des progrès majeurs ont été accomplis dans la compréhension de la biologie et de la pathogénèse de la maladie, nous ne disposons pas

encore d'un vaccin efficace contre l'ensemble des sérovars circulant et la prévention repose avant tout sur les mesures de protection individuelles ou la lutte contre les rongeurs. Près de 20 espèces et 300 sérovars ont été identifiés, parmi lesquels le sérovar *Icterohaemorrhagiae* qui est l'un des plus fréquemment responsable d'infections chez l'homme et dont l'animal réservoir est habituellement le rat (Picardeau 2013).

L'utilisation de technique de biologie moléculaire comme la PCR en temps réel, permet un diagnostic de certitude à la phase aigüe de la maladie, quand le traitement antibiotique a le plus de chance d'être efficace, et avant que les résultats des sérologies ou de la culture soient disponibles. Par ailleurs, cette même technique permet de déterminer la concentration en leptospires dans le prélèvement utilisé pour le diagnostic. Dans ce contexte, nous avons mis en place une étude de cohorte intitulée « Étude de la valeur pronostique de la leptospirémie quantitative déterminée par PCR en temps réel au cours de la leptospirose aux Antilles » et qui a obtenu le financement du PHRC 2011- Appel à projets Interrégionaux (***QS résumé du Protocole de Recherche Clinique LEPTO en ANNEXE 7.1***). L'objectif principal de cette étude était de déterminer si la leptospirémie quantitative prélevée au moment du diagnostic précoce était prédictive d'une évolution sévère de la maladie. Les objectifs secondaires étaient de décrire les caractéristiques cliniques et biologiques associées à évolution sévère de la leptospirose. Au cours de l'année 2011 et pendant le déroulement de l'étude précédemment décrite, une étude d'incidence a été réalisée par l'InVS aux Antilles à laquelle nous avons contribué activement (Cassadou 2013).

La Martinique est une île de 1 128 km<sup>2</sup> (environ 70 km de longueur, pour 30 km de largeur), sa population était estimée par l'INSEE à 398 6864 au premier janvier 2011. Elle située dans les petites Antilles et son climat est tropical humide avec une saisonnalité marquée et un maximum des précipitations lors des 2 derniers trimestres. La partie nord est la plus montagneuse et abrite la forêt tropicale humide et de nombreuses rivières ([Figure 1](#), [Figure 2](#)). Les principales ressources économiques de l'île sont l'agriculture, avec notamment l'exportation de bananes et la culture de la canne à sucre (pour la production de sucre et de rhum agricole), et le tourisme.



Figure 1 - Situation géographique de la Martinique.

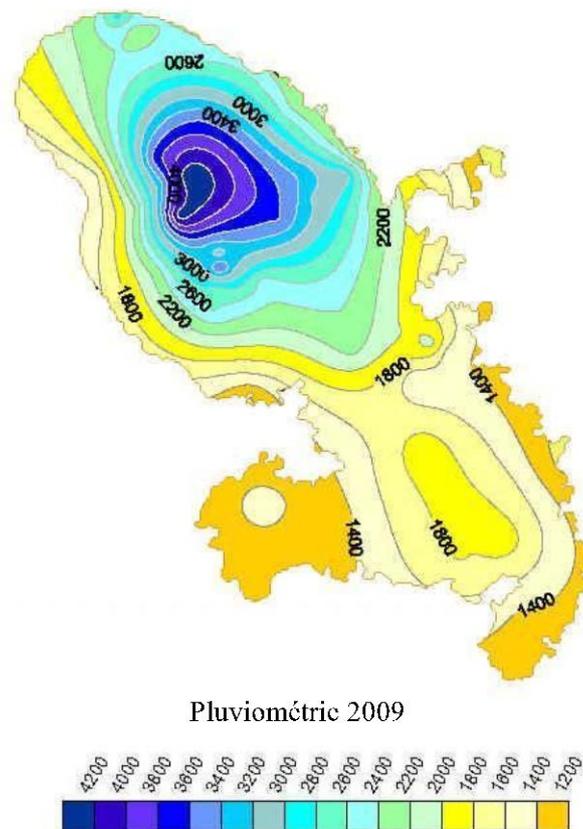


Figure 2 - Carte pluviométrique de la Martinique, 2009 (Météo France)

De la pratique clinique émerge plusieurs problématiques de santé publique : quels sont les facteurs de risques de leptospirose, quels sont les facteurs pronostiques de la maladie, et quelle est l'incidence réelle de la leptospirose aux Antilles. Dans ce travail de thèse nous nous sommes focalisés sur l'épidémiologie de la leptospirose en Martinique et, en utilisant le diagnostic par biologie moléculaire, nous avons contribué à répondre à plusieurs questions :

- Quelle est la place des tests diagnostiques comme la PCR en temps réel dans une enquête épidémiologique autour de cas groupés de leptospirose ?
- Quels facteurs de risque peuvent-ils être identifiés et quelles recommandations de prévention peuvent être données dans ce contexte ?
- Quels ont les facteurs cliniques et biologiques associés à la sévérité de la maladie ?
- Quelle sont les tests diagnostiques nécessaires au suivi de l'incidence de la maladie ?

Dans cette thèse sont présentés 3 articles : les deux premiers rapportent les résultats des enquêtes épidémiologiques menées après des événements sportifs marqués par des cas groupés de leptospirose, en discutant en particulier les différents facteurs de risques. Le troisième (*manuscrit soumis au journal Emerging Infectious Diseases le 28/06/2014*) rapporte les résultats d'une étude de cohorte dont les objectifs étaient de déterminer si l'élévation de la leptospirémie était associée à la sévérité de la maladie et identifier quels critères cliniques et biologiques pouvaient être utilisés comme facteurs pronostics à l'admission. Pour les 2 premiers articles j'ai contribué au travail par la mise en place de l'enquête épidémiologique et l'analyse des résultats en collaboration avec les co-auteurs. Pour le 3eme travail dont j'étais l'investigateur principal, j'ai rédigé le protocole de recherche clinique, inclus et suivi la majorité des patients, analysé les résultats en collaboration avec les co-auteurs. Enfin, j'ai contribué à la valorisation des résultats à travers des articles, des présentations orales et des posters, et la diffusion des conseils de prévention auprès des pratiquants des sports à risques.

Comme introduction à la présentation des résultats, le chapitre suivant fait l'état de l'art sur l'agent causal, l'épidémiologie de la leptospirose, la physiopathologie, les principales manifestations cliniques, le diagnostic biologique, la prise en charge thérapeutique et la prévention.

# 1. ETAT DE L'ART

## 1.1 Agent causal

### 1.1.1 Microbiologie

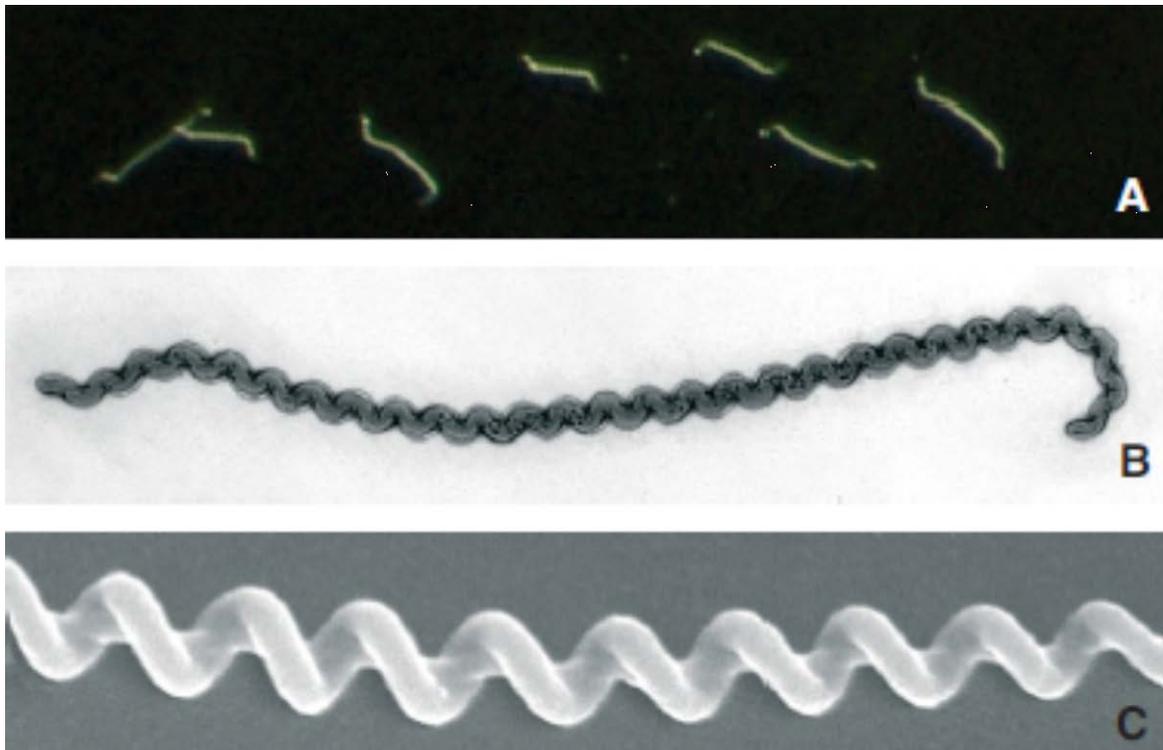
Le genre *Leptospira* appartient à l'ordre des *Spirochaetales*, qui comporte les familles *Leptospiraceae*, *Spirochaetaceae* (bactéries des genres *Treponema* et *Borrelia*) et *Serpulinaceae* (bactéries du genre *Brachyspira*) (Bourhy 2012). Ce regroupement au sein d'un même phylum sur la base de l'ARNr 16S est corrélé à des caractères morphologiques communs et uniques dans le monde bactérien : les spirochètes sont des bactéries spiralées qui possèdent un endoflagelle (flagelle périplasmique).

Les leptospires sont des bactéries très mobiles, aérobies, ayant une forme hélicoïdale, une longueur de 6 à 20 µm et un diamètre d'environ 0,1 µm rendant indispensable l'utilisation d'un microscope à fond noir (ou à défaut un microscope à contraste de phase) pour leur observation (Figure 3). Un endoflagelle est ancré dans la membrane interne à chaque extrémité de la cellule et ils se prolongent jusqu'au centre de la cellule sans se chevaucher. La rotation de l'endoflagelle est responsable de la mobilité et de l'apparition de crochets et/ou de spirales aux extrémités, ce qui leur donne leur forme caractéristique en point d'interrogation (Ko 2009).

Les premiers séquençages du génome de *Leptospira* ont été publiés par des équipes chinoises (*L. interrogans* serovar Lai, agent de la leptospirose rurale, 2003) et brésiliennes (*L. interrogans* serovar Copenhageni, agent de la leptospirose urbaine épidémique, 2004) qui ont montré combien les génomes étaient hautement conservés entre les 2 sérovars (Ren 2003; Nascimento 2004). Le génome des leptospires est constitué de deux chromosomes circulaires, d'une taille totale d'approximativement 4 mégabases (environ 4,3MB et 350 kb respectivement), et possède un Guanine-Cytosine Content (GC %) qui varie de 35 % à 41 %. Un plasmide et un bactériophage, tous deux répliquons circulaires d'une taille de 74 kb, ont aussi été décrits chez le saprophyte *L. biflexa* (Saint Girons 1990; Picardeau 2008).

Les leptospires sont des bactéries chimio-organotrophes aérobies strictes qui utilisent les acides gras à longue chaîne comme seule source d'énergie et de carbone. L'ion ammonium est la source d'azote, les vitamines B1 et B12 étant des facteurs de croissance nécessaires de même que le fer ferreux. Leur croissance optimale est obtenue à 28-30 °C avec un pH de 7,2-

7,6 (Bourhy 2012). Les leptospires sont capables de former des biofilms in vitro (Ristow 2008). Ces bactéries sont très sensibles à la dessiccation, aux pH extrêmes, à de faibles concentrations de chlore, aux milieux hypertoniques (environnements salins) et à la chaleur (Faine 1999). Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu EMJH mis au point par Ellinghausen-McCullough (1965), puis modifié par Johnson et Harris (1967) (Ellinghausen 1965; Johnson 1967).



**Figure 3** - Vue en microscope à fond noir (A) et en microscope électronique (B, C) de leptospires (Bourhy 2012).

### 1.1.2 Taxonomie

Le genre *Leptospira* a été initialement divisé en deux groupes : *L. interrogans sensu lato* pour désigner les souches pathogènes et *L. biflexa sensu lato* pour les souches saprophytes et aquicoles (Faine 1999). Vingt et une espèces de leptospires ont été décrites et classées en 3 groupes sur la base de leur phylogénie et de leur pathogénie (Cerqueira 2009). On distingue les espèces saprophytes (souches environnementales non pathogènes), les espèces pathogènes (souches isolées de l'homme ou d'animaux) et les espèces dites intermédiaires qui forment un groupe distinct sur la base de la séquence de l'ARNr 16S et pour lesquelles le caractère virulent n'a pas été démontré expérimentalement (Figure 4, Tableau 1). En 2014, une nouvelle espèce pathogène nommée *Leptospira mayottensis*, a été identifiée par l'équipe du CNR Leptospirose à l'Institut Pasteur, à partir de prélèvement sanguins de patients pris en charge à Mayotte (Bourhy 2014).

Les leptospires sont classés en plus de 300 sérovars regroupés en une trentaine de sérogroupes (sérovars antigéniquement proches) sur la base de la structure du lipopolysaccharide (LPS) (Faine 1999). L'identification du sérovar est complexe et réservée à quelques centres collaborateurs de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'électrophorèse en champ pulsé est une alternative moléculaire permettant d'identifier le sérovar à partir du profil de macrorestriction de l'ADN génomique (Herrmann 1992; Galloway 2010). La classification sérologique n'est pas toujours corrélée à la classification génétique et, du fait d'un transfert horizontal d'une partie du locus *rfb* codant la synthèse du LPS, les sérovars d'un même séro groupe peuvent appartenir à différentes espèces (de la Pena-Moctezuma 1999). La classification génomique n'a cependant pas remplacé la classification sérologique, cette dernière étant encore largement utilisée dans les études épidémiologiques car les sérovars sont généralement associés à un réservoir animal spécifique. Par exemple les rats et les chiens sont généralement les hôtes respectifs des sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* (Bharti 2003). La nomenclature officielle doit inclure l'espèce, suivi du sérovar, suivi du nom de souche ; par exemple : *Leptospira* (nom de genre) *interrogans* (nom d'espèce) sérovar *Icterohaemorrhagiae* souche Verdun (Levett 2006).

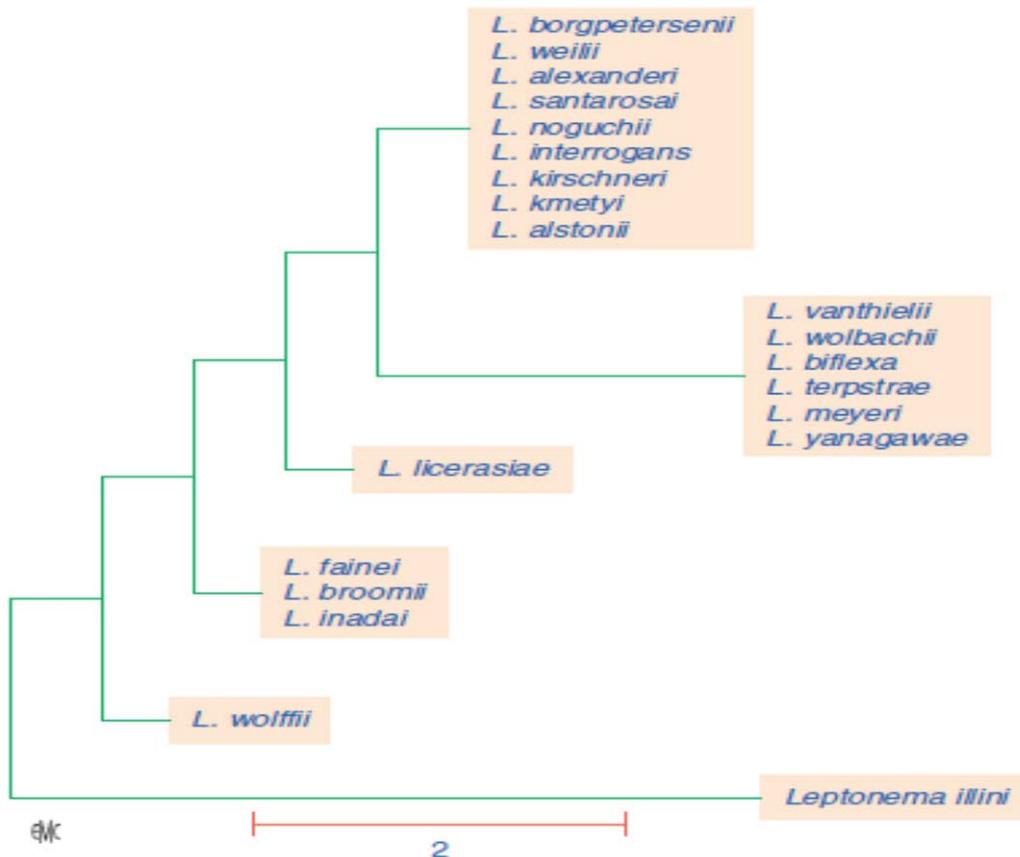


Figure 4 - Arbre phylogénétique des espèces du genre *Leptospira* (*L.*)

Construit à l'aide d'un fragment du gène *rrs* codant l'ARNr 16S. La barre correspond à deux changements de nucléotides pour 100 nucléotides (Bourhy 2012).

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	opposum	Panama
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84	souris	Danemark
<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

Tableau 1 - caractéristiques des 21 espèces de leptospires aujourd'hui décrites. D'après rapport CNRL 2012 (Picardeau 2012).

## 1.2 Epidémiologie

### 1.2.1 Cycle de la leptospirose et transmission à l'homme

La leptospirose est une zoonose au cours de laquelle l'homme est un hôte accidentel dans un cycle impliquant les animaux sauvages et domestiques. Le cycle est entretenu dans la nature par l'infection chronique des hôtes de maintenance (rongeurs, bétails), dont les tubules rénaux sont colonisés, et qui contaminent leur environnement via leurs urines. La contamination par les leptospires peut être directe, après contact avec l'urine ou les tissus d'animaux infectés, ou plus fréquemment indirecte après contact avec l'environnement contaminé par ces urines (Levett 2001). Les leptospires pénètrent dans l'organisme au niveau de lésions cutanées ou par les muqueuses des yeux, de la bouche ou du nez après contact avec de l'eau contaminée (Figure 5). Les hôtes de maintenance sont le plus souvent asymptomatiques, comme les rongeurs qui représentent le principal réservoir animal de la maladie, et peuvent excréter des leptospires dans leurs urines durant toute leur vie (Faine 1999). Cependant, d'autres animaux comme les chiens peuvent être à l'origine de contamination humaine, mais aussi présenter des manifestations aiguës et potentiellement mortelles de la maladie (Rojas 2010). Chez le bétail, la leptospirose est responsable d'avortements et de baisse de productivité avec de lourdes conséquences économiques. L'homme, même s'il peut excréter des leptospires pendant plusieurs semaines, ne semble pas une source effective de transmission. Des leptospires pathogènes ont été identifiés dans les eaux de surface de régions tempérées et tropicales, leur survie est dépendante de plusieurs facteurs dont la température, le pH et la présence d'inhibiteurs (Levett 2001; Ganoza 2006; Vein 2012; Rawlins 2014).

La prévalence des différents sérovars dans une population dépend directement du réservoir animal présent et des sérovars dont ils sont porteurs, mais aussi des conditions environnementales, des conditions de vies, de la densité de population, et du degré de contact entre les hôtes de maintenance et l'homme. La diversité des sérovars est ainsi maximale dans les régions tropicales où persiste une grande diversité du réservoir animal, et minimale dans les environnements urbains où les rats et les chiens représentent le principal réservoir animal (Ko 1999; Bharti 2003). Certaines associations hôtes-sérovars semblent ubiquitaires comme les rats et le sérovar *Icterohaemorrhagiae*, les souris et le sérovar *Ballum*, le bétail et le sérovar *Hardjo*, ou encore les chiens et le sérovar *Canicola* (Levett 2001; Bharti 2003). Cette

spécificité relative permet d'extrapoler sur les principaux réservoirs animaux en fonction des résultats des sérologies pratiquées chez l'homme (Tableau 2).

Sur les petites îles tropicales, si la grande majorité des mammifères peuvent être infectés et participer à la contamination de l'environnement, le contact avec les rats reste un facteur de risque majeur (Perrocheau 1997; Bovet 1999). Aux Antilles françaises les études vétérinaires ont confirmé la présence de l'infection chez les animaux sauvages (rongeurs, mangouste) comme domestiques (chiens, bovins, caprins, porcs, chevaux) (Desvars 2010). Les trois espèces de rongeurs coexistant aux Antilles françaises (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*) sont des hôtes de maintenance potentiels de la maladie (Figure 6).

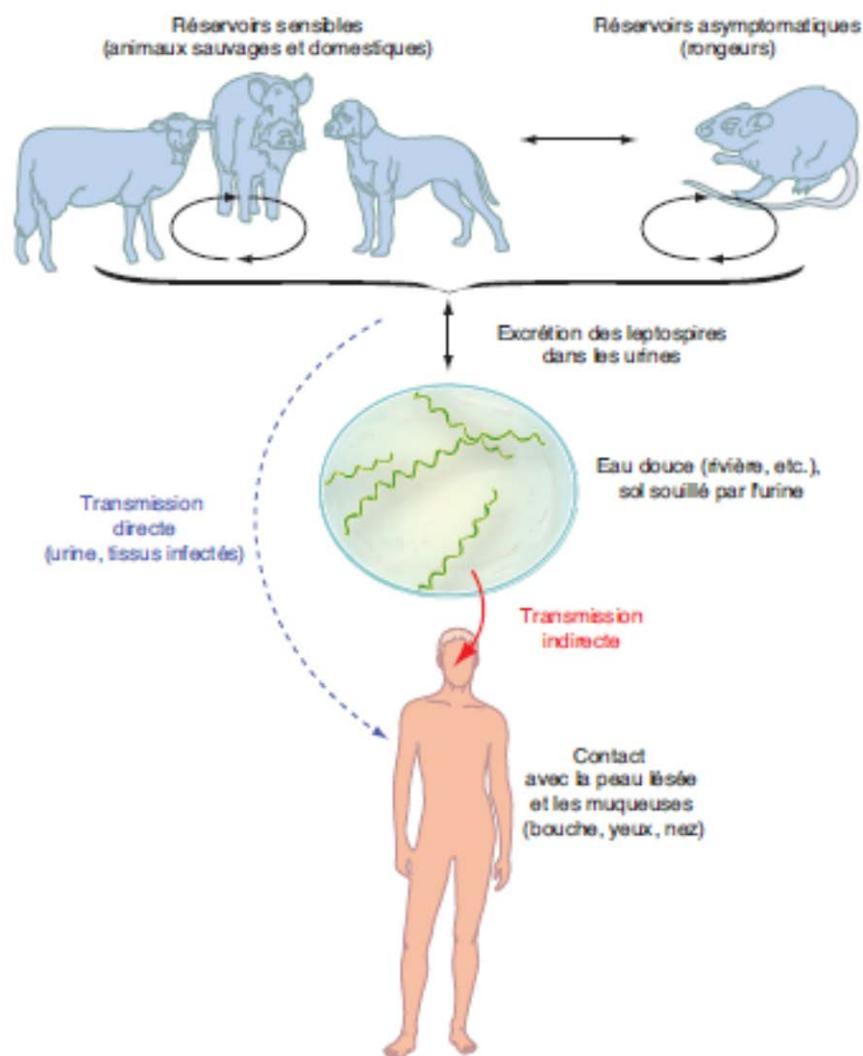


Figure 5 - Représentation schématique du cycle de la leptospirose (Bourhy 2012).

Reservoir host	Serovar(s)
Pigs	<i>pomona, tarassovi</i>
Cattle	<i>hardjo, pomona</i>
Horses	<i>bratislava</i>
Dogs	<i>canicola</i>
Sheep	<i>hardjo</i>
Racoon	<i>grippotyphosa</i>
Rats	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
Mice	<i>ballum, arborea, bim</i>
Marsupials	<i>grippotyphosa</i>
Bats	<i>cynopteri, wolffi</i>

Tableau 2 - Réservoir animal habituel des sérovars les plus communs (Bharti 2003).



*Rattus rattus*  
ou rat noir



*Mus musculus*  
ou souris commune



*Rattus norvegicus*  
ou surmulot

Figure 6 - Rongeurs présents en Martinique.

### 1.2.2 Une maladie tropicale répandue mais négligée

La leptospirose est la zoonose la plus largement répandue dans le monde mais elle est aussi considérée comme une maladie tropicale négligée, en particulier en Amérique latine et dans la région Caraïbe (Hotez 2008). La chaleur et l'humidité étant des facteurs limitant de la survie des leptospires, la maladie a un caractère saisonnier avec des pics d'incidence pendant l'été et l'automne dans les pays tempérés et pendant la saison des pluies en région tropicale. Selon les estimations de l'OMS il y aurait chaque année plus de 500 000 cas dans le monde avec un taux de mortalité pouvant excéder 10% dans certaines régions (WHO 1999; WHO 2011). Ce nombre est probablement sous-estimé dans de nombreux pays, faute de moyens diagnostics ou de système de surveillance fiable et un groupe de travail international, mis en place par l'OMS, a été chargé d'évaluer l'impact global de la maladie : Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group (LERG) (Abela-Ridder 2010).

L'incidence de la leptospirose varie de 0.1 à 1/100 000 cas par an dans les pays tempérés à 10 à 100/100 000 cas par an dans les pays tropicaux. Durant les épidémies et dans les groupes les plus exposés, l'incidence peut dépasser 100/100 000 (WHO 2003). Les incidences annuelles les plus élevées sont rapportées dans les Caraïbes, l'Amérique latine, le sous-continent indien, l'Asie du Sud-Est et l'Océanie (Pappas 2008). L'incidence est mal connue en Afrique où les conditions climatiques et environnementales devraient pourtant lui être favorables dans de nombreuses régions (Bourhy 2012; de Vries 2014).

Dans les pays industrialisés des zones tempérées, la leptospirose est une maladie qui touche habituellement certaines catégories professionnelles exposées (agriculteurs, éleveurs, personnels des abattoirs, égoutiers, vétérinaires, etc) mais l'importance relative de ces risques occupationnels tend à diminuer avec l'amélioration des mesures de prévention. La leptospirose touche par contre de manière croissante les adeptes de loisirs aquatiques (pêche, canoë-kayak, sports d'eaux vives) et les voyageurs en zone tropicale (Morgan 2002; Sejvar 2003; Bourhy 2012). En France, les données épidémiologiques sont publiées chaque année par le Centre National de Référence (CNRL, Institut Pasteur), principal laboratoire français à pratiquer le diagnostic de la leptospirose humaine et d'un des cinq Centres Collaborateurs de l'Organisation Mondiale de la Santé sur la leptospirose à travers le monde (Picardeau 2013). La France est le pays industrialisé dont le taux d'incidence est le plus élevé et pour la métropole, l'incidence est d'environ 0,5 cas pour 100 000 habitants, soit environ 300 cas notifiés tous les ans (Baranton 2006). En 2013, 385 cas ont été notifiés et l'incidence moyenne était de 0,60 cas/100000 habitants. Comme les années précédentes, l'incidence la plus élevée (3,73 cas/100000 h.) est retrouvée en Franche-Comté (44 cas). Les principaux facteurs de risque identifiés dans une étude cas-témoins réalisée en France métropolitaine en 1999-2000 étaient l'existence de lésions cutanées, la pratique du canoë-kayak, le contact avec des rongeurs sauvages, et un lieu de résidence à la campagne (Nardone 2004). La majorité des cas a été diagnostiquée par la technique de micro-agglutination (MAT). En 2013, le sérotype Icterohaemorrhagiae est prédominant comme les années précédentes (Figure 7). Le sérotype ne peut être déterminé pour une partie non négligeable des cas positifs à cause de réactions croisées entre plusieurs sérotypes en MAT. Plus de 50% des cas de leptospirose se répartissent sur la période estivo-automnale, entre les mois d'août à novembre (Figure 8)(Picardeau 2013).

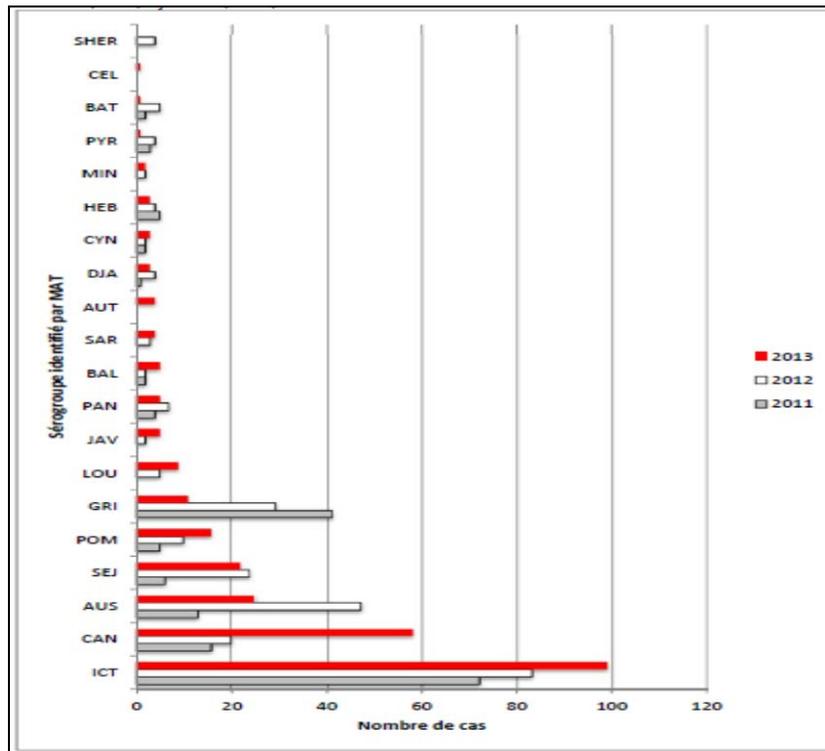


Figure 7 - Répartition des principaux sérogroupes identifiés par MAT en 2013.

Pour 70 cas séropositifs, le séro groupe n'a pu être identifié à cause de réactions croisées ou coagglutinations. 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 (Picardeau 2013).

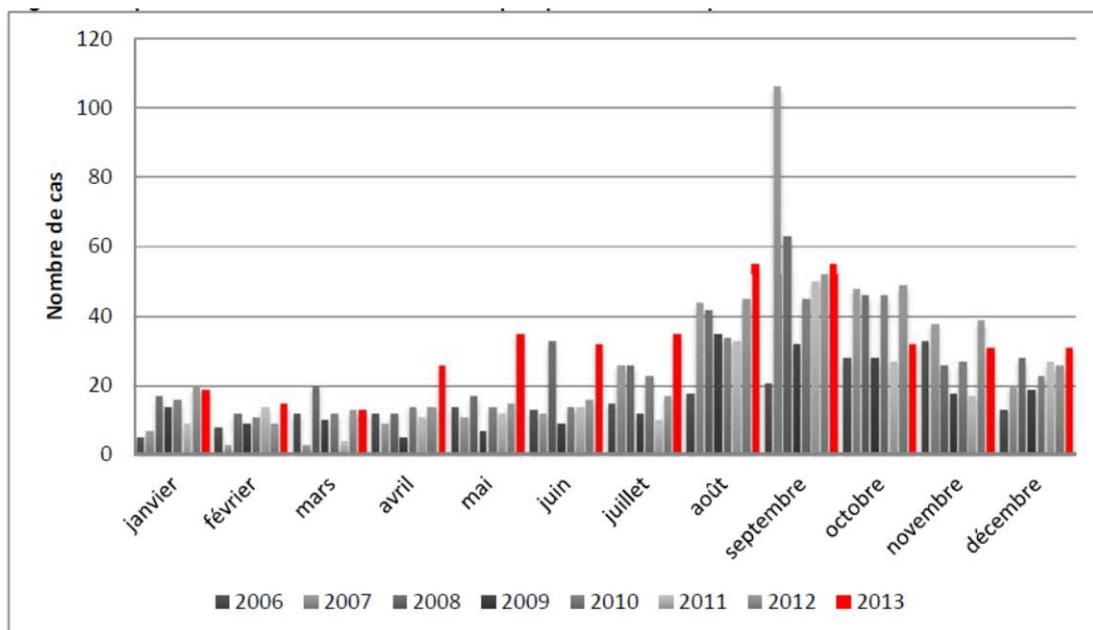


Figure 8 - Répartition dans l'année des cas de leptospirose en Métropole.

Dans les régions tropicales, les personnes habituellement les plus exposées sont celles ayant des activités professionnelles agricoles (travail dans les rizières, bananeraies, champs de canne à sucre, élevage du bétail), mais de nombreux cas surviennent aussi lors d'activités quotidiennes (jardinage, marche pied nu, ingestion d'eau contaminée) (Cacciapuoti 1987; Levett 2001). La leptospirose est un problème de santé publique émergent, en particulier du fait de l'expansion non contrôlée de la population des bidonvilles dans de nombreux pays tropicaux (WHO 2011). Les conditions de vie dans ces bidonvilles, la pauvreté, l'insalubrité, la surpopulation, et la présence de rats, rendent leurs habitants particulièrement vulnérables. (Johnson 2004; Riley 2007; Reis 2008). Dans une étude réalisée à Salvador au Brésil, les habitants d'une favela avait un risque élevé de faire une leptospirose (>3% par an) avec un risque maximum pour les hommes et les habitants ayant les plus bas revenus, et la réinfection était fréquente chez ceux vivant à proximité d'égouts à ciel ouverts (Felzemburgh 2014). D'ici 2020, la population des bidonvilles devrait atteindre 1,4 milliards et l'OMS anticipe une augmentation de l'impact sanitaire de la leptospirose sur ces populations (Lau 2010). Enfin, à côté des expositions professionnelles et occupationnelles précédemment citées, les loisirs aquatiques exposent les pratiquants au risque de leptospirose et des cas groupés ont été rapportés après la pratique d'activités comme la nage en rivière ou le rafting (CDC 1997; Katz 1997). Le développement des compétitions sportives en milieu tropical, qui s'accompagnent de regroupement important de participants, créent des conditions potentielles pour des expositions de masse (Sejvar 2003).

La survie prolongée des leptospires dans l'environnement est favorisée par l'humidité et par les températures élevées avec pour conséquence des augmentations d'incidence pendant la saison des pluies ou au décours des événements climatiques exceptionnels (inondations, cyclones), en favorisant un contact plus étroit entre les bactéries, leurs hôtes animaux et les humains (Ko 1999; Sarkar 2002; Lau 2010). De nombreuses épidémies de leptospirose ont ainsi été rapportées après des événements climatiques exceptionnels en Asie, en Amérique latine et sur des îles du Pacifique (Lau 2010). Ainsi au Brésil, plus de 10 000 cas de leptospirose sévère sont rapportés annuellement en rapport avec les épidémies urbaines associées aux saisons des pluies (McBride 2005). La saisonnalité de la maladie et l'influence des paramètres météorologiques a été étudiée à la Réunion par modélisation de séries temporelles sur la période 1998-2008 : le nombre mensuel de cas de leptospirose était lié à la température moyenne et à l'insolation du même mois et à la pluviosité des 2 mois précédents (Desvars 2011). En Guadeloupe, une augmentation du nombre de cas a été observé entre 2003 et 2005 suivant les saisons particulièrement chaudes et humides associées à 2 phénomènes *El*

*Nino* (Storck 2008). Une autre étude de séries temporelles réalisée en Nouvelle Calédonie sur la période 2000-2012, a montré que le phénomène *La Nina* était associé à une forte pluviosité et que ces 2 facteurs étaient liés temporellement avec des épidémies de leptospirose (Weinberger 2014). En réduisant l'étendue des eaux de surface par évaporation et en encourageant les activités aquatiques, les fortes températures provoquent un regroupement des activités humaines et animales au niveau des points d'eau, favorisant ainsi des conditions favorables à la transmission (Lau 2010). Les modifications attendues du climat en particulier dans les régions tropicales, la multiplication des événements climatiques extrêmes et l'élévation des températures, font craindre qu'une proportion croissante de la population soit exposée au risque de leptospirose dans les années à venir (McMichael 2006). Compte tenu de leur vulnérabilité, les zones où l'élévation du risque sera le plus marquée pourraient être les grandes zones urbaines avec bidonvilles, les zones côtières de basse altitude et les petites îles tropicales (Lau 2010).

Pour ce qui est des départements et territoires ultramarins, 618 cas ont été recensés en 2013 (Martinique, Guadeloupe, Guyane, Polynésie, Mayotte, La Réunion, Nouvelle Calédonie) par le CNRL (Tableau 3, Figure 1). L'incidence est de 15 fois (La Réunion) à plus de 50 fois (Martinique, Guadeloupe, Mayotte, Polynésie Française) plus élevée qu'en Métropole (Picardeau 2013). Le sérotype Icterohaemorrhagiae est dominant dans la plupart des régions. Une étude d'incidence a été menée aux Antilles, par la CIRE Antilles-Guyane et l'INVS, en coopération avec le CNRL, entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 31 décembre 2011 afin de disposer d'informations fiables permettant d'estimer le poids réel de la maladie aux Antilles. En prenant en compte les cas hospitalisés et les cas ambulatoires (médecins sentinelles), l'incidence a été estimée à 61 et 70/100 000 en Martinique et en Guadeloupe respectivement avec une recrudescence marquée au 2<sup>eme</sup> semestre pendant la saison la plus humide (Cassadou 2013).

Régions	Nombre de cas *	Pop. en K hab.	Incidence / 100 000 hab.
<b>Guadeloupe</b> (971)	130 (142)	404	32,18
<b>Martinique</b> (972)	130 (145)	402	32,34
<b>Guyane</b> (973)	36 (25)	237	15,19
<b>La Réunion</b> (974)	88 (95)	828	10,63
<b>Mayotte</b> (976)	78 (119)	217	35,94
<b>Polynésie française</b>	87 (102)	274	31,75
<b>Nouvelle-Calédonie</b>	69 (77)	291	23,71
<b>TOTAL OUTRE-MER</b>	<b>618 (708)</b>		

\* entre parenthèse les données 2012

Tableau 3 - Répartition des cas dans les régions d’Outre-Mer en 2013 (Picardeau 2013).

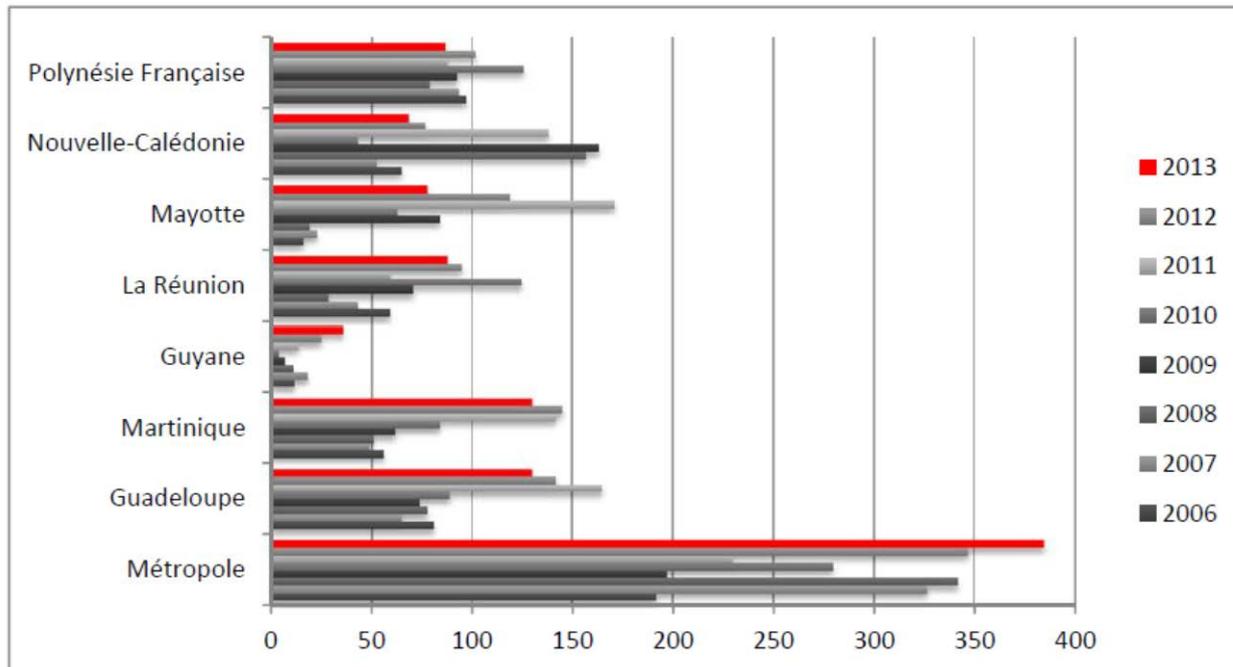


Figure 9 - Nombre de cas de leptospirose en France métropolitaine et en outre-mer par année (Picardeau 2013).

## 1.3 Physiopathologie

L'infection de l'hôte par des leptospires pathogènes peut conduire à des manifestations cliniques d'intensité très variables, depuis la forme infraclinique jusqu'à l'hémorragie pulmonaire potentiellement mortelle. Bien que la physiopathologie de la leptospirose soit encore incomplètement comprise, on considère habituellement qu'elle résulte des effets directs de la bactérie et des effets de la réponse immune de l'hôte. L'importance de l'inoculum au moment de l'exposition, la virulence de la souche infectante, et les facteurs génétiques de l'hôte semblent des éléments déterminants pour expliquer la pénétration des leptospires, leur diffusion dans l'organisme, les lésions tissulaires observées, et la colonisation persistante des tubules rénaux (Levett 2001; Bharti 2003).

### 1.3.1 Inoculum

Dans des conditions favorables de températures et d'humidité, comme c'est le cas en région tropicale, les leptospires peuvent survivre pendant plusieurs semaines sous la forme d'agrégats (Trueba 2004). La mise en évidence des leptospires dans l'environnement est cependant très délicate et des résultats négatifs peuvent être liés à l'absence de leptospires dans le milieu mais aussi à une quantité inférieure au seuil de détection ou à la présence de contaminants. Une étude réalisée dans la région amazonienne du Pérou a comparé des zones rurales et urbaines avec une approche environnementale quantitative (PCR en temps réelle) et moléculaire (séquençage de l'ARN 16S) (Ganoza 2006). Les auteurs ont montré que les cas de leptospiroses sévères survenant en zone urbaine étaient associés à la présence dans l'environnement d'une quantité 20 fois supérieure des leptospires les plus pathogènes.

### 1.3.2 Facteurs de virulence bactériens

Le genre *Leptospira* est composé d'espèces pathogènes (ex *L. interrogans*) et d'espèces non pathogènes (ex *L. biflexa*). *Leptospira biflexa*, présente dans les environnements aquatiques, est la première espèce saprophyte à avoir été séquencée et son génome a été comparé à celui des 2 espèces pathogènes *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* (Picardeau 2008). Ce travail a permis de mettre en évidence 2052 gènes (61%) communs avec les espèces pathogènes, on y retrouve des gènes de ménage mais aussi des gènes de fonctions inconnues. L'identification de gènes communs aux 2 espèces pathogènes mais absents dans *L. biflexa* témoignerait de leur implication dans la pathogenèse. Une majorité de ces gènes est de

fonctions inconnues alors que d'autres codent pour des hémolysines, des protéases, ou des lipoprotéines de membrane (Bourhy 2012). Parmi les gènes identifiés après séquençage de *Leptospira interrogans*, au moins 50 seraient liés à la mobilité qui semble un facteur de virulence majeur dans l'infection initiale et la dissémination dans l'organisme (Ren 2003). La comparaison des séquences génomiques de *L. borgpetersenii* et *L. interrogans*, 2 des espèces pathogènes les plus fréquemment rencontrées chez l'homme, montre que le premier génome est plus court et moins dense en séquence codante dans des régions qui semblent liées à la survie dans l'environnement (Bulach 2006). Selon les auteurs de ce travail, *L. borgpetersenii* pourrait ainsi évoluer vers un cycle de transmission strictement inter-hôte (Les infections à *L. borgpetersenii* serovar Hardjo sont restreintes au bétail et aux moutons) à la différence de *L. interrogans* dont le cycle de transmission fait intervenir de longs passages dans l'environnement aquatique avant de rencontrer un hôte mammifère. Parmi les espèces pathogènes, *L. interrogans* séro-groupe Icterohaemorrhagiae semble être plus souvent associée à la sévérité (Levett 2001; Herrmann-Storck 2010).

Les stratégies pour mettre en évidence les déterminants de virulence cherchent à identifier des protéines exprimées à la surface, comme la porine OmpL1 ou la lipoprotéine Lip21, en utilisant les données génomiques disponibles grâce au séquençage et aux techniques de protéomiques (Cullen 2003; Nascimento 2004). Parmi les nombreux facteurs étudiés, on peut citer l'antigène O du LPS dont la régulation pourrait déterminer le caractère aigu ou persistant de l'infection rénale et les protéines Lig (leptospiral immunoglobulin-like protein), identifiées chez les espèces pathogènes uniquement et exprimées à leur surface qui pourraient jouer un rôle majeur dans la virulence lors de l'adhésion initiale et l'invasion (Palaniappan 2002; McBride 2005; Nally 2005).

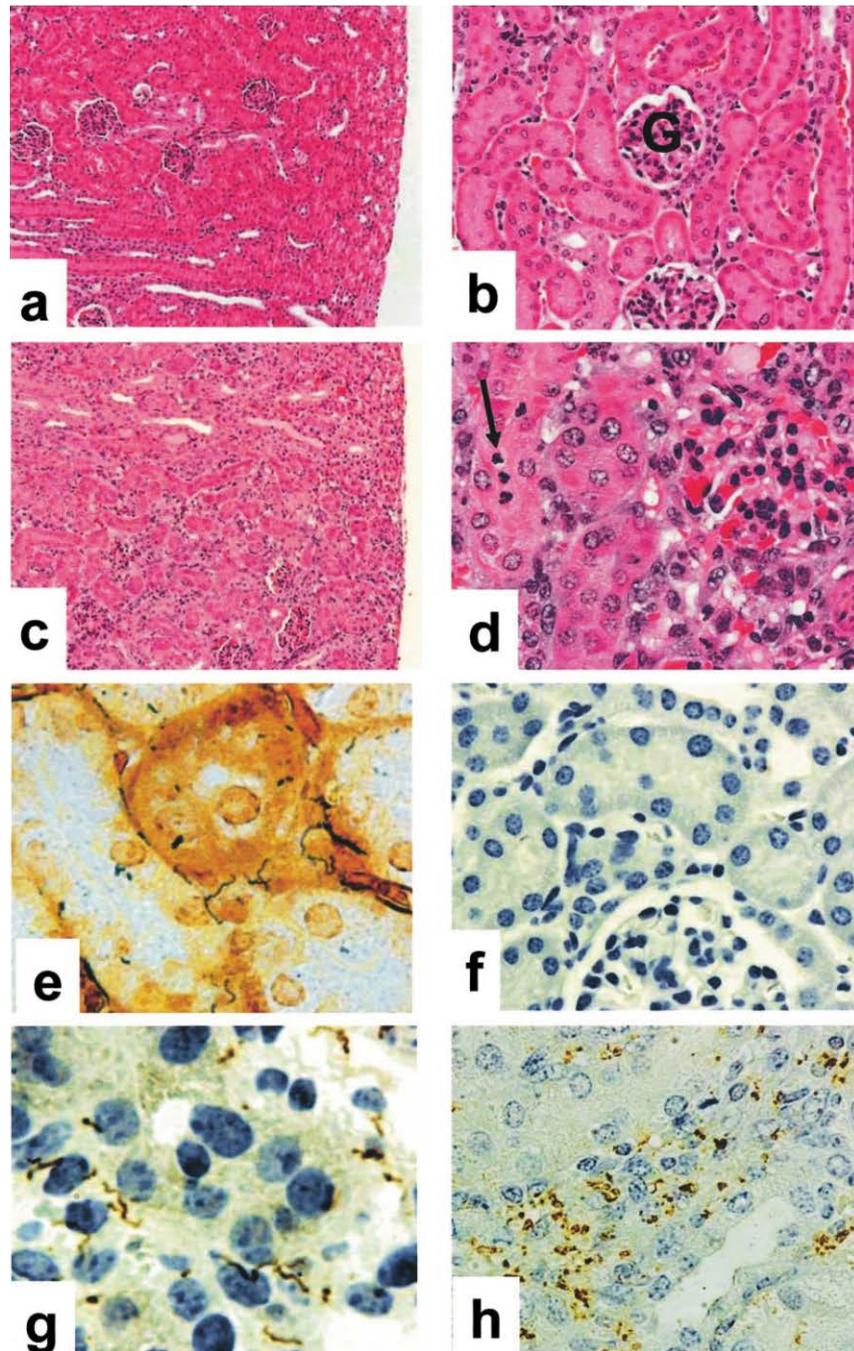
### **1.3.3 Facteurs liés à l'hôte**

L'évolution clinique de la maladie et les données anatomo-pathologiques suggèrent la participation d'un processus immunopathogène (Faine 1999). Nous n'avons pas encore une connaissance détaillée des mécanismes de l'immunité de l'hôte, mais l'immunité à médiation humorale semble la principale réponse à l'infection naturelle, une immunité passive peut être conférée par les seuls anticorps et l'immunité acquise naturellement est uniquement restreinte au sérovar homologue ou aux sérovarys les plus proches (Levett 2001). Par ailleurs, l'immunité à médiation cellulaire, en particulier les lymphocytes T g-d, pourrait jouer un rôle important dans la réponse pro-inflammatoire (McBride 2005).

L'existence d'une susceptibilité plus grande à la leptospirose chez certains individus n'a été rapportée que dans quelques études à ce jour. Dans les suites d'un triathlon comprenant une épreuve de natation dans un lac de l'Illinois (USA) en 1998, plus de 50 personnes ont contracté la leptospirose et il a été montré que l'ingestion d'eau du lac et la présence d'un variant du système Human Leukocyte Antigen (HLA DQ6) étaient associés à un risque accru de développer la leptospirose (Lingappa 2004). Une autre équipe a montré qu'un polymorphisme des gènes codant les interleukines 4 (IL4) et IL4R $\alpha$  était associé à la sensibilité à la leptospirose (Fialho 2009).

### **1.3.4 Principales lésions tissulaires au cours de la leptospirose**

L'étude des modèles animaux et les séries autopsiques mettent en évidence la présence de lésions de vascularite, d'une atteinte endothéliale et d'infiltrats inflammatoires au niveau du foie, des reins, du cœur et des poumons. Dans une série autopsique indienne de 62 cas, les saignements étaient au premier plan dans de nombreux tissus et organes, en particulier au niveau pulmonaire. Les principales atteintes étaient une hémorragie intra-alvéolaire massive (48 cas) considéré comme la cause du décès, une néphrite interstitielle parfois associée à une nécrose tubulaire aigue (45 cas) et une myocardite (24 cas) (Salkade 2005). L'atteinte rénale est une néphrite interstitielle aiguë avec atteinte initiale de la fonction tubulaire, défaut de réabsorption proximal du sodium et augmentation de l'excrétion distale du potassium qui conduit à une hypokaliémie caractéristique (Figure 10)(Andrade 2008). Au cours de l'atteinte hépatique, l'ictère n'est pas associé à une nécrose hépatocellulaire massive (au contraire de ce qui est observé dans une hépatite virale) et les fonctions hépatiques reviennent à la normale après la convalescence (Figure 11). La physiopathologie de l'atteinte pulmonaire semble liée à un phénomène auto-immun plutôt qu'à une atteinte directe liée à la bactérie et se manifeste par des hémorragies intra-alvéolaires et interstitielles (Figure 12)(Abdulkader 2002; Nally 2004; McBride 2005). Dans les muscles cardiaques et squelettiques des lésions de myocardites et des foyers de myosites peuvent être observés, respectivement. Un mécanisme d'autoimmunité semble aussi responsable de l'atteinte ophtalmologique qui peut survenir plusieurs semaines après le début des symptômes (Bharti 2003).



**Figure 10** - Atteinte rénale dans un modère animal.

**a et b:** Reins d'un cochon d'Inde sain. On note les tubules normaux et les glomérules (G) dans le cortex. H&E, grossissement, x40 (**a**) et x100 (**b**). **c-h:** Reins d'un cochon d'Inde infecté. **c et d:** Infiltrats inflammatoires interstitiels, avec neutrophiles (flèche) présents dans des régions avec nécrose tubulo-interstitielle. H&E, grossissement, x40 (**c**) and x100 (**d**). **e** : coloration argentée montrant des leptospires. Grossissement, x200. **f**: Contrôle négatif pour la coloration IH des leptospires. Grossissement, x100. **g et h**: Coloration IH montrant des spirochères dans et autour des tubules. Grossissement, x100 (**g et h**) (Nally 2004).

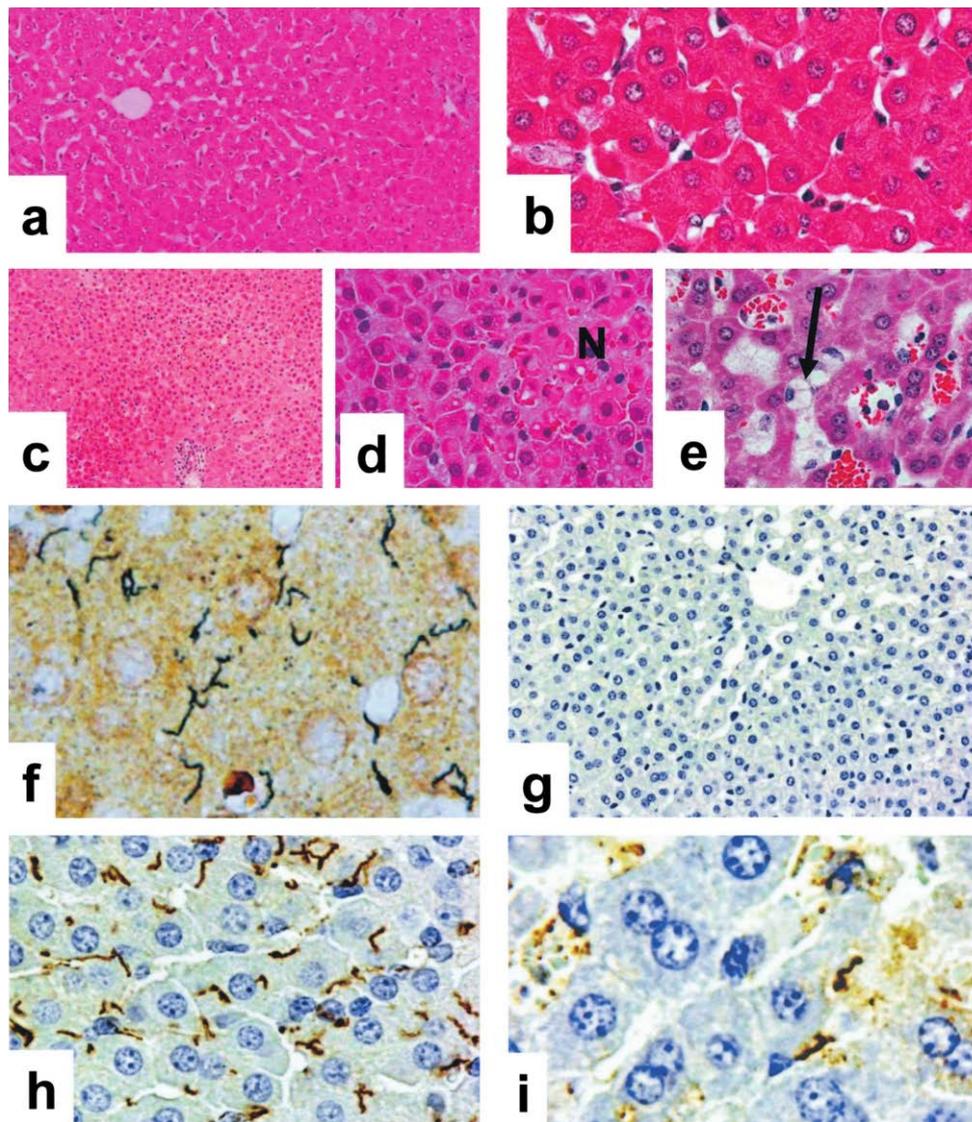


Figure 11 - Atteinte hépatique dans un modèle animal.

**a et b:** Foie d'un cochon d'Inde sain. On note les travées et les espaces sinusoidaux. H&E, grossissement, x40 (**a**) et x200 (**b**). **c-i:** Foie d'un cochon d'Inde infecté. **c et d:** Distorsion de l'architecture avec perte de la cohésion des travées, et nécrose des hépatocytes (N). **e:** Augmentation des macrophages (flèche) dans les sinusoides. H&E, grossissement, x40 (**c**), x100 (**d**), and x200 (**e**). **f:** Coloration argentée des leptospires. Grossissement, x400. **g:** Contrôle de coloration négatif IH des leptospires. Grossissement, x100. **h et i:** Coloration IH montrant de nombreux leptospires le long des hépatocytes. Grossissement, x200 (**h**) et x400 (**i**) (Nally 2004).

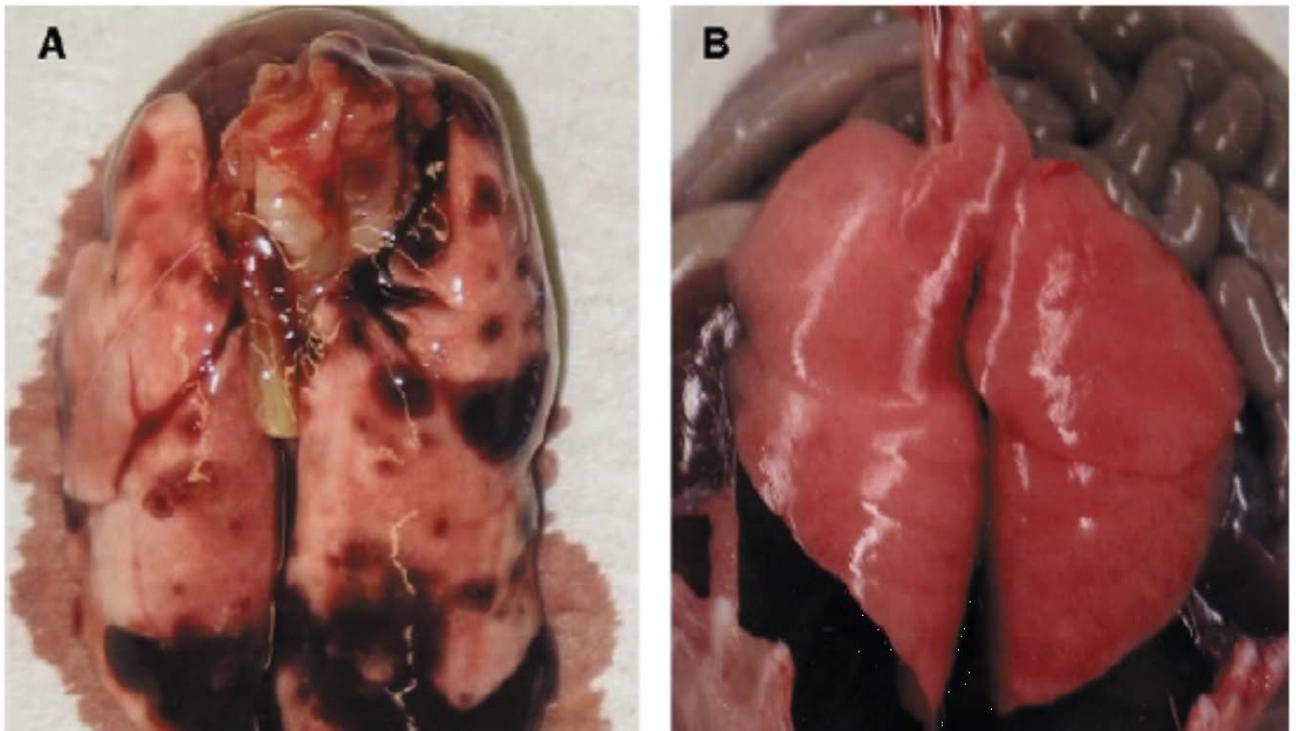


Figure 12 - Atteinte pulmonaire dans un modèle animal.

(A) Hémorragie pulmonaire chez un cochon d'inde infecté par une souche de *Leptospira interrogans* serovar copenhageni obtenue à partir d'un patient Brésilien atteint de leptospirose avec hémorragie pulmonaire. (B) Poumon d'un cochon d'inde normal pour comparaison. D'après référence (Bharti 2003).

## **1.4 Manifestations cliniques**

La leptospirose se distingue par un très grand polymorphisme clinique, de la forme anictérique observée dans 90 % des cas jusqu'à la défaillance multiviscérale potentiellement mortelle caractérisée par l'association d'un ictère, d'une insuffisance rénale et d'hémorragies viscérales (Levett 2001). A l'occasion d'épidémies survenues au Nicaragua, au Pérou ou en Thaïlande, des études de séroprévalences ont rapporté que l'infection asymptomatique pouvait survenir dans 60-70% des cas chez l'homme vivant en zone d'endémie, et pouvait être associée à l'excrétion asymptomatique des leptospires dans les urines (Ashford 2000; Phraisuwan 2002; Ganoza 2010).

L'incubation est de 10 jours en moyenne (3 à 30 j). Selon une description classique, l'évolution de la leptospirose est biphasique avec une phase septicémique la première semaine des symptômes, suivie d'une brève défervescence thermique puis d'une phase immunologique caractérisée par une reprise de la fièvre, la survenue éventuelle de complications, l'apparition des anticorps et l'excrétion de leptospires dans les urines (Levett 2001). Dans la pratique courante, il est souvent très difficile de distinguer ces phases, les patients pouvant se présenter d'emblée avec des complications viscérales.

Les hommes sont beaucoup plus souvent malades et représentent plus de 80 % des cas de leptospirose en particulier dans la tranche d'âge active de 20 à 50 ans, quelle que soit la zone géographique (Yersin 1998; Katz 2001; Herrmann-Storck 2005). Cette prédominance masculine semble surtout liée à une surreprésentation des hommes dans les activités professionnelles et de loisir à fort risque d'exposition (Katz 2001). Lors de l'étude d'incidence réalisée aux Antilles en 2011, les hommes étaient plus souvent concernés par la maladie (sexe-ratio de 6,2 pour la Martinique) et la tranche d'âge la plus touchée était la tranche des 20-59 ans (Cassadou 2013).

### **1.4.1 Forme anictérique pseudo-grippale**

C'est la forme clinique la plus fréquente et les principaux symptômes sont une fièvre de survenue brutale, des céphalées et des myalgies intenses (Levett 2001; Bharti 2003). L'absence de spécificité de cette présentation explique en partie le sous diagnostic de la leptospirose en zone d'endémie. Dans les grandes séries publiées, les signes et symptômes rapportés lors de l'admission à l'hôpital associent une fièvre de début brutal à plusieurs des signes suivants : céphalées (70-98 %), myalgies (40-100 %), suffusion conjonctivale (28,5-99

%), manifestations digestives (ictère [0-95 %], anorexie [46-92 %], vomissements [18-69 %], douleurs abdominales [26-43 %], diarrhée [11-36 %]), et des manifestations respiratoires (toux [20-57 %], hémoptysies [9-51 %]) (Levett 2001; Bharti 2003; Bourhy 2012). Les myalgies habituellement intenses (région lombaire, cuisses, mollets) sont liées à une rhabdomyolyse avec élévation marquée des CPK. La présence d'une hépatomégalie (15 %-83 %), d'adénopathies (19 %-49 %) ou d'une éruption cutanée (2 %-7 %) est moins souvent rapportée. Parmi les signes cités précédemment, l'association d'une suffusion conjonctivale (œil rouge sans trouble visuel ni écoulement purulent), d'un ictère conjonctival et de myalgies au niveau des mollets et des lombes semblent assez spécifiques de la leptospirose (Levett 2001).

#### **1.4.2 Complications viscérales**

Les complications décrites dans ce chapitre peuvent être isolées mais sont le plus souvent associées dans le cadre d'une défaillance multiviscérale, c'est-à-dire caractérisée par la défaillance d'au moins 2 organes. La survenue de complications viscérales est rapportée dans 5 % à 15 % des cas et les formes les plus sévères sont le syndrome de Weil et le syndrome hémorragique pulmonaire (Bharti 2003).

#### ***Défaillance hépatique et rénale***

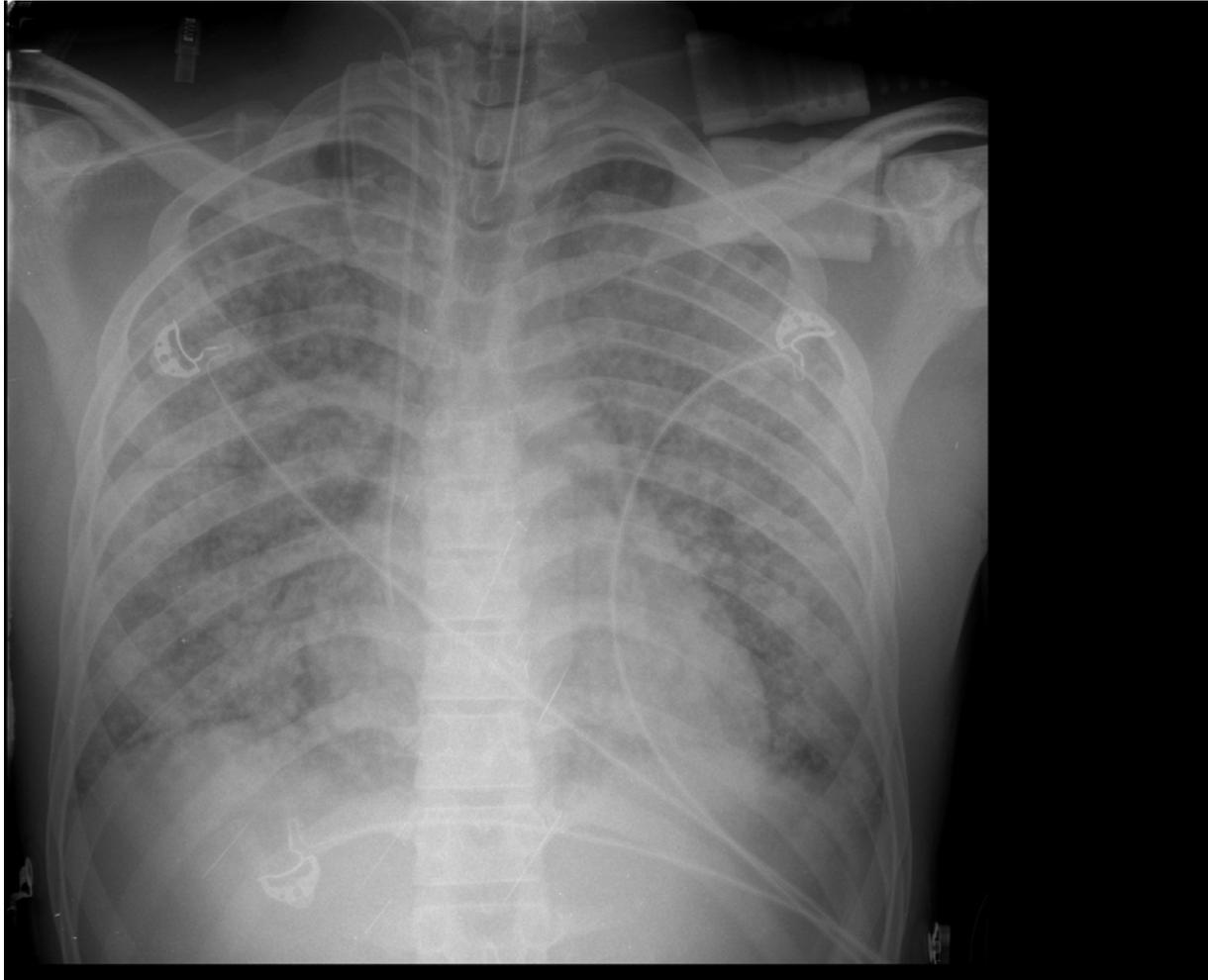
Historiquement, la manifestation la plus caractéristique de la leptospirose sévère est l'atteinte hépato-rénale associée à des manifestations hémorragiques ; cette association est décrite sous le nom de syndrome de Weil avec un taux de mortalité pouvant atteindre 15 % (Levett 2001). Chez les patients ictériques, qui représentent 5 % à 10 % des patients atteints de leptospirose, le bilan biologique met en évidence une élévation parfois majeure de la bilirubine conjuguée (qui peut dépasser 500  $\mu\text{mol/l}$ ), souvent associée à une élévation moins marquée des transaminases ou des phosphatases alcalines. L'atteinte hépatique est habituellement réversible sans séquelles, la disparition de l'ictère et la normalisation du bilan hépatique peuvent cependant prendre plusieurs semaines.

L'insuffisance rénale est observée au cours de la leptospirose dans 16 % à 40 % des cas selon les séries, elle est habituellement non-oligurique, associée à une hypokaliémie caractéristique, et nécessite un traitement par dialyse dans les cas les plus sévères (Seguro 1990; Abdulkader 1996; Andrade 2008). Dans une étude réalisée au Brésil lors d'une épidémie urbaine, une hypokaliémie était mise en évidence dans 54 % chez 116 patients

atteints de leptospirose (Ko 1999). Au stade tardif, l'atteinte rénale évolue vers une insuffisance rénale oligurique parfois associée à une hyperkaliémie, et nécessitant une prise en charge par hémodialyse (Panaphut 2002; Bharti 2003). Lorsque les patients peuvent bénéficier d'une prise en charge adaptée, la dysfonction rénale au cours de la leptospirose est habituellement complètement réversible (Andrade 2008). La thrombopénie est observée dans plus de 50 % des cas et est souvent corrélée à l'apparition de l'insuffisance rénale. Elle semble survenir en l'absence de coagulation intravasculaire disséminée (Bharti 2003).

### *Manifestations pulmonaires*

Les manifestations pulmonaires sont rapportées dans 20 % à 70 % des cas selon les études, de la simple toux associée ou non à une hémoptysie jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aiguë nécessitant une assistance respiratoire (O'Neil 1991) (Paganin 2009). La forme la plus sévère est un syndrome hémorragique pulmonaire (severe pulmonary hemorrhage syndrome [SPHS] ou leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome [LPHS]) lié à une hémorragie intra-alvéolaire et à l'origine d'hémoptysies et d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë avec un taux de mortalité pouvant dépasser 50 % (Figure 13) (Park 1989) (Zaki 1996) (Trevejo 1998; Yersin 2000; Segura 2005; Paganin 2007; Gouveia 2008). Ces atteintes pulmonaires sévères sont plus souvent rapportées depuis les années 1990 et ont été décrites y compris en l'absence des classiques défaillances hépatiques et rénales (Trevejo 1998; Marotto 1999; Segura 2005). Dans une étude réalisée à La Réunion chez 147 patients atteints de leptospirose, une atteinte pulmonaire (définie par une hémorragie alvéolaire massive ou deux signes parmi : dyspnée, toux, douleur thoracique, râles pulmonaires ou hémoptysies) était rapportée chez 85 % des cas (Paganin 2007). Parmi les 38 patients ayant eu un lavage bronchoalvéolaire à l'admission, 31 (81 %) avaient une hémorragie alvéolaire, dont 12 (39 %) avec une radiographie pulmonaire normale. La radiographie pulmonaire était anormale chez 65 % des patients et la majorité avait une atteinte interstitielle bilatérale ; l'atteinte alvéolaire étant un signe de sévérité. Selon les auteurs, l'hémorragie pulmonaire pourrait donc être constante dans la leptospirose mais rester parfaitement asymptomatique dans les formes mineures (Paganin 2009).



**Figure 13** - Radiographie thoracique d'un patient présentant une hémorragie intra-alvéolaire au cours d'une leptospirose sévère.

### *Manifestations cardiaques*

L'atteinte cardiaque peut se manifester par des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG), le plus souvent sans dysfonction ventriculaire gauche, et dans les formes les plus sévères par une myocardite responsable d'une insuffisance cardiaque (Levett 2001). Dans une étude indienne réalisée chez 50 patients atteints de leptospirose avec un suivi cardiologique, des anomalies ECG étaient constatées chez 70 % des patients. Des troubles de conduction étaient observés dans 36% des cas et la fibrillation auriculaire était le trouble du rythme le plus fréquent. Cependant la fonction ventriculaire gauche évaluée par échocardiographie était toujours normale (Rajiv 1996). Ainsi, si les anomalies ECG sont fréquemment observées au cours de la leptospirose, la dyspnée et l'hypotension sont le plus souvent d'origine extra-cardiaque. Les études autopsiques révèlent l'existence de myocardites interstitielles dans plus de 50 % des cas, mais dans ce contexte, il est rarement possible d'affirmer que l'atteinte

cardiaque était l'unique cause du décès dans un contexte de défaillance multiviscérale (Ramachandran 1977; de Brito 1987).

### *Manifestations neurologiques*

La méningite aseptique est la manifestation neurologique la plus fréquente, en particulier chez les enfants et adultes jeunes (Levett 2001). Cette atteinte n'est pas associée à la gravité de la maladie et ne nécessite pas un traitement antibiotique spécifique. Les patients symptomatiques présentent un syndrome méningé fébrile (céphalées rétro-orbitaires, vomissements, raideur de nuque) et la ponction lombaire met en évidence une pléiocytose lymphocytaire, une hyperprotéinorachie modérée et une normoglycorachie. Dans ce contexte, la réalisation systématique d'une ponction lombaire n'est donc pas nécessaire si le diagnostic de leptospirose est confirmé. Des complications neurologiques rares et sévères ont été rapportées: hémorragie intracérébrale, accident vasculaire cérébral, syndrome de Guillain-Barré (Forwell 1984) (Morgan 1980; Lessa 1981).

### *Manifestations ophtalmologiques*

La suffusion conjonctivale, généralement bilatérale, est un signe physique très fréquent au cours de la leptospirose ; elle se distingue de la conjunctivite classique par l'absence de douleurs et d'écoulement purulent. L'association d'une suffusion conjonctivale et d'un ictère conjonctival serait très évocatrice du diagnostic (Levett 2001). La complication ophtalmologique caractéristique est l'uvéite qui peut être unilatérale ou bilatérale, avec atteinte du segment antérieur ou de tous les segments (panuvéite). Elle peut survenir dès la deuxième semaine d'évolution jusqu'à plusieurs mois après la phase fébrile et semble être la seule complication tardive de la leptospirose (Rathinam 2005). Des cas groupés de panuvéites bilatérales ont été rapportés en Inde dans un contexte épidémique après une période d'inondation (Rathinam 1997; Rathinam 2005). D'autres manifestations plus rares ont été rapportées comme la chorioretinite, la papillite, la névrite optique et l'hémorragie rétinienne (Rathinam 2005).

### **1.4.3 Facteurs pronostiques de décès au cours de la leptospirose**

La mortalité varie de 5 % à plus de 20 % dans les principales séries publiées en zone d'endémie avec de grandes disparités selon les zones géographiques et surtout le type de défaillance viscérale observée, les défaillances rénales et pulmonaires étant les plus sévères (Everard 1984; Park 1989 ; Dupont 1997; Ko 1999 ; Panaphut 2002; Esen 2004). Dans une étude réalisée en Thaïlande, le taux de mortalité était nul chez les patients sans insuffisance rénale, de 6 % chez les patients présentant une insuffisance rénale sans ictère, et de 20 % chez les patients présentant un syndrome de Weil (défaillance hépato rénale) (Panaphut 2002). Dans une autre étude réalisée au Brésil, le taux de mortalité était respectivement de 18 %, 24 % ou 55 % selon que les patients présentaient une atteinte rénale isolée, une atteinte pulmonaire isolée ou une combinaison des deux (Spichler 2008). Dans le travail thaïlandais précédemment cité, les auteurs ont étudié prospectivement les facteurs pronostiques de décès au cours de la leptospirose chez 121 patients sérologiquement confirmés (Panaphut 2002). Dans cette étude, 17 (14%) décès étaient rapportés et la présence d'une hypotension, d'une oligurie, d'une hyperkaliémie ou de râles pulmonaires à l'admission ont été identifiés comme des facteurs pronostiques indépendants de décès. L'hémorragie pulmonaire et le syndrome de détresse respiratoire aiguë étaient les principales complications associées au décès, suivies par l'insuffisance rénale compliquée et la défaillance multiviscérale.

Dans les principales études rétrospectives publiées à ce jour, les 2 facteurs indépendants les plus souvent associés au décès sont comme précédemment la survenue d'une atteinte rénale (oligurie, anurie, hyperkaliémie) ou d'une atteinte respiratoire (dyspnée, insuffisance respiratoire, présence d'infiltrats pulmonaires radiologiques, hémorragie pulmonaire, nécessité d'une ventilation mécanique) (Dupont 1997; Daher 1999; Ko 1999; Marotto 1999; Tantitanawat 2003; Paganin 2007; Spichler 2008; Herrmann-Storck 2010). Les autres facteurs identifiés sont la présence d'un choc, les anomalies ECG, l'altération de la conscience et l'âge avancé (Esen 2004). La thrombopénie, souvent observée au cours de la leptospirose, a été identifiée comme un facteur prédictif indépendant de la mortalité dans 2 études réalisées respectivement au Brésil (<70 000) et en Thaïlande (<100 000) (Tantitanawat 2003; Spichler 2008).

#### **1.4.4 Diagnostic différentiel**

En l'absence de présentation clinique spécifique, la confusion initiale avec d'autres pathologies infectieuses est possible, en particulier en zone tropicale avec le paludisme ou une arbovirose (Zaki 1996; Bharti 2003). L'atteinte pulmonaire ou la survenue d'hémorragies peuvent faire évoquer selon région géographique une infection à Hantavirus ou une fièvre hémorragique virale (Antoniadis 1995; Monsuez 1997). Dans une étude réalisée en 2001 à Dhaka au Bangladesh lors d'une épidémie de dengue, 18% des patients testés négatifs pour la dengue étaient testés positifs pour la leptospirose (LaRocque 2005). Lors d'une épidémie urbaine de leptospirose survenue en 1996 à Salvador (Brésil) pendant la saison des pluies, et concomitante d'une épidémie de dengue, un diagnostic initial de dengue était porté chez plus de 40 % des cas confirmés de leptospirose (Ko 1999). Un diagnostic initial erroné de dengue était associé à une prescription tardive du traitement antibiotique lorsque le diagnostic de leptospirose était finalement porté, et une évolution plus sévère de la maladie (Flannery 2001). L'importance de moyens diagnostics permettant un diagnostic rapide des 2 maladies était souligné dans ces différentes études.

## **1.5 Diagnostic biologique**

Devant un patient fébrile, un diagnostic précoce est essentiel puisque l'antibiothérapie est d'autant plus efficace qu'elle est débutée précocement dans l'évolution de la maladie (Faine 1999; WHO 2003). Comme vu précédemment, la présentation clinique initiale souvent non spécifique de la leptospirose nécessite des outils diagnostics rapides et facilement accessibles pour la distinguer de pathologies comme la dengue en zone d'endémie (LaRocque 2005).

### **1.5.1 Les tests biologiques usuels**

Les perturbations biologiques observées sur le bilan « standard » (numération formule sanguine, bilan biochimique, marqueurs de l'inflammation) permettent d'orienter la recherche étiologique et de dépister des défaillances d'organes. La présence fréquente d'une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles associée à une forte élévation de la CRP permettent d'évoquer une infection bactérienne (association absente dans les infections virales aiguës comme la dengue). Une thrombopénie est observée dans plus de 50 % des cas et ne semble pas liée à un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (Edwards 1986; Bharti 2003). L'association d'une altération de la fonction rénale et d'une hypokaliémie est caractéristique. Dans les formes plus sévères, on peut observer selon le type de défaillance : une élévation de la créatinine (défaillance rénale), une forte élévation de la bilirubine totale et conjuguée, une cytolyse hépatique, une acidose, et une élévation du taux de créatine phosphokinase (rhabdomyolyse) (Seguro 1990; Dupont 1997; Coursin 2000; Andrade 2008).

### **1.5.2 Cinétique des leptospires et des anticorps dans le sang**

Au cours de la leptospirose on peut décrire 2 phases distinctes. La phase aigüe ou septicémique au cours de laquelle on peut mettre en évidence l'ADN bactérien dans le sang dure habituellement de 7 à 10 jours (Levett 2001). Ensuite, la phase immune débute une semaine après le début des symptômes et correspond à l'apparition des anticorps et la disparition des bactéries dans le sang (Figure 14). Compte tenu de cette cinétique, il apparait que la recherche d'ADN dans le sang peut être négative si la leptospirémie est faible (en dessous du seuil de détection), si le prélèvement est tardif ou réalisé après administration d'antibiotiques qui éliminent rapidement les leptospires du sang. En miroir, un prélèvement

sérologique pratiqué pendant la phase aigüe, avant l'apparition des anticorps, sera faussement négatif.

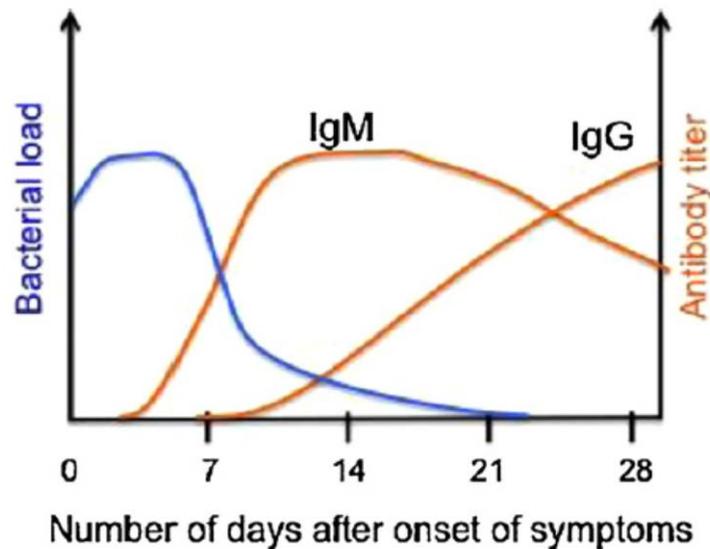


Figure 14- Evolution schématique de la leptospirémie et des anticorps au cours de la leptospirose (Picardeau 2013).

### 1.5.3 Diagnostic bactériologique direct : mise en évidence des leptospires ou de leur ADN

#### *Détection de l'ADN bactérien par amplification génique (PCR)*

Les techniques d'amplification génique (PCR conventionnelle ou PCR en temps réel) développées ces 20 dernières années permettent aujourd'hui de confirmer le diagnostic dans les premiers jours de la maladie, au moment où le traitement antibiotique a le plus de chance d'être efficace (Levett 2001). Ces techniques restent cependant encore insuffisamment accessibles dans les pays en développement où un diagnostic rapide est pourtant primordial (McBride 2005). La RT-PCR a l'avantage d'être rapide et d'avoir une bonne sensibilité (de l'ordre de  $10^2$ - $10^3$  bactéries/ml de sang). Compte tenu de la cinétique précédemment décrite, la PCR doit être prescrite précocement pendant la première semaine des symptômes, de préférence avant toute antibiothérapie. Une PCR négative peut donc être le résultat d'une bactériémie inférieure au seuil de détection ou d'un prélèvement trop tardif. Parmi les nombreuses méthodes publiées, on cite les PCR en temps réel ayant pour cible les gènes spécifiques de leptospires pathogènes lipL32 et Lfb1 (LFB pour *Leptospira* fibronectin

binding protein 1) (Merien 2005; Stoddard 2009). Cette dernière méthode a été mise au point à l'Institut Pasteur en Nouvelle Calédonie et est actuellement utilisée en Martinique (Janaud 2007). En pratique courante, seuls les prélèvements sanguins sont utilisés mais la technique peut aussi être pratiquée sur le LCR (6e j après le début de maladie) ou les urines (7e j après le début de maladie) (Figure 15). Pour la recherche par PCR, le sang est recueilli sur tube d'acide éthylène-diamine tétra-acétique (EDTA) (Figure 16). Les techniques PCR actuelles permettent de détecter les leptospires pathogènes mais sans caractérisation de l'espèce, du sérotype ou du sérovar. Cependant, l'analyse de la courbe de fusion de la technique de RT-PCR ciblant *lfb1* semble pouvoir donner des premières informations puisque qu'elle semble pouvoir différencier *L.interrogans* des autres espèces pathogènes (Figure 17) (Merien 2005; Bourhy 2011). A l'heure actuelle, il reste donc capital d'essayer d'isoler les leptospires en culture afin de pouvoir identifier les souches circulantes.

### **Examen microscopique direct**

Cet examen, non réalisé en pratique courante, doit être réalisé précocement pendant la première semaine et nécessite le recours à un microscope à fond noir car les leptospires ne sont pas visualisés avec les colorations usuelles comme le Gram. Les leptospires apparaissent comme des bactéries fines et longues, très mobiles et le plus souvent avec des crochets à leurs extrémités (Figure 3). Cet examen est difficile car le seuil de détection est de l'ordre de  $10^4$  bactéries/ml et le risque de faux positif induit par les débris cellulaires est important. Les leptospires peuvent être visualisés par immunohistochimie ou après coloration argentique (Warthin-Starry) dans les tissus (foie et rein principalement), mais ces techniques ne sont pas utilisées dans la pratique courante (Bourhy 2012).

### **Culture**

La culture a une place fondamentale dans l'identification des souches circulantes mais c'est une technique fastidieuse et inappropriée pour le diagnostic précoce de la maladie. L'ensemencement doit se faire pendant la première semaine de la maladie, le plus rapidement possible après le prélèvement sanguin, sur tube hépariné, et avant toute prescription d'antibiotiques (Postic 2000) (Figure 16). Selon la chronologie de la maladie la culture peut aussi être réalisée à partir du LCR ou des urines (à partir du 7<sup>e</sup> jour) mais ces 2 derniers prélèvements sont moins rentables et peu pratiqués (Figure 15). Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson-Harris)

(Ellinghausen 1965; Johnson 1967). Des dilutions dans plusieurs tubes de 10 ml d'EMJH sont nécessaires afin de limiter le pouvoir inhibiteur des cellules sanguines dans le milieu. Les cultures sont ensuite incubées à une température de 28 à 30 °C à l'obscurité et sont observées chaque semaine au microscope à fond noir pendant 2 mois, ce qui rend la technique longue et fastidieuse. En France, les cultures positives peuvent être adressées au CNRL (Centre national de référence de la leptospirose, Institut Pasteur) pour identification définitive des leptospires (Bourhy 2012).

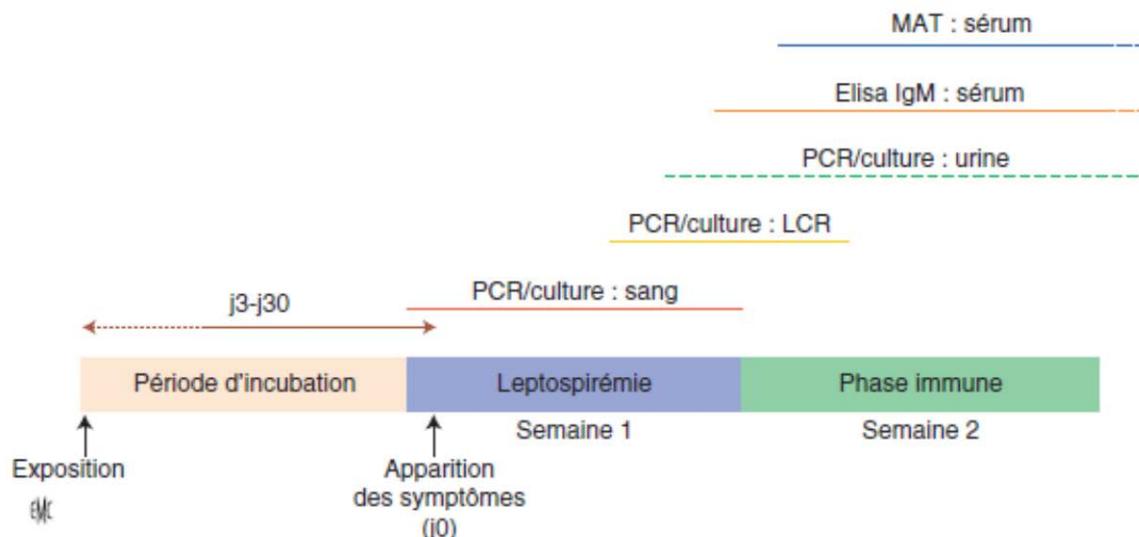
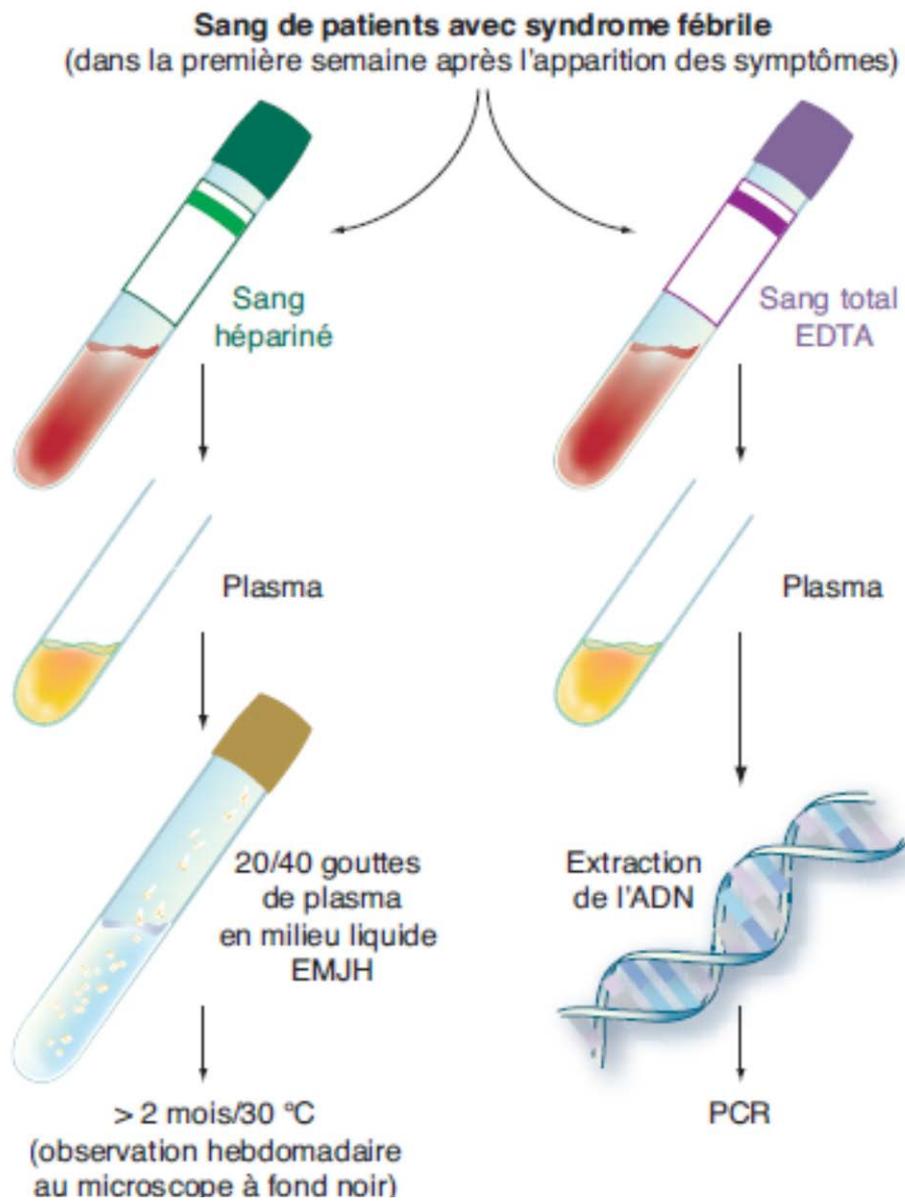


Figure 15 - Cinétique de la leptospirose au cours de l'infection.

*L'infection entraîne une bactériémie durant les premiers jours de l'infection. Suite à l'augmentation du titre des anticorps agglutinants (phase immune), les leptospires sont éliminés de la circulation sanguine. Les leptospires sont aussi retrouvés dans le liquide céphalorachidien et de manière transitoire dans les urines. MAT : microscopic agglutination test ; Elisa : enzyme-linked immunosorbent assay ; PCR : polymerase chain reaction ; LCR : liquide céphalorachidien (Bourhy 2012).*



**Figure 16** - Détection des leptospires à partir de prélèvements sanguins par culture ou amplification génique.

*EDTA : acide éthylène-diamine tétra-acétique ; ADN : acide désoxyribonucléique ; EMJH : milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (Bourhy 2012).*

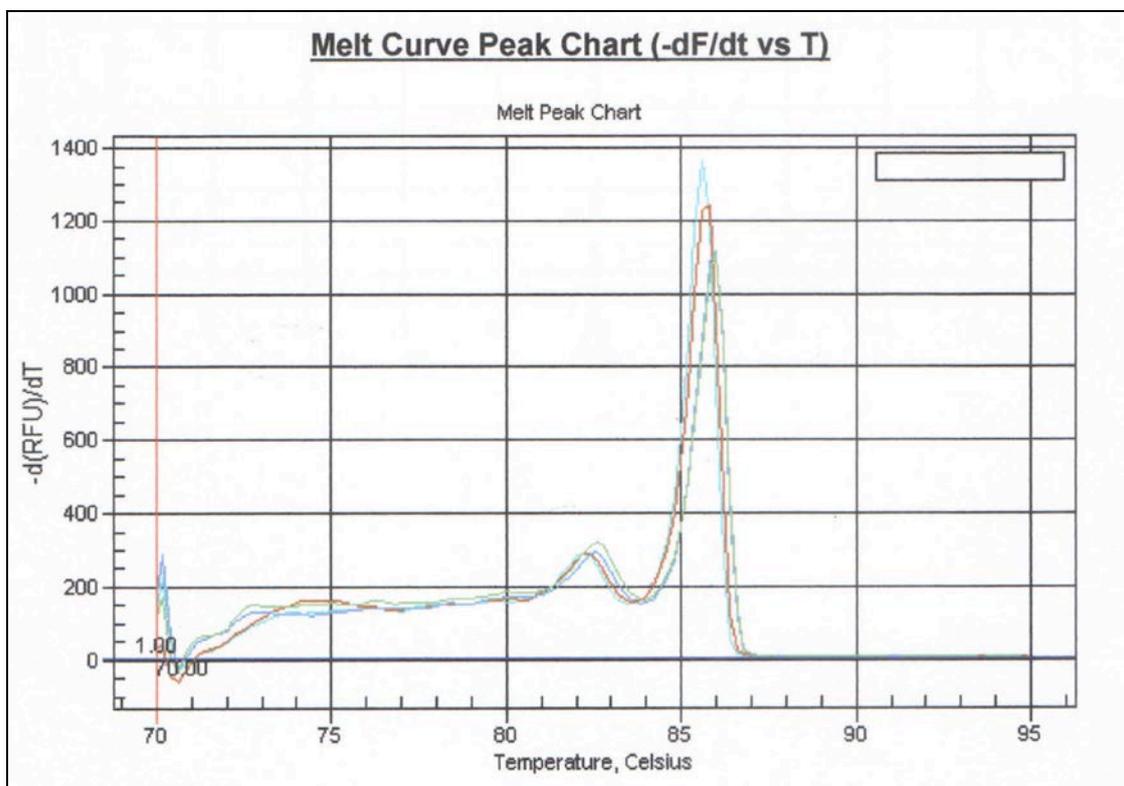
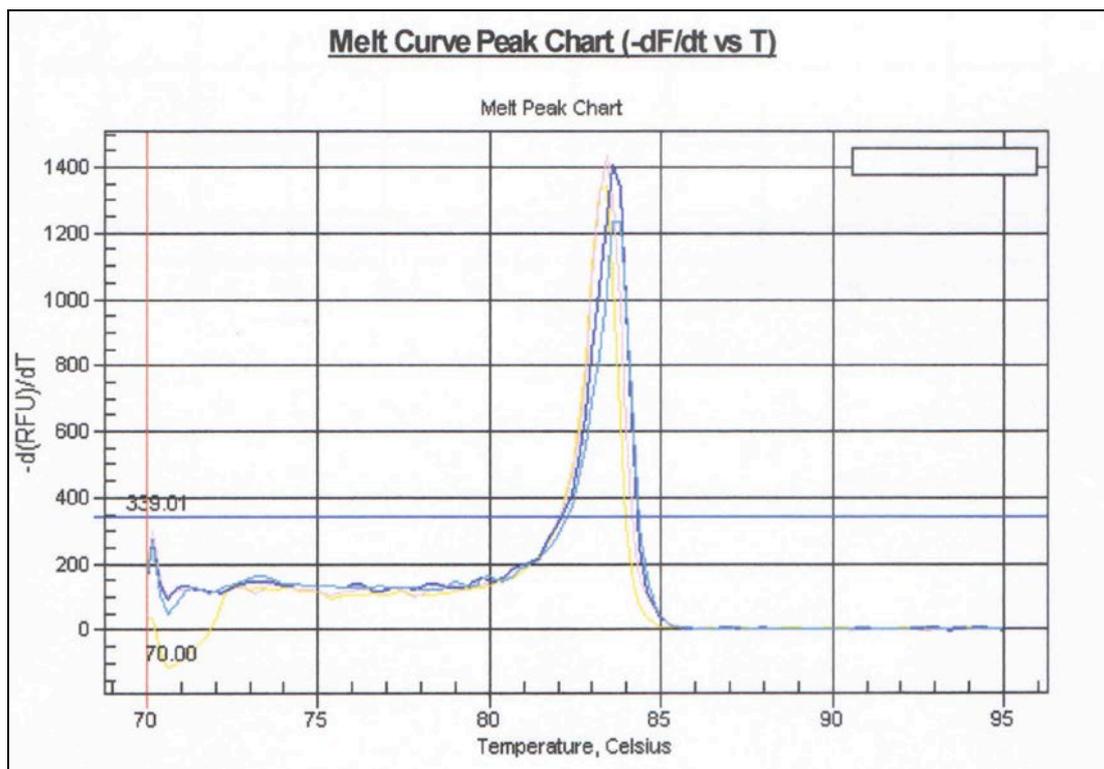


Figure 17 - Courbes de fusion

*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae (courbe du haut)  
 et *Leptospira borgpetersenii* serovar Castelloni (courbe du bas)

### 1.5.4 Diagnostic sérologique

La mise en évidence des anticorps spécifiques est possible à partir du 5<sup>e</sup> jour après l'apparition des symptômes et doit se faire sur du sérum (Figure 15). Toute réaction de dépistage (ex : ELISA IgM) doit être confirmée par la technique de référence (MAT). Le diagnostic biologique de la leptospirose a été l'objet d'un rapport d'évaluation publié par la HAS en 2011 (HAS 2011).

#### *Test de dépistage*

Les réactions de type Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) immunoglobulines M (IgM) (trousses commercialisées ou préparation « maison ») sont sensibles et relativement spécifiques (Trombert-Paolantoni 2009; Bourhy 2012). L'Elisa se positive plus précocement que le MAT (J5/J6) et permet d'aider à différencier une leptospirose évolutive d'une maladie antérieure grâce à la mise en évidence des IgM (Figure 14). Tout résultat positif ou douteux par Elisa nécessite une confirmation par le test de référence MAT. La macroagglutination avec l'antigène thermorésistant (TR), malgré l'intérêt potentiel lié à sa rapidité d'exécution et son faible coût manque de sensibilité (62 %) et de spécificité (84 %) et n'est plus recommandée (Picardeau 2008).

#### *Confirmation par le test de référence : Microscopic Agglutination Test (MAT)*

Le test de micro-agglutination consiste à évaluer au microscope à fond noir le degré d'agglutination de cultures de leptospires vivantes par le sérum de malade (Martin 1918). Un sérum est considéré comme positif pour un antigène testé, à une dilution donnée, si au moins 50 % des leptospires sont agglutinés par rapport à un témoin antigène sans sérum. Depuis 2004, le titre seuil est fixé au 1/100 pour la métropole et au 1/400 pour les régions endémiques (Polynésie Française, Guadeloupe, Martinique, La Réunion, Mayotte, Nouvelle-Calédonie, Futuna) (Bourhy 2012). Le MAT se positive vers le J8/J10 avec un titre généralement plus élevé pour l'antigène *L. biflexa* souche Patoc et parfois de nombreuses coagglutinines pour plusieurs sérogroupes. Le MAT est une méthode spécifique de sérotype (et non de sérovar), elle nécessite l'entretien d'une collection de souches vivantes représentatives des principaux sérogroupes et qui serviront de batterie d'antigènes. Au CNRL, 16 souches sont utilisées (dont la souche non pathogène *L. biflexa* souche Patoc 1 qui a la particularité de croiser avec de nombreux antigènes de sérogroupes pathogènes) auxquelles

peuvent s'ajouter des souches locales dont le sérotype est spécifique, par exemple de certaines régions ultramarines (Bourhy 2012). C'est une technique complexe à mettre en œuvre et nécessitant une forte expertise tant dans sa réalisation que dans son interprétation. La confirmation d'un cas par le MAT nécessite deux prélèvements à 2 semaines d'intervalle avec une séroconversion ou une augmentation significative (au moins x 4) des titres d'anticorps. Compte tenu du nombre élevé de réactions croisées pendant la phase aiguë, un sérum tardif (> J 20) est nécessaire pour déterminer le sérotype présumé ; l'identification définitive du sérotype nécessitant l'isolement de la souche pathogène en culture. Les anticorps peuvent persister des années après l'exposition initiale et une sérologie positive en MAT à un taux faible (ex 1/100) peut correspondre soit à un début de leptospirose, soit à la trace d'une infection ancienne, soit à des anticorps vaccinaux (Cumberland 2001). La confrontation du MAT avec un Elisa IgM permet alors de conclure. Une antibiothérapie très précoce peut conduire à un titre très limité voire négatif (Faine 1999).

### **1.5.5 Identification**

Le typage des souches pathogènes a un rôle épidémiologique de premier ordre puisque la détermination du sérotype ou du séovar est le premier pas pour l'identification des réservoirs et l'établissement de stratégies de contrôle (McBride 2005). La détermination définitive du sérotype (sérotypie) se fait à partir des souches isolées en culture et repose sur la micro-agglutination avec une batterie de sérums de lapins correspondant aux principaux sérotypes. Quand la culture n'est pas pratiquée, les résultats du MAT sont utilisés par défaut mais il n'y a pas toujours d'adéquation entre la détermination des sérotypes après culture et celle déterminée par MAT à partir du sérum du patient du fait des possibles réactions croisées et phénomènes de coagglutination (Katz 2003; Levett 2003; Kusum 2005; Smythe 2009). En France, le CNRL de l'Institut Pasteur de Paris est le laboratoire référent pour l'identification des leptospires par sérotypie et différentes approches moléculaires (Cerqueira 2009). L'espèce génomique est déterminée par amplification, séquençage et analyse phylogénétique du gène codant l'ARNr 16S (Merien 1992). L'identification du séovar a été longtemps réalisée par détermination du profil de macro-restriction de l'ADN génomique total par électrophorèse en champs pulsé (PFGE), cette méthode est très discriminante mais elle est fastidieuse (Herrmann 1992; Galloway 2010). Cette identification peut aujourd'hui se faire par des méthodes moléculaires plus rapide comme la Multi Locus Sequence Typing (MLST) ou la Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)

Analysis (MLVA) qui sont utilisables pour les espèces génomiques pathogènes les plus couramment rencontrées (*L. interrogans*, *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii*) (Majed 2005; Ahmed 2006; Salaun 2006).

### **1.5.6 Conclusions du rapport d'évaluation de la HAS sur le diagnostic biologique de la leptospirose, 2011**

Les conclusions de la HAS s'appuient sur un faisceau d'arguments prenant en compte les caractéristiques des tests mais aussi les données cliniques (HAS 2011).

Sur cette base, deux des tests évalués trouvent leur place dans la stratégie diagnostique de la leptospirose :

- La PCR en temps réel pour la première semaine de la maladie. La technique présente une excellente spécificité, son résultat est rapide ce qui est très important pour une maladie comme leptospirose. C'est le seul test biologique utilisable en pratique clinique pendant la première semaine de la maladie, la culture bactérienne n'étant pas adaptée en raison de son délai de réalisation trop long. Plusieurs laboratoires ont déjà l'expérience de son utilisation ;
- L'ELISA IgM en phase immune de la maladie. Ce test est accessible à tout laboratoire, rapide à réaliser et permet au clinicien d'étayer sa décision pour la prise en charge d'un patient suspecté de leptospirose. Il doit être confirmé par la MAT car ses performances diagnostiques ne sont pas optimales.

Le test MAT reste le test de référence utilisable seulement par quelques laboratoires experts, comme par exemple le CNR des Leptospire.

Par ailleurs, trois tests évalués n'ont pas leur place dans la stratégie diagnostique actuelle de la leptospirose en France :

- La PCR (non en temps réel) qui est une étape de développement technologique aujourd'hui dépassée avec la mise au point de la PCR en temps réel ;
- Les tests unitaires à lecture visuelle potentiellement utilisables dans les situations sans autre alternatives mais pour lesquels il ne semble pas y avoir d'expertise en France et qui peuvent être remplacés par le test ELISA IgM ;

– Le test TR qui présente des performances diagnostiques insuffisantes, de plus, l'utilisation de ce test a été marqué par une instabilité de certains réactifs et un retrait de lots à l'origine d'une rupture de stocks.

## 1.6 Traitement

La réduction de la mortalité au cours de la leptospirose repose sur une antibiothérapie précoce et la prise en charge urgente des défaillances rénales, respiratoires et cardiovasculaires.

### 1.6.1 Le traitement antibiotique

Le traitement antibiotique doit être prescrit le plus tôt possible, dès que le diagnostic est suspecté et de préférence dans les 5 premiers jours de la maladie, avant que les leptospires ne disséminent dans les tissus (Levett 2001). Au-delà de 5 jours l'intérêt de l'antibiothérapie est plus discutée même si la majorité des cliniciens prescrivent un antibiotique chez un patient symptomatique, quelle que soit la durée d'évolution (WHO 2003). Dans la prise en charge des leptospiroses ictériques, les études historiques comparant l'efficacité de la pénicilline contre placebo ont donné des résultats contradictoires concernant le bénéfice du traitement antibiotique. Malgré cela, l'utilisation des antibiotiques dans le traitement de la leptospirose prouvée ou cliniquement suspectée est universellement recommandée, y compris dans les formes modérément sévères (Levett 2001; Bharti 2003). Les deux classes d'antibiotiques usuellement prescrites dans le traitement de la leptospirose sont les  $\beta$ -lactamines et les cyclines. À ce jour, aucune résistance clinique à ces antibiotiques n'a été rapportée.

#### *Formes non compliquées*

Dans les formes non compliquées, les traitements recommandés sont l'amoxicilline, l'ampicilline ou la doxycycline par voie orale pendant 7 jours. L'efficacité de la doxycycline a été rapportée dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo chez des militaires américains au retour du Panama. Administrée oralement pendant 7 jours, la doxycycline était associée à un raccourcissement de la durée des principaux symptômes (fièvre, céphalées, myalgies) et prévenait l'apparition d'une leptospirurie (McClain 1984).

#### *Formes compliquées*

Dans les formes compliquées on recommande de débiter le traitement par voie intraveineuse, de préférence par une cephalosporine de 3<sup>e</sup> génération (ceftriaxone, cefotaxime), pour une durée de 7 à 10 jours. Les bénéfices de la pénicilline G intraveineuse (6 MU/j)

administrée pendant 7 jours, dans le traitement de la leptospirose sévère, ont été rapportés pour la première fois dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo réalisée dans les années 1985-1986 aux Philippines (Watt 1988). Dans le groupe traité par pénicilline, les auteurs rapportaient une disparition plus rapide de la fièvre, une amélioration plus rapide de la fonction rénale, une disparition de la leptospirurie et un raccourcissement de la durée d'hospitalisation. Cependant, aucune réduction de la mortalité n'a été rapportée. Bien que l'efficacité clinique de la pénicilline n'ait pas été confirmée dans une autre étude contre placebo réalisée à la même époque et que l'on ne dispose pas d'arguments définitifs sur les bénéfices du traitement, un traitement antibiotique est actuellement recommandé par les différents experts devant toute leptospirose symptomatique (Edwards 1988; Bharti 2003; Vinetz 2003). Même si elles semblent exceptionnelles, des réactions de Jarisch-Herxheimer ont été rapportées et doivent être suspectées en cas de manifestations évocatrices chez un patient traité par pénicilline (Friedland 1991).

Comparée à la pénicilline G (6 MU/j), la ceftriaxone (1 g/j) prescrite pendant 7 jours semble aussi efficace pour le traitement des formes sévères. Ses avantages sont l'administration en une seule fois par jour et un spectre d'activité antibactérien plus large, ce qui permet de prendre en compte une éventuelle infection à bacilles à Gram négatif parfois difficile à différencier en début de prise en charge (Panaphut 2003). Dans une autre étude réalisée en Thaïlande, les auteurs ont comparé l'efficacité de la pénicilline G (6 MU/j), le céfotaxime (4 g/j) et la doxycycline (200 mg/j) parentérale pour le traitement des leptospiroses sévères (Suputtamongkol 2004). Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence concernant le taux de mortalité, la durée de la fièvre ou des défaillances d'organes entre les trois traitements.

En pratique, il est actuellement recommandé de privilégier les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération en première intention dans les leptospiroses sévères hospitalisées, afin de traiter un éventuel sepsis à bacilles à Gram négatif qui pourrait avoir une présentation clinique identique. Une fois le diagnostic de leptospirose confirmé, le relais peut ensuite se faire par l'amoxicilline. La durée du traitement est de 7 jours dans toutes les études précédemment citées et aucune étude n'a étudié l'intérêt de prolonger ce traitement.

## 1.6.2 Le traitement des défaillances viscérales

Les patients se présentant avec des complications viscérales, qu'elles soient inaugurales ou survenant après plusieurs jours d'évolution, doivent être identifiés sans délai afin d'être pris en charge en unités de soins intensifs et de réanimation (Levett 2001). Comme rapporté au chapitre précédent, le bénéfice de l'antibiothérapie pour ces patients vus le plus souvent tardivement est incertain et la prise en charge précoce des défaillances rénales, pulmonaires et cardiaques est l'élément fondamental pour réduire la mortalité de ces formes sévères (McBride 2005).

L'atteinte rénale survenant au cours de la leptospirose est le plus souvent non oligurique et associée à une hypokaliémie. A un stade précoce, le traitement repose sur une compensation des pertes hydro-électrolytiques et est associée à un bon pronostic (Abdulkader 1996). Chez les patients évoluant vers une forme anurique, un recours à l'hémodialyse est indispensable pour passer cette phase critique associée à une forte mortalité (Seguro 1990; Abdulkader 1996; WHO 2003; Andrade 2008).

La survenue d'une hémorragie intra-alvéolaire massive est une des complications les plus sévères de la leptospirose et conduit à un syndrome de défaillance respiratoire aigu caractérisé par une faible compliance pulmonaire. Une prise en charge en réanimation est nécessaire et fait appel à une ventilation mécanique « protective » à bas volumes et basses pressions de plateau afin d'éviter les lésions alvéolaires induites par les hautes pressions de ventilation (Amato 1998; Network. 2000). Cette approche thérapeutique améliore le pronostic mais la mortalité liée au SHPS reste élevée même quand un traitement approprié est mis en place. Bien que l'atteinte pulmonaire semble liée à un processus auto-immun, l'utilisation de thérapie immunosuppressive comme les corticoïdes n'a été rapportée que dans des séries non contrôlées et n'est pas actuellement recommandée (McBride 2005; Rodrigo 2014).

La prise en charge des autres défaillances d'organe n'est pas spécifique, ainsi la défaillance circulatoire fait appel à l'utilisation d'amines vasoactives, et les complications hémorragiques nécessitent l'administration de transfusion globulaire et de concentrés plaquettaires.

Au total, la précocité du diagnostic étiologique et l'identification précoce des patients à risque est un élément fondamental de la prise en charge, afin de débiter précocement une antibiothérapie adaptée mais aussi pour une prise en charge précoce des défaillances viscérales en service de réanimation.

## 1.7 Prévention

En l'absence d'un vaccin efficace contre l'ensemble des souches circulantes et disponible dans toutes les régions d'endémies, on dispose aujourd'hui de peu de mesures de prévention efficaces contre la leptospirose. La chimioprophylaxie semble intéressante mais ne concerne qu'une population très restreinte (voyageurs, militaires) lors d'expositions exceptionnelles (Haake 2002). Dans une étude réalisée en Thaïlande après une épidémie, il a été montré que le port de vêtements protecteurs et la présence de plaies cutanées étaient associées respectivement à une diminution et une augmentation du risque d'infection (Phraisuwan 2002). Malheureusement, le port de vêtements protecteurs est souvent irréalisable, que ce soit en zone rurale ou dans les bidonvilles du sud. Pour les communautés urbaines exposées essentiellement par la présence de rats, la prévention repose en premier lieu sur l'amélioration des conditions sanitaires (McBride 2005). Cependant, la prévention de la leptospirose rurale semble beaucoup plus inaccessible compte tenu de la diversité du réservoir animal et sauvage, et la multiplicité des sources de transmission environnementales.

### 1.7.1 Vaccination

La vaccination des humains ou des animaux réservoirs à l'origine de la transmission à l'homme devrait être une ligne majeure de prévention mais au regard de la population exposée la couverture vaccinale est minime. L'intérêt du vaccin est limité par plusieurs facteurs : il ne protège que contre le sérotype entrant dans la composition vaccinale (pas de protection croisée), l'immunité induite est de courte durée, et il n'est disponible que dans quelques pays. La multiplicité des sérovars pathogènes présents à travers le monde rend l'élaboration d'un vaccin sous-unitaire difficile (Ko 2009). Aux Antilles françaises, les sérotypes Icterohaemorrhagiae et Ballum prédominent mais il existe une grande diversité génétique et certains sérovars n'ont pas encore été identifiés (Bourhy).

Le vaccin humain contre la leptospirose n'est disponible que dans quelques pays comme la France, la Chine, Cuba, et la Russie (McBride 2005). Les souches utilisées pour la fabrication des vaccins sont habituellement la souche inactivée du sérovar prédominant dans le pays concerné. En France, un vaccin a été initialement développé en 1974 pour les égoutiers de la ville de Paris. Ce vaccin humain monovalent est constitué de *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae souche Verdun inactivée par le formaldéhyde et a été commercialisé sous le nom de Spirolept® dans les années 1980 (Mailloux 1982; Mailloux

1983). Les indications du vaccin sont détaillées dans le Calendrier Vaccinal, selon l'avis du Haut Conseil de la santé publique (Ministère des Affaires sociales et de la Santé 2013). La vaccination concerne quasi exclusivement le milieu professionnel et elle est proposée par le médecin du travail aux personnes exerçant une activité professionnelle exposant spécifiquement au risque de contact fréquent avec des lieux infestés par les rongeurs (égoutiers, entretiens des canaux, activités spécifiques en eau douce ...) mais aussi les personnels des abattoirs et les travailleurs agricoles. Le schéma vaccinal est relativement lourd puisqu'il comporte deux injections à 15 jours d'intervalle, un rappel entre 3 à 6 mois et ensuite tous les 2 ans, si l'exposition persiste.

### **1.7.2 Prophylaxie médicamenteuse**

L'efficacité d'une prophylaxie antibiotique par doxycycline en prévention de la leptospirose a été analysée dans 3 études randomisées réalisées au Panama, au Brésil et en Inde (Takafuji 1984; Gonsalez 1998; Sehgal 2000). L'administration hebdomadaire de doxycycline (200 mg/sem) était associée à une diminution du nombre de cas microbiologiquement confirmés dans un groupe de 940 soldats américains participant à un exercice militaire de trois semaines au Panama, mais pas dans une population de résidents d'une zone rurale des îles Andaman suivis pendant une période de 12 semaines (Takafuji 1984; Sehgal 2000). Dans une étude réalisée en post exposition après une inondation à Sao Polo au Brésil, l'administration d'une dose unique de doxycycline ne semblait pas efficace pour réduire le risque de développer une leptospirose (Gonsalez 1998). Dans les régions où coexistent le paludisme et la leptospirose, l'administration quotidienne de doxycycline (100 mg/j) en prévention du paludisme pourrait aussi avoir un effet préventif contre la leptospirose, comme cela a été rapporté chez des participants à un raid sportif à Bornéo (Sejvar 2003). Au total, l'intérêt d'une prophylaxie semble surtout intéressant pour les voyageurs (touristes, militaires) exposés lors d'un séjour de courte durée dans les situations à haut risque (Brett-Major 2009). Dans les suites d'inondations exceptionnelles survenues en 2005 au Guyana, une épidémie de leptospirose a conduit les autorités à mettre en place une campagne de prophylaxie par doxycycline pour plus de 280 000 personnes sur une période de 3 semaines, sans que l'on puisse évaluer l'impact réel de cette campagne (Dechet 2012). Le même type de prophylaxie post exposition (200mg dose unique) a été administré avec une réduction du risque de leptospirose chez des victimes d'une inondation en Thaïlande (Chusri 2014).

## 2. OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs problématiques de santé publique émergent de la pratique clinique: quels sont les facteurs de risques de leptospirose, quels sont les facteurs pronostiques de la maladie, et quelle est l'incidence réelle de la leptospirose aux Antilles. Dans ce travail de thèse nous nous sommes focalisés sur l'épidémiologie de la leptospirose en Martinique et, en utilisant le diagnostic par biologie moléculaire, nous cherchons à répondre à plusieurs questions :

- Quelle est la place des tests diagnostiques comme la PCR en temps réel dans une enquête épidémiologique autour de cas groupés de leptospirose ?
- Quels facteurs de risque peuvent-ils être identifiés et quelles recommandations de prévention peuvent être données dans ce contexte ?
- Quels sont les facteurs cliniques et biologiques associés à la sévérité de la maladie ?
- Quelle sont les tests diagnostiques nécessaires au suivi de l'incidence de la maladie ?

Les objectifs de ce travail sont d'approfondir les connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la leptospirose aux Antilles grâce à l'apport du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, de ses facteurs pronostiques et de son incidence.

## 3. RESULTATS

### 3.1. *Article 1 - Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique*

Patrick Hochedez, Jacques Rosine, Rafaelle Théodose, Sylvie Abel, Pascale Bourhy, Mathieu Picardeau, Philippe Quénel, and André Cabié. *Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 84(4), 2011, pp. 621–626.

Dans les jours suivant une compétition de course d'endurance en plein air (trail) organisée en Martinique après une période de forte pluviosité, plusieurs cas de leptospirose ont été diagnostiqués chez les participants. L'objectif de cet article était de rapporter les résultats des investigations épidémiologiques réalisées dans les semaines suivant la course, de discuter les éventuels facteurs de risques et de faire des recommandations de santé publique.

Parmi les 230 athlètes participants, nous avons réussi à en contacter 148 (64%) et 20 (13.5%) ont été classés en cas suspects, dont cinq ont été hospitalisés. Le diagnostic de leptospirose a été confirmé biologiquement, par PCR ou sérologie, chez 10 des 11 athlètes prélevés et le sérotype Pyrogenes était le plus fréquemment identifié. Le seul facteur de risque identifié lors de l'analyse univariée était la présence d'abrasions cutanées, rapportées chez 14 (73.7%) des cas suspects.

**Cet article rapporte pour la première fois la survenue de cas de leptospirose après un événement sportif aux Antilles et souligne l'intérêt des tests diagnostiques comme la PCR en temps réel pour confirmer précocement le diagnostic et formuler des recommandations de santé publique. Depuis l'investigation menée pour ces cas groupés, les participants à ces compétitions en plein air sont informés régulièrement du risque spécifique de leptospirose et des moyens de prévention, spécialement lors des périodes de pluies inhabituelles ou d'inondations.**

Contribution personnelle à ce travail : Mise en place de l'enquête épidémiologique, analyse des résultats et écriture de l'article en collaboration avec les co-auteurs.

## Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique

Patrick Hochedez,\* Jacques Rosine, Rafaëlle Théodose, Sylvie Abel, Pascale Bourhy,  
Mathieu Picardeau, Philippe Quénel, and André Cabié

Department of Infectious and Tropical Disease and Department of Bacteriology, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France,  
Fort de France, Martinique, France; Cellule de l'Institut de Veille Sanitaire en Région, Fort de France, Martinique, France;  
Pasteur Institute, Paris, France; Clinical Research Center of French West Indies and French Guiana,  
INSERM CIE 802/Université Antilles-Guyane JE 2503, CHU de Fort de France, Martinique, France

**Abstract.** Three athletes who participated in a race in the tropical forest of the Caribbean island of Martinique were subsequently diagnosed with leptospirosis using polymerase chain reaction (PCR). We investigated an outbreak to evaluate possible risk factors, and to determine the appropriate public health recommendations. Of 230 athletes, we contacted 148 (64%) and 20 (13.5%) met our case definition. Five were hospitalized and none were fatal. Ten (91%) of the 11 ill athletes who were tested were confirmed by PCR or serology. Serogroup Pyrogenes was commonly found. Cutaneous cuts, reported by 14 (73.7%), was the only potential risk factor using univariate analysis. Sporting event participants in tropical areas should be made aware of specific warnings and recommendations concerning the risk of leptospirosis, especially after periods of heavy rainfall or flooding. Rapid diagnostic assays such as PCR are particularly appropriate in this setting for early diagnosis and for formulating public health recommendations.

### INTRODUCTION

Leptospirosis, a bacterial zoonotic disease with worldwide prevalence, is an important emerging infectious disease with greater incidence in tropical areas where conditions for transmissions are favorable.<sup>1,2</sup> Many wild and domestic animals serve as reservoirs for pathogenic *Leptospira* strains and contaminate the environment by shedding the organisms in their urine. Humans are usually infected through abraded skin or mucous membrane contact with water contaminated by the urine of animal reservoirs, and less frequently by direct contact with animals or their urine. The mean incubation period is 10 days, with a usual range of 2–20 days.<sup>1</sup> Clinical manifestations are protean and the spectrum of symptoms range from subclinical or mild anicteric febrile illness to acute renal failure. Weil's disease and respiratory distress syndrome are associated with high mortality.<sup>1</sup> Over the preceding decades, ecotourism and sporting events in tropical and sub-tropical areas have become more popular among travelers and athletes. These recreational activities in tropical areas have served to increase the risk of human exposure to these pathogens and consequently outbreaks of leptospirosis have been reported in these settings.<sup>3,4</sup>

For the period of June 1 to June 4, 2009, three adults were hospitalized in the teaching hospital of Fort de France, Martinique for febrile illnesses characterized by headache, myalgias, elevated liver enzyme levels, and leucocytosis associated with thrombocytopenia and; additionally, acute renal failure for one of the three. A diagnosis of leptospirosis was confirmed by specific amplification of pathogenic *Leptospira* spp. in blood samples from three patients. Those patients had participated in the "Tchimbe-Raid" race, held on the island of Martinique on May 16, 2009. The 230 participating athletes were from the two Caribbean islands of Martinique and Guadeloupe, as well as French Guyana and mainland France. Participants had the option to race in either an 80-km or an 30-km course (held on the second part of the 80-km route).

This race was previously planned to be held on May 9, 2009 but was postponed because of heavy rainfall and flooding that occurred on May 4 and 5. The event was an endurance-length race involving two components: running and trekking. The majority of the racing event took place in the tropical forest and included crossing shallow rivers and using muddy trails. During the race, food and mineral water were regularly given to participants by the race organizers. After the identification of the three first cases, an advisory was issued to inform all participants about the risk of leptospirosis. An investigation was subsequently initiated to assess the number of ill athletes, to identify the risk factors, and to make the relevant public health recommendations. This work reports on the results of this investigation and discusses preventative measures for sporting participants in tropical environments.

### METHODS

**Epidemiologic investigation.** Pursuant to the identification of the first three ill athletes the Regional Branch of the French Public Health Institute was informed on June 5 (20 days after the event) by the Infectious Disease unit and an investigation was initiated. The list of all participants in the event, including their telephone numbers and e-mail addresses, was obtained from the race organizers. An information letter was sent to all participants, in which they were informed of their potential exposure to leptospirosis during the race. Participants were advised to seek medical attention in the occurrence of fever associated with two or more of the following symptoms: chills, headache, muscles aches, joint aches, conjunctivitis, cough, diarrhea, or hemorrhaging. Accompanying the information letter that was sent to participants was a standardized questionnaire designed to determine the demographics, the symptoms, the duration of the illness, any previous antibiotic use, and any potential exposure during the period of 2 weeks before the race up to and during the competition. Information about patients' ethnicity was not reported because of the current strict medical ethics laws in France. With respect to any possible exposure, participants were queried regarding any muco-cutaneous exposure, river crossings, the swallowing of any river water, and consumption of coconut water that was distributed after the race. Participants who did not return their

\*Address correspondence to Patrick Hochedez, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, BP 632, 97261 Fort de France, Martinique, France. E-mail: patrick.hochedez@chu-fortdefrance.fr

questionnaires were contacted by telephone. A "suspected case" of illness was defined as the onset of self-reported fever between May 16 and June 30 along with two or more of the above mentioned symptoms in a Tchimbe-Raid athlete.

**Laboratory investigation.** Samples were obtained from patients who met the suspected case definition and who underwent medical consultation. Samples were subsequently tested for microscopic agglutination using the microscopic agglutination test (MAT).<sup>5</sup> The MAT was done using the following antigens: serogroups Australis (serovar Australis), Autumnalis (serovar Autumnalis), Bataviae (serovar Bataviae), Canicola (serovar Canicola), Ballum (serovar Castellonis), Cynopteri (serovar Cynopteri), Grippotyphosa (serovar Grippotyphosa), Sejroe (serovars Hardjo and Sejroe), Hebdomadis (serovar Hebdomadis), Icterohaemorrhagiae (serovar Copenhageni), Panama (serovar Panama), Pomona (serovar Pomona), Pyrogenes (serovar Pyrogenes), and Tarassovi (serovar Tarassovi). Sera were screened at a dilution of 1:50 and positive sera were titrated to endpoint using standard methods.<sup>5</sup> Blood samples (EDTA plasma) obtained from patients during the first week of symptoms were also tested by a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. After initial concentration of bacteria, DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCRs were performed on an iQTM5 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, France) using the DNA-binding dye technique (SYBR Green). The primer set LFB1-F (5' CATTTCATGTTTCGAATCATTTCAAA 3') and LFB1-R (5' GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG 3') used target DNA from pathogenic leptospire and amplify a 331-bp fragment.<sup>6</sup> Diagnosis by culture, although it is a definitive diagnosis test allowing the recovery of leptospire from clinical specimen, is also challenging and requires several weeks of incubation to obtain results. Considering the low sensitivity of culture in our laboratory during the time the study took place, there was no attempt to culture leptospire and the PCR test was chosen instead. A suspected case was considered "laboratory-confirmed" if it tested positive with MAT or PCR. For the interpretation of MAT results, a titer superior to 100 against any of the pathogenic antigens was considered positive if a patient's origin was from a non-endemic area. For patients living in an endemic area, like the Caribbean region, a titer of 400 was preferred considering the eventuality of past exposure.

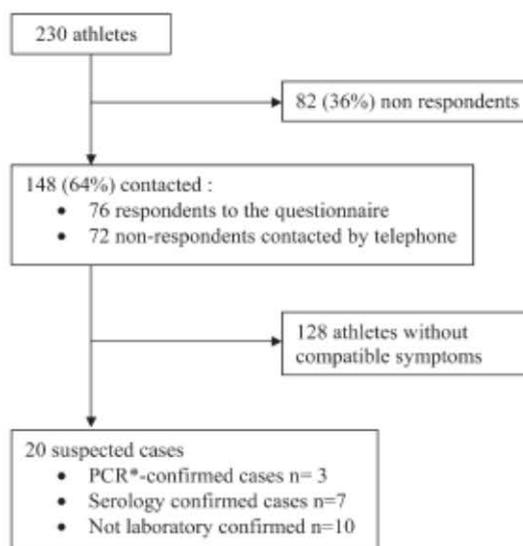
**Statistical analysis.** Results of the investigation were entered into EpiInfo version 6.04b (CDC, Atlanta, GA); the dataset was then imported into Stata 9 (College Station, TX) for further analysis. Univariate logistic regression was used to explore if variables were related to confirmed or suspected cases of leptospirosis. The risk ratio (RR) for dichotomous variables was calculated. Suspected cases were compared with and without laboratory confirmation, with controls from the cohort of participants to identify risk factors for illness. A single factor has been identified with a *P* value < 0.05 by univariate analysis; it was therefore not possible to conduct a multivariable logistic regression.

## RESULTS

**Epidemiologic investigation.** Of the 230 athletes competing in the Tchimbe-Raid race, 76 sent back a questionnaire and 72 were subsequently contacted by telephone. Of the 148 (64%)

participants contacted, 20 (13.5%) athletes met the definition of a suspected case, so the attack rate was at least 8.7% (Figure 1). The median age of patients with a suspected case, with or without laboratory confirmation, was 41 years [28–69] and 18 (90%) were male. All cases were French and residents of the island of Martinique. The following data are related to 19 of the ill athletes. One participant was excluded from the analysis because of insufficient clinical data. No significant differences were found between ill athletes who met the suspected case definition and non-ill athletes by age or gender. Among the 19 athletes, 9 (47.4%) had participated in the 30-km course and 10 (52.6%) in the 80-km course. Nine (47.4%) athletes reported travel to other Caribbean islands during the 3 months before the race but none reported training in the forest or any river exposure activity during the previous 15 days. Of the 148 participants contacted, none reported taking doxycycline for prophylaxis of leptospirosis. The median incubation time from the start of the race until onset of illness for the 10 athletes with confirmed cases (13 days; range, 7–16) differed significantly from the median incubation period (9 days; range, 1–13) for the suspected cases without laboratory confirmation (*P* = 0.03). The peak onset of fever on May 26, 2009 corresponded to Day 10 after the race (Figure 2). No cases were detected after June 1 (Day 16). Sixteen of 20 (80%) suspected cases sought medical care, and five (25%) were hospitalized. One hospitalized patient presented with an icteric form characterized by hepatic and renal dysfunction. No other severe manifestations of leptospirosis or death were reported. The median duration of illness was 5 days [3–10]. The most common symptoms associated with fever were asthenia, headache, muscle aches, chills, joint aches, and diarrhea (Table 1).

During the race, cuts and abrasions of the skin were reported by 14 (73.7%) of 19 ill-athletes. Among the 9 who described those cutaneous lesions, 5 had cuts on the legs, 1 had cuts on



\*PCR : Polymerase Chain Reaction

FIGURE 1. Flow diagram.

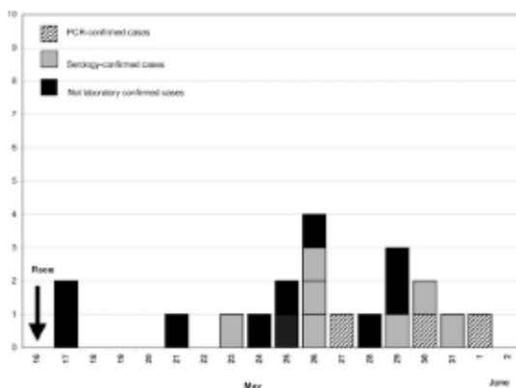


FIGURE 2. Date of fever onset for suspected and laboratory-confirmed cases of leptospirosis in Tchimbe-Raid athletes.

the hand, and 3 had lesions at both sites. All reported to have crossed more than 15 shallow rivers without being submerged and 2 of them drank water from those rivers. Six athletes reported the consumption of coconut water that was available at the arrival. Of those potential risk factors, only cutaneous cuts were associated with the outcome of leptospirosis using univariate analysis (RR, 3.2; 95% confidence interval [CI] = 1.1–8.4). Age, sex, consumption of coconut water, swallowing the river water, participating in the 80-km event, and duration of the race were not associated with illness.

**Laboratory investigation.** Of the 20 athletes who met the suspected case definition, serum was collected from 11 (55%) and 8 submitted both acute and convalescent-phase serum specimens. Ten (91%) of the 11 athletes with suspected cases who were tested had their cases confirmed by at least one of the following techniques: 7 were tested positive by MAT, 2 were tested positive by PCR and MAT, and 1 was tested positive by PCR only (Figure 2). For one inhabitant of Martinique, the MAT titer was of 1:200, suggesting an early phase of the disease or previous environmental exposure and the case was considered not laboratory confirmed in the absence of a second sample. Among the 19 athletes with complete information, no significant differences were found between biologically confirmed ill athletes and non-biologically confirmed ill athletes by age, gender, potential exposure, or clinical symptoms.

TABLE 1  
Self-reported clinical symptoms in 19 suspected cases\* of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique

Symptom (number of respondents if not 19)	Number of athletes (%)
Fever	19 (100)
Asthenia	17 (89)
Headache	16 (84)
Muscle aches	15 (79)
Chills	14 (74)
Joint aches	12 (63)
Diarrhea (15)	9 (60)
Nausea (14)	6 (40)
Vomiting (15)	5 (33)
Abdominal pain (15)	5 (33)
Cough	6 (31)
Red eyes	2 (10.5)

\* Race participants with onset of fever during the period from May 16 through June 30, 2009 plus the presence of two or more of the following symptoms or signs: chills, headache, muscle aches, joint aches, conjunctivitis, cough, diarrhea, and hemorrhage.

Because there was no attempt to culture leptospires during the study period, we were not able to identify the infecting serovar. Instead, we used high rates of agglutination of the serum with one particular antigen by MAT to identify the presumptive serogroup.<sup>5</sup> A significant seroreactivity was found for reference serogroups Pyrogenes (4 patients), Sejroe (1 patient), Tarassovi (1 patient), and Icterohaemorrhagiae (1 patient). Finally for 1 patient, the MAT titers from two samples could not differentiate between serogroup Sejroe (serovar Hardjo) and serogroup Icterohaemorrhagiae.

The main results of this study are reported in Table 2, together with epidemiological and laboratory data reported in the three other published outbreaks of leptospirosis among participants in endurance sporting events.<sup>4,7,8</sup>

DISCUSSION

This outbreak was the first reported after a sporting event in the Caribbean islands and the ensuing investigation allowed identification of cutaneous cuts as a risk factor for infection. Data from this outbreak also suggest that rapid diagnostic assays such as PCR are particularly appropriate in this setting for early diagnosis, information of exposed participants, and epidemiological investigation.

Leptospirosis was biologically confirmed for 10 (50%) of the 20 suspected cases. Although median incubation time for the suspected cases with or without laboratory confirmation was different, the absence of any clinical difference between biologically confirmed ill athletes and non-biologically confirmed ill athletes, combined with the low incidence of dengue during this period and the absence of any other reported arbovirus or malaria in Martinique, speak in favor of the diagnosis of leptospirosis.<sup>9</sup> Real-time PCR-based diagnosis allowed early diagnosis for three of the participants and consequently early epidemiological investigation. However, for those three participants symptoms occurred late after the event (Figure 2), and at the time of investigation, no new patients were identified that could have been informed by public health recommendations before the occurrence of symptoms. At the present time, direct detection methods using PCR are the only evaluated techniques by which a positive diagnosis might be rapidly available during the early acute stage of the illness, before the appearance of immunoglobulin M (IgM) antibodies or culture results, and before occurrence of complications when treatment is likely to have the greatest benefit.<sup>1,10–12</sup> Although only suggested by this study, the precocity of diagnosis has potential benefits for both the individual and the community in cases of a group exposure like a sporting event. Although PCR has been used to distinguish pathogenic from non-pathogenic serovars, definitive identification of the infecting serovar, which has significant epidemiological and public health value, still relies on culture rather than the microscopic agglutination test (MAT).<sup>1,13,14</sup> Studies in Barbados and Thailand emphasized that the accuracy of the MAT in predicting the infecting serovar was poor in individual cases of leptospirosis.<sup>15,16</sup> Paradoxical reactions and cross-reactions between serogroups may explain the difficulty to infer the identity of the infecting leptospiral serovar or serogroup. However, presumptive serogroup reactivity data could be used to gain a broad idea of the serogroups present at the population level.<sup>15</sup> Although it remains the gold standard for the serological diagnosis of leptospirosis, early diagnosis is not possible with MAT because

TABLE 2  
Comparative epidemiological data from the four reported outbreaks of leptospirosis among participants to endurance sport events

Location (ref)	Springfield, Illinois <sup>1</sup>	Malaysian Borneo <sup>2</sup>	Florida <sup>3</sup>	Martinique (PS)
Date of the event	June 21, 1998	August 21–September 1, 2000	November 4–5, 2005	May 16, 2009
Race characteristics	Triathlon	Multisport race: jungle trekking, swimming and kayaking, spelunking, climbing, and mountain biking	Multisport race: paddling, cycling, trekking, and orienteering	Endurance-length jungle race
Number of participants	876	304	200	230
Contacted	834 (95%)	189 (62%)	192 (96%)	148 (64%)
Suspected cases	98 (12%)	80 (42%)	44 (23%)	20 (13.5%)
Laboratory-confirmed cases (% of cases tested)	52 (61%)	26 (68%)	14 (45%)	10 (91%)
Median age of suspected cases (years)	35	34 (range, 21–50)	37 (range, 19–66)	41 (range, 28–69)
Men	82% (of suspected cases)	74% (of contacted cohort)	66.7% (of all racers)	90% (of suspected cases)
Median incubation time (days)				
Suspected cases	14 (range, 1–34)	15 (range, 1–24)	12.8, (range, 2–32)*	9 (range, 1–13)*
Laboratory-confirmed cases	15 (range, 6–29)	NA	13.5 (range, 2–22)	13 (range, 7–16)
Number of hospitalizations (% of suspected cases)	21 (40% of Laboratory-confirmed cases)	29 (36%)	3 (7%)	5 (25%)
Fatality	0	0	0	0
Risk factors associated with illness	Swallowed lake water more than once (MA)	Swimming in the Segama river (MA)	Swallowing river or creek water Eating wet food (MA)	Cuts on the skin (UA)
Doxycycline prophylaxis	0	20 (11%)	0	0
Commonly identified <i>Leptospira</i> serogroups	Grippityphosa, Bratislava, Djasiman (serovars)	Australis	Australis	Pyrogenes
<i>Leptospira</i> organisms isolated	<i>L. Kirschneri</i> from 1 athlete (PCR amplification of target DNA)	<i>L. weilii</i> from 1 athlete ( <i>rrs</i> and <i>secY</i> gene sequences)	Member of species <i>L. noguchii</i> (potential new serovar)	0
Isolation of pathogenic <i>Leptospira</i> species from environmental samples	0 (lake water)	ND	0 (water samples, soil samples)	ND
Precipitation before the race (type of climatic event)	Heavy rains	Heavy rains	Hurricane Wilma	Heavy rains

PS – present study; MA – multivariable analysis; UA – univariable analysis; NA – not available; PCR – polymerase chain reaction; ND – not done.  
\* Patients with suspected cases without laboratory confirmation.

it relies on the detection of antibodies against leptospiral antigens, which do not become detectable until 1 week after the onset of symptoms. Over the last 2 years (2008–2009), MAT on serum samples (data from the National Reference Center of *Leptospira*, France) have shown that the most prevalent *Leptospira* serogroups in Martinique have been Icterohaemorrhagiae (34%), Sejroe (16%), Canicola (14%), and Pyrogenes (12%). In the current study the identification of several serogroups by MAT could be related to cross-reactions between serogroups or could be related to the multiple potential environmental sources of infection reported by the athletes (several rivers, muddy trails), along with the diversity of potential wild and domestic animal reservoirs in tropical areas.<sup>2</sup> The potential enzootic sources of leptospirosis in the area where the race took place include numerous mammalian species including rodents, opossums, pigs, cattle, and dogs. Although participants were not specifically interrogated concerning animal species found along the race, some participants reported having seen pigs.

The first limitation of this study is the insufficient number of respondents (64%), which did not allow correctly estimating the attack rate. Other limitations of the study were the absence of *Leptospira* isolation in cultures and the lack of environmental investigation. Neither river or soil sampling, nor domestic or wild animal testing was performed. Following an outbreak

of leptospirosis among triathlon participants in Illinois, a wide environmental investigation was performed, comprising sampling lake water and various domestic and wild animal testing.<sup>7</sup> Nevertheless, despite epidemiologic evidence of widespread leptospiral contamination of the lake, the study did not identify any animal reservoir with the epidemic strain (Table 2). Moreover, the authors eventually raised concerns about the interpretation of both negative and positive samples when screening large bodies of water, concluding that such testing should not guide public health authorities. After another outbreak of leptospirosis among participants at an adventure race in Florida, environmental investigation again failed to isolate any *Leptospira* species despite numerous samples.<sup>8</sup>

The amount of rainfall in Martinique in May 2009 was nearly three times higher than that observed over the past 60 years for this specific month. On a site located at the end of the race, 114 mm of rain fell between 04 and 05 May 2009, this being 4 to 5 times more than the average values observed for the same period during the previous 3 years.<sup>17</sup> Outbreaks of leptospirosis are typically associated with heavy rainfall and periods of flooding. The largest outbreak of leptospirosis reported in the United States occurred among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, after heavy rains.<sup>7</sup> Heavy rainfall was also reported before the two massive outbreaks of leptospirosis, which involved participants in

multisport races in Malaysian Borneo and Florida.<sup>4,8</sup> Furthermore, in the Caribbean and Latin America, epidemics of leptospirosis have been reported after periods of flooding, heavy rainfall, and hurricanes.<sup>3,18–20</sup> Considering the higher risk of leptospirosis in tropical countries, especially after heavy rainfall or periods of flooding, travelers and participants to outdoor events with inevitable exposure to potentially contaminated water or soil should be informed as to personal prevention measures and chemoprophylaxis.<sup>21</sup> As illustrated by the triathlon in Illinois, the multisport races in Malaysian Borneo and Florida, this current study in Martinique, and several other outbreaks of leptospirosis associated with water; the first steps of prevention in athletes should be to avoid swimming in rivers, swallowing lake or river water, and prevent dermal cuts.<sup>3,4,7,8,22,23</sup> In addition, several studies suggest that doxycycline could be used either as chemoprophylaxis or as post-exposure prophylaxis and post-exposure empirical treatment.<sup>21,24–27</sup> Both a study of U.S. Army soldiers who participated in a 3-week training exercise in the jungles of Panama and another study in residents of a rural area of the Andaman Islands found preventive efficacy of doxycycline, administered 200 mg once weekly.<sup>24,25</sup> Administration of doxycycline, 100 mg daily, represent an alternative chemoprophylaxis, in areas where malaria and leptospirosis are endemic, as suggested by the preventive efficacy of such treatment during the race in Borneo.<sup>4</sup> The Caribbean islands of Martinique and Guadeloupe are not an endemic area for malaria and none of the participants in our study reported taking such chemoprophylaxis. The use of post-exposure chemoprophylaxis has been studied in Brazil for rural residents with high-risk exposure to pathogenic leptospires and should be evaluated for asymptomatic athletes after the identification of cases of leptospirosis.<sup>26,28</sup> In following, this study would not recommend empiric self-treatment of febrile travelers and rather advise them to seek medical attention as a first course, considering the broad spectrum of tropical diseases causing acute febrile illness, such as malaria and arbovirus.<sup>29</sup>

Sporting events and ecotourism in tropical areas are increasing and travelers are exposed to a wide range of pathogens, some of them exclusively tropical but also pathogens of worldwide distribution such as leptospirosis, whose incidence is even higher following periods of heavy rainfall and flooding. Such travelers should be made aware of specific warnings and recommendations concerning the recognized route of transmission of these bacteria, and information regarding chemoprophylaxis should be disseminated when the risk of transmission is high and unavoidable.

Received September 8, 2010. Accepted for publication January 10, 2011.

**Acknowledgments:** We thank Marie Barrau and Claudine Suiwant for their contribution in the gathering of data. We also thank Ric Yetman for editorial assistance.

**Authors' addresses:** Patrick Hochedez and Sylvie Abel, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, Fort de France, Martinique, France, E-mails: patrick.hochedez@chu-fortdefrance.fr and sylvie.abel@chu-fortdefrance.fr. Jacques Rosine and Philippe Quénel, Cellule de l'Institut de Veille Sanitaire en Région, Fort-de-France, Martinique, France, E-mails: Jacques.ROSINE@ars.sante.fr and Philippe.QUENEL@ars.sante.fr. Rafaëlle Théodose, Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, Fort de France, Martinique, France, E-mail: rafaëlle.theodose@chu-fortdefrance.fr. Pascale Bourby and Mathieu Picardeau, Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, Paris,

France, E-mails: pbourby@pasteur.fr and mpicard@pasteur.fr. André Cabié, Clinical Research Center of French West Indies and French Guiana, INSERM CIE 802/Université Antilles-Guyane JE 2503, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, Fort de France, Martinique, France, E-mail: andre.cabie@chu-fortdefrance.fr.

## REFERENCES

- Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM, 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3: 757–771.
- From the Centers for Disease Control and Prevention, 1997. Outbreak of leptospirosis among white-water rafters—Costa Rica, 1996. *JAMA* 278: 808–809.
- Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Rosenstein N, 2003. Leptospirosis in “Eco-Challenge” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 9: 702–707.
- Postic D, Merien F, Perolat P, Baranton G, 2000. *Diagnostic Biologique Leptospire-Borreliose de Lyme*. Paris, France: Institut Pasteur.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G, 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139–147.
- Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW, 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593–1599.
- Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, Wofford T, Wilkins PP, Ari MD, Harris L, Clark TA, 2005. Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida. *Clin Infect Dis* 50: 843–849.
- CIRE, 2009. Antilles Guyane. Surveillance épidémiologique mensuelle de la dengue: Mai 2009. Available at: [http://www.invs.sante.fr/surveillance/dengue/points\\_martinique/2009/PEM\\_Martinique\\_2009-05\\_Dengue.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/dengue/points_martinique/2009/PEM_Martinique_2009-05_Dengue.pdf). Accessed June 8, 2009.
- Merien F, Baranton G, Perolat P, 1995. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 172: 281–285.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CG, Terpstra WJ, Levett PN, 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 43: 110–114.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer IW, 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54: 45–49.
- Murgía R, Riquelme N, Baranton G, Cinco M, 1997. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospires occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* 148: 27–34.
- Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK, 1997. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 150: 9–18.
- Levett PN, 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36: 447–452.
- Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwatanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP, Peacock SJ, 2009. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 81: 695–697.
- Meteo France Annual Climatic Bulletin, 2009. Available at: [http://www.meteo.fr/temps/domtom/antilles/pack\\_public/alaune/bca\\_2009\\_martinique.pdf](http://www.meteo.fr/temps/domtom/antilles/pack_public/alaune/bca_2009_martinique.pdf). Accessed January 25, 2010.
- Trejevo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquin-Gonzalez C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg

- SL, Perkins BA, Spiegel RA, 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis* 178: 1457-1463.
19. Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, Spiegel RA, Weyant RS, Bragg SL, 1999. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg* 61: 399-404.
  20. Storck CH, Postic D, Lamaury I, Perez JM, 2008. Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003-2004, a two El Niño Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect* 136: 1407-1415.
  21. Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar JJ, Ashford DA, 2002. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis* 34: e40-e43.
  22. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Maffei C, Di Stanislao F, Strusi P, Calegari L, Lupidi R, Scalise G, Cagnoni G, Renga G, 1987. A waterborne outbreak of leptospirosis. *Am J Epidemiol* 126: 535-545.
  23. Corwin A, Ryan A, Bloys W, Thomas R, Deniega B, Watts D, 1990. A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. *Int J Epidemiol* 19: 743-748.
  24. Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, McNeill KM, Timboe HL, Kane RE, Sanchez JL, 1984. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med* 310: 497-500.
  25. Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P, 2000. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents* 13: 249-255.
  26. Gonzalez CR, Casseb J, Monteiro FG, Paula-Neto JB, Fernandez RB, Silva MV, Camargo ED, Mairinque JM, Tavares LC, 1998. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40: 59-61.
  27. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL, 1984. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med* 100: 696-698.
  28. CDC, 2001. Update: outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000-Borneo, Malaysia, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50: 21-24.
  29. Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, von Sonnenburg F, Keystone JS, Pandey P, Cetron MS, 2006. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med* 354: 119-130.

### **3.2. Article 2 - Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011**

Patrick Hochedez, Martina Escher, Hervé Decoussy, Ludovic Pasgrimaud, Roland Martinez, Jacques Rosine, Rafaëlle Théodose, Pascale Bourhy, Mathieu Picardeau, Claude Olive, Martine Ledrans, André Cabié. *Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011*. Euro Surveill. 2013;18(18): 20472.

Une dizaine de jours après avoir participé à des activités de canyoning, un diagnostic de leptospirose était confirmé par PCR chez 2 participants parmi un groupe de 45 gendarmes. L'objectif de cet article était de rapporter les résultats des investigations épidémiologiques, de discuter les éventuels facteurs de risque et de faire des recommandations de prévention. Tous les participants ont été informés de leur probable exposition à la leptospirose et de la nécessité de consulter rapidement en cas de fièvre. Parmi les 41 répondants au questionnaire qui leur avait été adressé, 8 d'entre eux ont rapportés des symptômes compatibles et ont été traités par antibiotiques durant la première semaine des symptômes. Le diagnostic a été confirmé chez 7 patients par PCR et la même extraction d'ADN a permis secondairement l'identification de 3 espèces génomiques différentes. Compte tenu du faible effectif, aucun des potentiels facteurs de risque étudiés n'a été confirmé.

**Cet article rapporte pour la première fois la survenue de cas groupés de leptospirose parmi des participants à une activité de canyoning aux Antilles. Ce travail met de nouveau en avant l'intérêt d'une confirmation diagnostique précoce pour informer rapidement l'ensemble des personnes exposées au risque de leptospirose, et débiter le traitement antibiotique précocement, quand il a le plus de chance d'être efficace. Dans les suites de cet évènement, l'ensemble des clubs de canyoning de la Martinique ont été informés du risque spécifique de leptospirose et des moyens de prévention.**

Contribution personnelle à ce travail : Mise en place de l'enquête épidémiologique, analyse des résultats et écriture de l'article en collaboration avec les co-auteurs.

## Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011

P Hochedez (patrick.hochedez@chu-fortdefrance.fr)<sup>1</sup>, M Escher<sup>2,3</sup>, H Decoussy<sup>4</sup>, L Pasgrimaud<sup>5</sup>, R Martinez<sup>2</sup>, J Rosine<sup>2</sup>, R Théodose<sup>6</sup>, P Bourhy<sup>7</sup>, M Picardeau<sup>7</sup>, C Olive<sup>6</sup>, M Ledrans<sup>2</sup>, A Cablé<sup>4,8</sup>

1. Infectious and Tropical Diseases Unit, Fort-de-France University Hospital, Martinique, France
2. Regional Office of the French Institute for Public Health Surveillance, Fort-de-France, Martinique, France
3. European Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET), Stockholm, Sweden
4. French Armed Forces in the French West Indies, Fort-de-France, Martinique, France
5. Department of Medicine, Trinité Hospital, Trinité, Martinique, France
6. Laboratory for Microbiology, Fort-de-France University Hospital, Martinique, France
7. National Reference Center and the WHO Collaborating Center for Leptospirosis, Institut Pasteur, Paris, France
8. INSERM CIE 802/Antilles-Guyane University EA 4537, Martinique, France

### Citation style for this article:

Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cablé A. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(18):pii=20472. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20472>

Article submitted on 27 July 2012 / published on 2 May 2013

Two gendarmes who participated in canyoning activities on 27 June 2011 on the Caribbean island of Martinique were diagnosed with leptospirosis using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), 9 and 12 days after the event. Among the 45 participants who were contacted, 41 returned a completed questionnaire, of whom eight met the outbreak case definition. The eight cases sought medical attention and were given antibiotics within the first week after fever onset. No severe manifestations of leptospirosis were reported. In seven of the eight cases, the infection was confirmed by qPCR. Three pathogenic *Leptospira* species, including *L. kmetyl*, were identified in four of the cases. None of the evaluated risk factors were statistically associated with having developed leptospirosis. Rapid diagnostic assays, such as qPCR, are particularly appropriate in this setting – sporting events with prolonged fresh-water exposure – for early diagnosis and to help formulate public health recommendations. Participants in such events should be made specifically aware of the risk of leptospirosis, particularly during periods of heavy rainfall and flooding.

### Introduction

Over the past few decades, sporting events in tropical areas have become increasingly popular among travellers and athletes. At the same time, leptospirosis outbreaks following exposure to leptospires during recreational water activities, such as swimming, canoeing, kayaking or rafting, have been increasingly reported [1-5]. In Martinique – a Caribbean island and French overseas department and region with a tropical climate – we previously reported a leptospirosis outbreak among participants in a race that took place in the tropical forest after unusually heavy seasonal rainfalls [6].

Leptospirosis is a bacterial zoonosis, distributed worldwide, whose incidence is higher in the tropics, where transmission conditions are favourable. Many wild and domestic animals serve as reservoirs for pathogenic *Leptospira* strains. Humans are usually infected through abraded skin or mucous membranes in contact with water or soil contaminated by the urine of animal *Leptospira* reservoirs and, less frequently, by direct contact with infected animals or their urine. Heavy rainfall and flooding strongly increase human exposure to leptospires-contaminated water [7-9]. After a mean incubation period of 10 days (range: 2–30), clinical manifestations are protean and the spectrum of symptoms ranges from subclinical or mild, anicteric, febrile disease to multiorgan involvement associated with high mortality [8,10]. Asymptomatic infection is common and may occur in up to 60–70% of infected individuals, as was reported for serologically identified infections during a 1995 epidemic in Nicaragua and a 1999 outbreak in Thailand [11,12].

At present, although the microscopic agglutination test (MAT) and culture are the gold standard for diagnosis, only direct detection methods using polymerase chain reaction (PCR) can provide a rapid diagnosis during the early, acute stage of the disease [6,8]. Although the potential benefit of antibiotic treatment for leptospirosis has not been fully established by randomised placebo-controlled trials, antibiotics may at least decrease the duration of illness and they are commonly used to treat laboratory-diagnosed or even clinically suspected leptospirosis, whether mild or severe [8,9,13,14].

### Outbreak detection

During 10 to 18 July 2011, six adults presented at Trinité Hospital, on the east coast of Martinique, with fever associated with chills, headache, myalgia, elevated liver-enzyme levels, leukocytosis and

thrombocytopenia. During that period, two of them were diagnosed with leptospirosis, which was confirmed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) based on the amplification of pathogenic *Leptospira* spp. in blood samples. The six patients were part of a group of 45 gendarmes, from a branch of the French Armed Forces, who had participated in a series of three canyon-rescue training exercises along the Absalon River between 27 and 30 June 2011. This river, located in the tropical forest, is very popular for canyoning activities.

Military medical officers notified the regional office of the French Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS) of these cases on 19 July. Immediately, an investigation was initiated in cooperation with the Department of Infectious Diseases of Fort-de-France Hospital, with the aim of: (i) informing all the participants of the potential risk of leptospirosis and the need to seek medical care if ill; (ii) assessing the magnitude of the outbreak; and (iii) identifying the risk factors and protective measures to be taken in order to make relevant public health recommendations. We report on the results of this investigation and discuss recommendations for preventing leptospirosis.

## Methods

### Epidemiological investigation

A list of all participants in the training exercises was obtained from the military medical officers. By the end of July, a letter, sent to all participants, informed them of their possible exposure to leptospirosis during their recent canyoning activities. They were advised to seek medical attention should they develop a fever (temperature greater than 37.8 °C) associated with two or more of the following symptoms or signs: chills, headache, muscle aches, joint aches, conjunctivitis, cough, diarrhoea or haemorrhaging. Accompanying the letter was a standardised questionnaire designed to obtain socio-demographic information (symptoms, specific activities and behaviour during canyoning – e.g. length of stay in the canyon, skin lesions, swallowing any river water, type of protective clothing worn during canyoning), possible exposure since 1 June (e.g. exposures associated with leisure or professional activities, contact with animals, gardening and any type of fresh-water exposure) and previous antibiotic use. Moreover, the participants were asked if they had any knowledge of the risk of acquiring leptospirosis before their involvement in the activities. For those who sought medical attention, more detailed clinical information was obtained by reviewing medical records.

### Outbreak case definition

A suspected case of leptospirosis was defined as a person having participated in one of the three canyoning activities and who reported a fever during 27 June to 30 July 2011, along with two or more of the above-mentioned symptoms.

A laboratory-confirmed case of leptospirosis required at least one of the following criteria: (i) positive qPCR; (ii) culture isolation of *Leptospira*; or (iii) positive MAT.

In this report, we use the term 'cases' to include suspected and laboratory-confirmed cases.

Non-cases were asymptomatic or pauci-symptomatic participants.

### Laboratory investigation

Serum samples were obtained from participants who met the suspected case definition and who underwent a physical examination. Laboratory studies were performed by the Microbiology Unit of Fort-de-France Hospital (qPCR, culture and environmental investigation), and the National Reference Center and the WHO Collaborating Center for Leptospirosis at the Institut Pasteur, Paris, France (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), MAT and genomic characterisation of *Leptospira* spp.).

Blood samples collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes obtained from patients during their first week of symptoms were tested by qPCR. After first concentrating the bacteria, DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). Then qPCR was performed on an IQTM5 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) using the DNA-binding dye technique (SYBR Green). The primer set consisting of LFB1-F (5' CATTGATGTTTCGAATCATTTCAAA 3') and LFB1-R (5' GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG 3') used target DNA from pathogenic leptospires and amplified a 331 base pair (bp) fragment [15]. To control for DNA extraction and to detect the presence of PCR inhibitors in DNA extracts, we amplified a fragment of the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT), as an internal control. A PCR was considered as negative when we were not able to detect the target PCR product but able to detect the PCR internal-control product.

A partial sequence of the *Leptospira* *rrs* gene from positive blood samples was amplified by nested-PCR using Taq polymerase and primers A/B, then C/RS4 [16,17]. Sequencing was performed at the Genotyping of Pathogens and Public Health Platform (Institut Pasteur, Paris, France) and sequences were aligned in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to identify the species.

Blood samples were tested at the Institut Pasteur with an in-house IgM ELISA and MAT using 24 antigens. Serovars included in the MAT screening panel were based on prior knowledge of regional epidemiology (Table 1). For MAT, a titre greater than 100 against any of the pathogenic antigens was considered positive if a patient's origin was from a non-endemic area. For patients living in an endemic area, such as the

**TABLE 1**

Panel of *Leptospira* serogroups used in microscopic agglutination testing, leptospirosis outbreak among canyoning participants, Martinique, 2011

<i>Leptospira</i> species	Serogroup	Serovar	Strain
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovls	Sponselee
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Sallnem
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroë	Sejroë	M 84
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Mittis Johnson
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	ND	2008/01925
<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Pol
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945

ND: Not determined.

Caribbean, a titre of 400 was used, given possible past exposure.

*Leptospira* spp. were cultured by inoculating 1 ml of heparinised plasma into 10 ml of Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) media, which were incubated at 30 °C and observed weekly for growth for two months.

#### Environmental investigation

The Absalon River receives run-off from several houses and some family-owned livestock farms. Surface water samples collected from the river, three and seven weeks after the last training exercise were passed through 0.22 micron filters to remove potential environmental contaminants and were cultured in EMJH media for the presence of leptospires. The filters were crushed and incubated overnight in distilled water. DNA was extracted from the supernatant and qPCR were performed using the protocol described above.

Weather data, including the amount of rainfall during June 2011 in Martinique, were obtained from Météo France, the French national meteorological service.

#### Statistical analysis

Exposure information and clinical data and laboratory results, when available, were entered into EpiData version 3.1 and analysed with Stata version 9.0 software (College Station, Texas, United States). Categorical variables were expressed as numbers (%) and continuous variables as medians (range).

The relationships between case status (cases versus non-cases) and risk factors were tested in univariate analyses using Fisher's exact test and the Mann-Whitney U test. A p value <0.05 defined significance. The effect of each exposure variable was quantified by estimating the relative risk (RR) and its respective 95% confidence interval (CI).

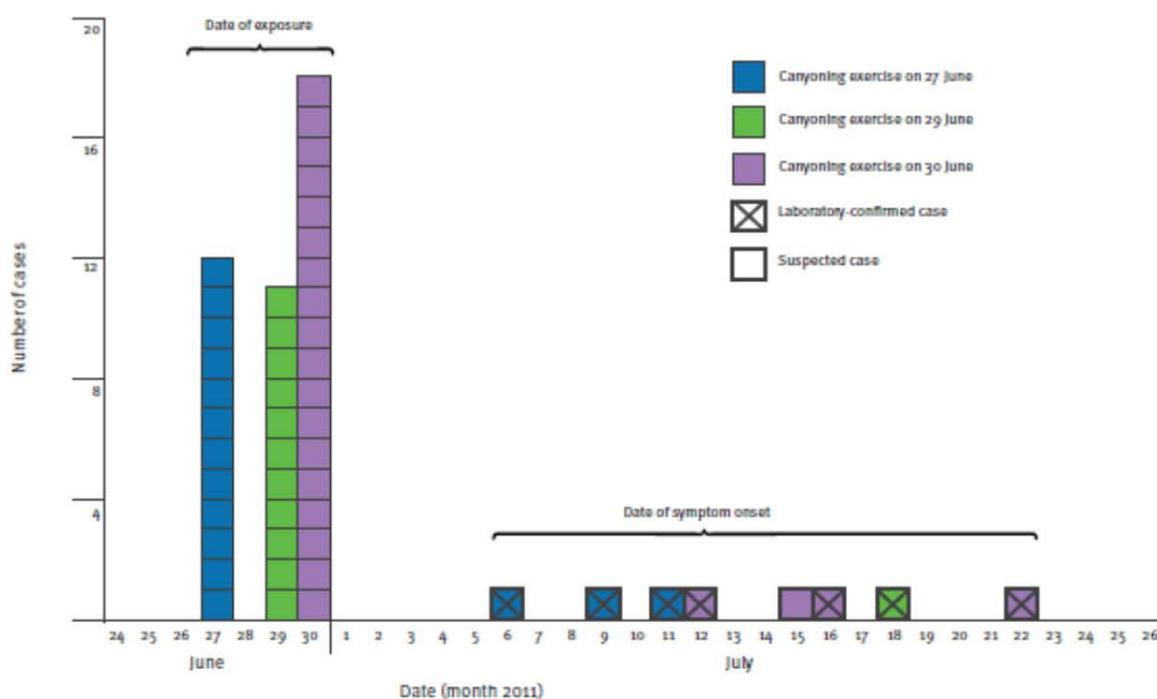
#### Results

##### Epidemiological investigation

Among 45 participants in the canyon-rescue training exercises, 41 returned a completed questionnaire. Of these, 39 were male; their median age was 33 years (range: 20–53).

## FIGURE

Training exercises<sup>a</sup> and symptom onset for cases (n=8), leptospirosis outbreak among canyoning participants, Martinique, 2011



<sup>a</sup> Information from 41 participants who completed a questionnaire.

All participants who returned a completed questionnaire were French: 30 lived in Martinique and 11 came from a metropolitan region in mainland France. The median length of time spent in Martinique, for the 26 respondents for whom the information was available, was 1.27 years (range: 0.15–6.03). Of the 45 participants, 16 had participated in the training exercises on 27 June, 11 on 29 June and 18 on 30 June 2011; four had participated in two of the exercises (on 27 and 30 June).

Among the 41 persons who returned a completed questionnaire, eight (attack rate 20%) were suspected cases; their median age was 35.5 years (range: 23–53). All eight were men; seven lived in Martinique and one in a metropolitan region in mainland France. We did not identify any participants who partly met the outbreak case definition (e.g. had fever but no other symptoms). Cases and non-cases were comparable by age, sex, place of residence and length of time spent in Martinique (data not shown).

The eight cases participated in only one of the three training exercises: three in that held on 27 June, one

in that on the 29th and four in that on the 30th (day-specific attack rates of 19% (3/16), 9% (1/11) and 22% (4/18), respectively).

Of the eight cases, fever onset was clustered from 6 to 22 July (Figure). The median incubation period, determined from each participant's specific day of canyoning activities, was 14.5 days (range: 9–22). The eight cases sought medical attention at a median of 1.5 days (range: 0–6) after symptom onset. Beta-lactam antibiotics were prescribed for all eight; two were hospitalised for three days. No severe manifestations of leptospirosis were reported. The most common symptoms reported by the eight patients were: fever (n=8), asthenia (n=7), chills (n=7), headache (n=6), muscle aches (n=6), nausea (n=4), joint pain (n=3) and conjunctival suffusion (n=1). At admission, three had elevated liver enzyme or bilirubin levels, two were thrombocytopenic, one had leukocytosis and serum creatinine was elevated in one. C-reactive protein, with a median of 79 mg/L (range: 12–237), was high in all eight patients (norm: 1–10 mg/L).

**TABLE 2**

Univariate analysis of investigated factors associated with confirmed (n=7) or suspected (n=1) cases, leptospirosis outbreak among canyoning participants, Martinique, 2011

Risk or protective factor	Number who responded to the particular question <sup>a</sup>		Number who answered yes		Relative risk (95% CI)	P value
	Cases n=8	Non-cases n=33	Cases n=8	Non-cases n=33		
Swallowed river water	4	23	3	10	3.23 (0.38–27.3)	0.326
Had skin abrasions	6	28	3	12	1.27 (0.30–5.40)	1.000
Wore neoprene suit <sup>b</sup>	8	33	0	4	–	0.569

<sup>a</sup> A total of 41 participants, including the eight cases, completed the questionnaire.

<sup>b</sup> Complete neoprene diving suits.

None of the eight cases reported any other canyoning or other potential exposure during leisure or professional activities during the month preceding the training exercises. In a univariate analysis, none of the potential risk or protective factors investigated was significantly associated with leptospirosis (Table 2). Finally, only 15 of the 33 respondents who answered the particular question declared having some knowledge of leptospirosis before the canyoning exercises.

### Laboratory investigation

Serum samples were obtained from the eight participants who met the suspected case definition, with a median of two days (range: 0–6) after symptom onset. Acute- and convalescent-phase serum specimens were obtained from only two patients (Cases 4 and 7).

*Leptospira* infection was confirmed by qPCR in seven of the eight cases (Table 3). ELISA was also positive for three cases (Cases 1, 2 and 7). The acute-phase serum specimen from Case 6 had a negative ELISA and MAT.

*Leptospira* cultures were negative for two patients tested (Cases 4 and 8). For the other patients, by the time we had the diagnosis, they had received antibiotics, after which point culture is usually not possible.

Sequencing of the *Leptospira* 16S rDNA gene indicated that four cases (Cases 2, 3, 7 and 8) were infected with three genomospecies: *L. santarosai* (two cases), *L. kmetyi* and *L. kmetyi*-like. MAT of Case 1's isolate showed agglutination with the serogroup Celledoni.

**TABLE 3**

Laboratory results for leptospirosis outbreak among canyoning participants, Martinique, 2011 (n=8)

Case number	Date of sampling in 2011 (number of days after symptom onset)	qPCR	ELISA titre	MAT titre (serogroup)	Genomic species
1	10 July (4)	Positive	6,400	400 (Celledoni)	ND
2	10 July (1)	Positive	400	50 (Patoc)	<i>L. santarosai</i>
3	13 July (2)	Positive	NT	NT	<i>L. kmetyi</i> -like <sup>a</sup>
4	18 July (0)	Positive	0	0	ND
5	18 July (2)	Positive	NT	NT	ND
6	19 July (4)	Negative	0	0	NT
7	18 July (6)	Positive	1,600	800 (Patoc)	<i>L. kmetyi</i> <sup>b</sup>
8	23 July (1)	Positive	0	0	<i>L. santarosai</i>

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; MAT: microscopic agglutination test; ND: not determined; NT: not tested; qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> Sequencing of the 279 nucleotide 16S rRNA PCR product showed similarity to *L. kmetyi* (273/279 nucleotides) and *L. kirschneri* (272/279 nucleotides).

<sup>b</sup> The 279 nucleotide 16S rRNA PCR product was identical except for two mismatches (277/279 nucleotides) to the corresponding variable region of the 16S rRNA sequence of the *L. kmetyi* reference strain

### Environmental investigation

We obtained two sets of water samples from the river where the canyoning took place. All the cultures and the qPCR assays were negative or could not be analysed because of the presence of inhibitors, despite numerous filtrations to remove environmental contaminants.

According to Météo France, the total rainfall recorded in the main lowland of Martinique (which is the nearest place for rainfall recording) during the first six months of 2011 was the highest since 1981 [18]. Moreover, heavy rainfall was recorded in late June. At the same time, the temperatures recorded in June 2011 were the highest since 1971, with a mean maximum of 32.1 °C in the lowland [18].

### Discussion

#### Epidemiology and risk factors

On the basis of our epidemiological investigation, exposure to Absalon River water was the most likely source of *Leptospira* infection. The attack rate of 20% could be explained by a combination of factors, such as: prolonged immersion in water, causing softening and wrinkling of the skin; unavoidable skin and mucous membrane exposure; and probably a higher concentration of leptospires in the river after the unusually heavy rainfall and high temperatures at the end of June. The investigation was conducted as part of a public health response and therefore laboratory analysis was carried out only on samples from symptomatic participants. However, these patients might represent only a small percentage of the infections, as in the majority of persons infected with leptospires, the infection remains subclinical and undiagnosed [8,11]. In previous leptospirosis outbreaks following exposure during recreational water activities, observed attack rates ranged from 12% to 42 % [1,2,4,5].

Although none of the potential risk or protective factors investigated was significantly associated with leptospirosis, it should be noted that: (i) the response rate for some questions was low; (ii) those who reported having swallowed river water had three times the risk of developing leptospirosis compared with those who did not, although it remained not significant; (iii) 15 of 34 respondents reported having skin wounds during the canyoning exercises; and (iv) only four participants reported wearing complete neoprene suits that protected their arms and legs: none of them developed leptospirosis.

Together with being submerged in water, swallowing water potentially contaminated by leptospires was demonstrated to be a risk factor for leptospirosis among military personnel participating in several sporting events, in Okinawa, Japan, and persons drinking water from an Italian fountain [2,4,5,19,20]. In the outbreak reported here, *Leptospira* might also have been contracted via exposure of the conjunctivae and

wrinkled, softened skin, as described in other water sports [3].

Although it has been described in recreational settings, leptospirosis in military personnel is mainly an occupational disease and outbreaks have been reported after training exercises in various areas, such as the high jungle rainforest of Peru, Japan, and northern Israel near the Jordan River [21-23]. As reported for other outbreaks related to military training exercises or sports events, young men in the Martinique outbreak reported here were predominantly affected [2,4-6]. However, the numbers of persons potentially exposed were low, comprising only a few women. None of those who wore protective clothing were women.

The presence of inhibitors in the PCR and cultures, or a bacterial load below the detection threshold, could explain the negative results obtained for environmental samples. Environmental investigations of other leptospirosis outbreaks (in which lake, creek and swamp water were sampled) in Illinois and Florida in the United States, samples tested negative, despite epidemiological evidence of widespread leptospiral contamination of the water and the surrounding environment [2,5]. As reported by Morgan et al., results of screening large bodies of freshwater for leptospires should not guide public health authorities in making decisions regarding the safe recreational use of water [2].

The end of June, 2011, when the canyoning exercises took place, was characterised by unusually heavy rainfall and high temperatures. In the Caribbean, as in other parts of the world, leptospirosis outbreaks have been reported after periods of heavy rainfall, flooding, and hurricanes [24,25]. In tropical areas where leptospirosis is endemic, it is thought that heavy rain or flooding saturates the potentially contaminated soil and the rising water level carries pathogenic leptospires to the surface of the land and rivers [7]. Outbreaks specifically associated with endurance and water sports events following periods of heavy rainfall have been reported in Costa Rica, the United States, Malaysian Borneo and Martinique [1,2,4-6].

#### Laboratory aspects

Blood samples for qPCR-based diagnosis were collected after a median of two days after symptom onset. As the qPCR assay used can be completed in around five hours (data not shown), information about the specific risk of leptospirosis was given to all participants within one week after confirmation of the first cases. In the context of an outbreak, MAT confirmation can be impeded by the absence of convalescent-phase samples, the need for reference laboratories, or the lack of sensitivity for region-specific serovars not represented in the test's antigen battery.

As we previously reported for a sporting event in Martinique, direct qPCR allows an unequivocal diagnosis based on a single specimen during the early acute

phase of illness – when treatment is most effective – and before serological and/or culture results become available [6,7,26,27]. Real-time PCR assays are being used increasingly to diagnose leptospirosis [28]. A recent study using a well-characterised cohort of laboratory-confirmed leptospirosis patients in Sri Lanka demonstrated not only the strength of the qPCR assay for early diagnosis, but also that the qPCR window of positivity ranged from day 2 to day 15 after symptom onset [29].

In the same samples used for qPCR-based diagnosis, we identified three *Leptospira* species. The identification of three different *Leptospira* species by sequencing could suggest multiple exposures in a risky environment, reflecting the diversity of potential wild and domestic reservoir animals in tropical areas. During 2010 to 2011, MAT on human serum samples showed that the most prevalent *Leptospira* serogroups in Martinique were Icterohaemorrhagiae (36%), Sejroe (16%), Ballum (12%), Canicola (12%), and Pyrogenes (8%) (data from the National Reference Center for Leptospirosis, France). In our study, blood samples were collected during the first week of the disease, and only two cases' convalescent samples were available for conclusive testing. Therefore, despite the availability of a regionally optimised MAT panel, only one serogroup was identified.

As culture usually has a low sensitivity, it was not surprising that the results were negative. Moreover, the 1:10 dilution we used for culture may have impaired the technique.

### Prevention

Following this leptospirosis outbreak in Martinique, health authorities informed all the organisers of canyoning activities on the island about the risk of leptospirosis and the need to inform participants about preventive measures [30]. Considering the inevitability of water exposure during canyoning activities and the higher risk of leptospirosis in tropical areas, all participants should be informed about individual preventive measures [1,3]. Preventive measures for participants in high-risk water activities in military or civilian settings are summarised in the Box. In our study, known risk factors, such as swallowing river water or skin abrasions, were not significantly associated with leptospirosis, but we may not have had sufficient data to detect significance. We can only hypothesise that the use of protective neoprene suits during canyoning might be protective. After a leptospirosis outbreak in workers who participated in cleaning a pond in Thailand, an investigation found that clothing was protective, while the presence of skin wounds was associated with infection, confirming that breaks in the skin serve as portals of entry for the leptospire [12].

None of the leptospirosis vaccines currently available is associated with protection against the wide diversity of serovars encountered in the tropics. The vaccine

### BOX

Recommendations regarding high-risk water activities in places such as rivers, lakes or swamps: what to do before, during and after the activities in order to prevent and promptly treat leptospirosis

#### Before

When possible, avoid any water activities the days following heavy rainfall and/or flooding.

#### During

Prevent skin abrasions by wearing appropriate clothes (e.g. protective neoprene suits during canyoning), avoid mucous membrane exposure when possible and avoid swallowing the water.

#### After

Rinse any abrasions or lacerations with clean water and antiseptics. Seek medical attention if fever occurs during the three weeks following the water activities.

available in France confers protection only against the serovar Icterohaemorrhagiae. The role of such immunisation to prevent leptospirosis in people who participate regularly in water activities in endemic areas warrants further study. To the best of our knowledge, this could be the first identification of *L. kmetyi* infection in humans, although this finding needs confirmation by genomic identification based on a positive culture.

For residents and travellers who visit endemic areas participating in recreational activities with prolonged water exposure, leptospirosis could theoretically be prevented by antibiotic chemoprophylaxis. The potential protective effect of antibiotics could not be assessed in our study because none of the participants reported any ongoing or recent antibiotic treatment. To date, three randomised clinical trials evaluated whether the use of doxycycline can prevent leptospirosis, either as pre-exposure (weekly administration) or post-exposure (single dose) prophylaxis. Taken together, the data does not support such prophylaxis in all cases, although short-term travellers with high-risk exposure may be helped [31-34]. To date, neither prophylaxis schedule has been evaluated in the setting of sporting events in the tropics. On the basis of the high leptospirosis attack rate among athletes who participated in an endurance race in Borneo in 2000, the United States Centers for Disease Control and Prevention recommended that all ill athletes be treated empirically with doxycycline and that asymptomatic athletes discuss the possible merits of a single doxycycline dose for post-exposure prophylaxis [4]. In the outbreak in Martinique reported here, no such chemoprophylaxis was offered, but participants were advised to seek medical attention and testing with rapid diagnostic assays to confirm the diagnosis and hence treat leptospirosis early during the disease course.

## Acknowledgements

We thank Janet Jacobson for editorial assistance and the technicians from the National Reference Center for Leptospirosis (Sylvie Brémont, Annie Landier and Farida Zinini) for serological analysis of sera. This work was funded by the Institut Pasteur and the French Institute for Public Health Surveillance (InVS).

## References

1. From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996. *JAMA*. 1997;278(10):808-9. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1997.03550100030014>
2. Morgan J, Bornstein SL, Karpatt AM, Bruce M, Bolln CA, Austin CC, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis*. 2002;34(12):1593-9. <http://dx.doi.org/10.1086/340615> PMID:12032894
3. Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Selvar JJ, et al. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2002;34(9):e40-3.
4. Selvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettlinger J, Bajani M, Bragg S, et al. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(6):702-7. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0906.020751> PMID:12781010 PMID:3000150
5. Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, et al. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clin Infect Dis*. 2010;50(6):843-9. <http://dx.doi.org/10.1086/650578> PMID:20146629
6. Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, et al. Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(4):621-6. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0502> PMID:21460020 PMID:3062459
7. Falne S, Adler B, Bolln CA, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.
8. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001> PMID:11292640 PMID:88975
9. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757-71. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
10. World Health Organization (WHO). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO; 2003. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.23.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf)
11. Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, Perkins BA, Weyant RS, Bragg SL, et al. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63(5-6):249-54.
12. Phraisuwan P, Whitney EA, Tharmaphornpias P, Guharat S, Thongkamsamut S, Aresagig S, et al. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1455-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0812.020180> PMID:12498663 PMID:2738501
13. Vlnetz JM. A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what? *Clin Infect Dis*. 2003;36(12):1514-5. <http://dx.doi.org/10.1086/375275> PMID:12802749
14. Brett-Major DM, Coldren R. Antibiotics for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;2:CD008264.
15. Merlen F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berloz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;1:249(1):139-47.
16. Merlen F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992;30(9):2219-24.
17. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merlen F, Perolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to L. meyeri. *Res Microbiol*. 2000;151(5):333-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00156-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00156-X)
18. Bulletin Climatique Mensuel. 972 Martinique. Juin 2011. [Monthly Climatic Bulletin. 972 Martinique. June 2011]. Météo France; 2011. Available from: <http://www.meteo.gp/alaune/bcm/archives/201106bcmmart.pdf>
19. Corwin A, Ryan A, Bloys W, Thomas R, Denlega B, Watts D. A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. *Int J Epidemiol*. 1990;19(3):743-8. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/19.3.743> PMID:2262273
20. Cacclapuoti B, Ciceroni L, Maffei C, Di Stanislao F, Strusi P, Calegari L, et al. A waterborne outbreak of leptospirosis. *Am J Epidemiol*. 1987;126(3):535-45.
21. Katz AR, Sasaki DM, Mumm AH, Escamilla J, Middleton CR, Romero SE. Leptospirosis on Oahu: an outbreak among military personnel associated with recreational exposure. *Mil Med*. 1997;162(2):101-4.
22. Russell KL, Montiel Gonzalez MA, Watts DM, Lagos-Figueroa RC, Chauca G, Ore M, et al. An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69(1):53-7.
23. Hadad E, Pirogovsky A, Bartal C, Gilad J, Barnea A, Yitzhaki S, et al. An outbreak of leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):127-31.
24. Sanders EJ, Rigau-Pérez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, et al. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(3):399-404.
25. Storck CH, Postic D, Lamaury I, Perez JM. Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003-2004, a two El Niño Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect*. 2008;136(10):1407-15. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268807000052> PMID:18096102 PMID:2870739
26. Merlen F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis*. 1995;172(1):281-5. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/172.1.281> PMID:7797932
27. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 1):45-9.
28. Bourhy P, Brémont S, Zinini F, Glyc C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2154-60. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02452-10> PMID:21471336 PMID:3122738
29. Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vlnetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiemia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis*. 2012;54(9):1249-55. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis035> PMID:22354922
30. Escher M, Hochedez P, Rosine J, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, et al. Cas groupés de leptospirose chez les participants à des activités de canyoning en Martinique, 2011. [Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011]. *Bulletin de Veille Sanitaire, CIRE Antilles Guyane*. 2012;6:2-4. French. Available from: [http://www.ars.martinique.sante.fr/fileadmin/MARTINIQUE/Votre\\_Sante/Veille\\_sanitaire/Les\\_champs\\_de\\_compétences/BVS/BVS\\_12/BVS\\_2012-06\\_V2.pdf](http://www.ars.martinique.sante.fr/fileadmin/MARTINIQUE/Votre_Sante/Veille_sanitaire/Les_champs_de_compétences/BVS/BVS_12/BVS_2012-06_V2.pdf)
31. Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, et al. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med*. 1984;310(8):497-500. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198402233100805> PMID:6363930
32. Gonzalez CR, Casseb J, Monteiro FG, Paula-Neto JB, Fernandez RB, Silva MV, et al. Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998;40(1):59-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651998000100012> PMID:9713140
33. Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;13(4):249-55. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00134-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00134-X)
34. Brett-Major DM, Lipnick RJ. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(3):CD007342.

### **3.3. Article 3 – Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique**

Patrick Hochedez, Rafaele Theodose, Claude Olive, Pascale Bourhy, Guillaume Hurtrel, Nicolas Vignier, Hossein Mehdaoui, Ruddy Valentino, Roland Martinez, Jean-Marie Delord, Cécile Herrmann, Isabelle Lamaury, Raymond Césaire, Eric Caumes, Mathieu Picardeau, André Cabié. [Article soumis à EID le 28/06/2014]

Nous avons mis en place une étude de cohorte prospective avec des patients pris en charge pour une leptospirose diagnostiquée par RT-PCR entre 2010 et 2013 en Martinique. L'objectif de notre travail était de déterminer si la leptospirémie et certains paramètres clinico-biologiques mesurés à l'admission étaient associés à la sévérité de la maladie. La sévérité était définie par le décès ou l'utilisation des traitements réanimatoires suivants : ventilation mécanique, dialyse, perfusion de drogues vasoactives ou transfusion sanguine.

Parmi les 102 patients inclus dans l'étude, 12 étaient sévères (11,7%) et la leptospirémie déterminée par RT-PCR était significativement plus élevée chez les cas sévères (7.49 log<sub>10</sub> (7.13-7.81) vs. 4.16 log<sub>10</sub> (3.14-4.93), p=0.00001). Un seuil critique de 6.5 log<sub>10</sub> (leptospires/ml) pouvait être considéré pour les cas sévères. Les Principaux éléments clinico-biologiques relevés à l'admission et associés à la sévérité étaient : l'hypotension, les anomalies auscultatoires, l'ictère, l'oligurie, la thrombopénie, la chute du TP, l'identification de l'espèce *Leptospira interrogans*, et le sérovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni.

**Cet article rapporte pour la première fois grâce à une étude de cohorte prospective l'association entre l'élévation de la concentration sanguine de leptospires et la sévérité de maladie aux Antilles. Ce travail nous a aussi permis de déterminer quels critères clinico-biologiques recueillis à l'admission du patient étaient associés à la sévérité et permettent de mieux orienter la prise en charge du patient. Enfin, nous rapportons l'association entre l'espèce *Leptospira interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni et la sévérité de la maladie en Martinique.**

Contribution personnelle à ce travail : Rédaction du protocole, investigateur principal de l'étude, inclusion et suivi de la majorité des patients, analyse des résultats et écriture de l'article en collaboration avec les co-auteurs.

# Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique

Patrick Hochedez, MD<sup>1,11</sup>, Rafaele Theodose, MD<sup>2,11</sup>, Claude Olive, MD<sup>2,11</sup>, Pascale Bourhy, PhD<sup>3</sup>, Guillaume Hurtrel, MD<sup>1</sup>, Nicolas Vignier, MD<sup>1,4</sup>, Hossein Mehdaoui, MD<sup>5</sup>, Ruddy Valentino, MD<sup>5</sup>, Roland Martinez, MD<sup>6</sup>, Jean-Marie Delord, MD<sup>7</sup>, Cécile Herrmann, MD<sup>8,11</sup>, Isabelle Lamaury, MD<sup>9,11</sup>, Raymond Césaire, MD<sup>10,11</sup>, Eric Caumes<sup>12</sup>, MD, Mathieu Picardeau, PhD<sup>3</sup>, André Cabié, MD<sup>1,13</sup>

<sup>1</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, and <sup>2</sup>Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique, France; <sup>3</sup>Unité de Biologie des Spirochètes, Centre National de Référence et Centre Collaborateur OMS de la Leptospirose, Institut Pasteur, Paris, France; <sup>4</sup>Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire Avicenne, Bobigny, France; <sup>5</sup>Service de Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique, France; <sup>6</sup>Service de Médecine Polyvalente, Centre Hospitalier de Trinité, Martinique, France; <sup>7</sup> Service de Médecine Polyvalente, Centre Hospitalier du Lamentin, Martinique, France; <sup>8</sup>Service de Bactériologie, and <sup>9</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales/Dermatologie-Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe à Pitre, Guadeloupe, France ; <sup>10</sup>Service de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Fort de France, Martinique, France; <sup>11</sup>Université des Antilles et de la Guyane EA 4537, France; <sup>12</sup> Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire Pitié Salpêtrière, Paris France. <sup>13</sup>INSERM CIC 1424, France

**Correspondence to:** Patrick Hochedez (corresponding author), Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, BP 632, 97261 Fort de France, Martinique, France. Tel 33 1 96 55 23 01; Fax 33 1 96 55 97 44; Email: [patrick.hochedez@chu-fortdefrance.fr](mailto:patrick.hochedez@chu-fortdefrance.fr)

**Article summary line:** Severe leptospirosis in Martinique

**Keywords :** severe leptospirosis, leptospiremia, *Leptospira interrogans*, serogroup Icterohaemorrhagiae, qPCR, Martinique

## **Abstract**

We conducted a cohort study of patients with qPCR-confirmed leptospirosis in Martinique, a Caribbean island where the disease is endemic, in 2010- 2013. Cases were considered severe if vasoactive drugs, dialysis, blood transfusion, or mechanical ventilation was required. Among the 102 patients enrolled, 12 had criteria of severe leptospirosis (11.7%). qPCR-determined leptospiremia was significantly higher among severe cases (7.49 log<sub>10</sub> (7.13-7.81) vs. 4.16 log<sub>10</sub> (3.14-4.93), p=0.00001), and we found a critical threshold of 6.5 log<sub>10</sub> (leptospores/ml) that could be considered for severe cases. The clinical, laboratory, and microbiologic findings at the time of admission that were associated with severe leptospirosis included: hypotension, chest auscultation abnormalities, icterus, oligoanuria, platelets < 92 G/l, prothrombin time < 68%, identification of *Leptospira interrogans* species (p=0.001), and serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (p=0.03). Quantitative polymerase chain reaction is a rapid diagnostic method in the diagnosis of acute leptospirosis and may provide timely information regarding disease severity.

## **INTRODUCTION**

Leptospirosis is a bacterial zoonosis of worldwide distribution whose incidence is higher in impoverished populations in developing countries and tropical regions (1). According to the World Health Organisation, it has been estimated that more than one million cases of leptospirosis occur worldwide each year and the disease poses an increasing public health problem (2). Humans are usually infected through contact with water or soil contaminated with the urine of carrier animals, and less frequently through direct contact with animals (3). Leptospirosis cases occur as a result of daily occupational exposure in rural regions and urban slums, but also due to recreational activities, and extreme climatic events such as hurricanes and flooding (2, 4, 5). The disease is caused by pathogenic strains of the genus *Leptospira*, which is composed of 21 genomic species; 9 of them are identified as pathogenic, and comprising over 200 serovars (6, 7). Clinical manifestations are protean and the spectrum of symptoms range from an influenza-like syndrome to Weil's disease (the triad of jaundice, acute renal failure, and haemorrhage) and acute respiratory distress syndrome which are associated with mortality rates over 10 to 50%, respectively (5). To reduce the burden of severe leptospirosis, early diagnosis and prompt triage of high-risk patients is critical. Antibiotic treatment is likely to have the greatest benefit during the early acute stage of the illness (preferably before the fifth day), and complications such as acute renal failure, respiratory insufficiency and shock require early treatment and monitoring in Intensive Care

Units (5, 8). Culture and serologic based diagnosis, including the microscopic agglutination test (MAT) which is considered to be the gold standard diagnostic test for leptospirosis, are insensitive in the first week of symptoms. At present, only direct detection methods using PCR might provide rapid diagnosis during the acute stage of the illness. Quantitative PCR (qPCR) also offers the ability to measure the level of leptospiremia in clinical samples, a parameter that has been associated with disease severity in three retrospective studies conducted in New Caledonia and Peru (9-11). Finally, DNA extracts from blood samples can also be used for the identification of leptospires at the species and subspecies levels (12).

Leptospirosis is endemic in Martinique, a Caribbean island of the French West Indies with 400,000 inhabitants, and its incidence was 37/ 100,000 in 2012, which was 66 times higher than in Mainland France (data from the National Reference Center for Leptospirosis, Institut Pasteur). Our primary objective was to determine if qPCR-determined leptospiremia was associated with severe evolution of the disease in a cohort of laboratory-confirmed cases. Secondary objective was to identify clinical and biological variables associated with severe leptospirosis.

## **METHODS**

### **Study design**

Samples for the present study were obtained from a cohort of patients between December 2010 and February 2013 in the University Hospital of Fort-de-France and two other hospitals (located in La Trinité, and Le Lamentin). Laboratory studies were performed at the University Hospital Fort de France (qPCR and culture), and the National Reference Center (NRC) for Leptospirosis at Institut Pasteur, Paris, France (MAT and genotyping).

### **Inclusion criteria and case definitions**

Patients were included according to the following criteria: adults (more than 18 years), diagnosis of leptospirosis confirmed by qPCR, acceptance to participate in the study, patient registered in the French social security system. Patients' characteristics, symptoms, and physical findings were recorded at admission using a standardized questionnaire with an electronic Case Report Form (eCRF). Patients were queried regarding their exposures (e.g. farming, fresh water exposure), host-related factors (e.g. chronic alcoholism, tobacco use), and their contact with animals. A complicated evolution of leptospirosis was defined as the occurrence during the 12-week follow-up period of one or more of the following complications: acute renal failure (serum creatinine > 177  $\mu\text{mol/L}$ ), icteric leptospirosis (total

bilirubin > 34  $\mu\text{mol/L}$ ), pulmonary haemorrhage or other internal bleeding, respiratory distress syndrome, heart failure, multi organ failure. Among complicated leptospirosis, severe leptospirosis was defined by the presence of at least one of the following criteria: shock treated with vasoactive drugs, acute renal failure requiring dialysis, internal bleeding requiring blood transfusion, respiratory insufficiency requiring mechanical ventilation, or death.

### **Diagnosis of leptospirosis by qPCR and quantification of *Leptospira* in Blood Samples**

After the concentration of 1.8 ml EDTA-treated plasma by centrifugation (12,000g, 10 min), DNA was extracted (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen SA, Courtaboeuf, France) and used to perform a SYBR green assay targeting *lfbI* as previously described (13). qPCRs were performed on an iQ<sup>TM</sup>5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). The sensitivity of the assay was evaluated using DNA extracted from a range of  $10^7$ - $10^2$  leptospires/ml ten-fold dilutions of reference strains belonging to *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* and *L. kirschneri*. During the study period, PCR were performed twice a week and quantification was carried out secondarily after the initial screening stage to minimize variability between measurements. All DNA samples were tested twice in independent experiments.

### **Serologic and culture diagnosis**

Serum samples were subjected to the microscopic agglutination test (MAT) at the NRC for Leptospirosis at the Institut Pasteur (Paris, France) as previously described (14). For 45 samples available for culture, *Leptospira* were cultured by inoculating plasma prepared from heparinized blood from patients into Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris (EMJH) liquid medium at the University Hospital Fort de France (Martinique). Leptospire positive cultures were then sent to the NRC for Leptospirosis for typing.

### **Genetic characterization of *Leptospira***

Genomic DNA was extracted from EMJH cultures or from human plasma, then species identification was performed by amplification and sequencing of the 16S rRNA (15,

16). Identification at the subspecies level was also performed by sequencing the *secY* gene and by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) using the loci VNTR4, VNTR7, and VNTR10 as previously described (17). MAT serogrouping was also performed on positive cultures.

### **Data Analysis**

Statistical analysis was performed using Stata software version 12 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Categorical variables were summarized using frequency and percentage and compared (severe vs. others) using the Fischer-Exact test. Continuous variables were summarized using median, first quartile (Q1) and third quartile (Q3), and compared using non-parametric tests (Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis as appropriate). Leptospiremia was log-transformed. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis was used to determine the critical threshold for leptospiremia as the marker for leptospirosis severity. Logistic regression was used to identify factors associated with severe leptospirosis and to estimate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). A P value of less than 0.05 was considered statistically significant.

### **Human Subjects Protections**

The study was approved by the French consultative committee for data processing in health research. Informed consent was obtained from patients. All data analysed were anonymised.

## **RESULTS**

Between December 2010 and February 2013, 131 patients were diagnosed for leptospirosis by qPCR in the University Hospital of Fort de France (Martinique). Samples were obtained from the University Hospital (n=57), two other hospitals on the island (n=69), and private laboratories (n=5). 29 samples were excluded from further analysis because they were not hospitalized in our centre, and follow-up was not possible (n=15), could not be traced (n=7), refused follow-up (n=4), or were children (n=3).

A total of 102 patients diagnosed for leptospirosis by qPCR were included. The majority of cases were men (86.3%) who originated from Martinique (77.4%), and their

median age was 49 [37-57] years. Of these patients, 89 were hospitalized and the remaining 13 were outpatients. The median delay between onset of symptoms and hospitalization was 3 [2-5] days and 23 patients required hospitalizations in ICUs. Among the 102 patients, 48 (47%) had a complicated evolution of leptospirosis, and 12 (11.7%) met our clinical definition for severe leptospirosis. The median length of hospitalization was 14 [8-29] days for severe cases compare to 5.5 [4-8] days for others ( $p=0.0002$ ). All the patients included in the study were diagnosed by qPCR prior to administration of any antibiotics. The median delay for qPCR diagnosis was 3 [2-5] days, and blood tests were sampled from day 1 to day 11 after the onset of symptoms. All but three patients were given antibiotics, and the median delay between onset of symptoms and antibiotics was 4 [3-5] days. This delay was not significantly different in severe cases.

Leptospiremia, which was determined by qPCR (Figure 1) was significantly higher among severe cases (7.49 log<sub>10</sub> (7.13-7.81) vs. 4.16 log<sub>10</sub> (3.14-4.93),  $P=0.00001$ ). Major complications that were present at admission or occurred during the follow-up are reported in Table 1, together with their associated leptospiremia. Among the 12 patients that met our clinical definition for severe leptospirosis: 9 had shock requiring vasoactive drugs, 8 had pulmonary involvement requiring mechanical ventilation, 8 had internal bleeding requiring blood transfusion, and 7 had acute renal failure requiring dialysis. No patient died. The median length of evolution before the occurrence of a severe leptospirosis was 3 [3-4] days. Except for acute renal failure, all complications were associated with a higher level of leptospiremia (Table 1, and figure 2). Using a Roc analysis we found a critical threshold of 6.5 log<sub>10</sub> (leptospires/ml) that could be considered for severe leptospirosis (Figure 1).

Among epidemiologic characteristics, only the presence of rats in the house or in the surrounding vicinity was associated with severity. Neither occupation, host-related factors, nor contact with other animals were associated with severity. The clinical characteristics at admission and their potential association with severe leptospirosis in the univariate analysis are presented in Table 2. The following clinical signs were associated with severe leptospirosis: hypotension, chest auscultation abnormalities, icterus, and oligoanuria. None of the patients reported previous immunization against leptospirosis. Laboratory findings at the time of admission and their potential association with severe leptospirosis are presented in Table 3. These included bilirubin > 49  $\mu\text{mol/L}$ , Creatinine > 154  $\mu\text{mol/L}$ , urea nitrogen > 9.3 mmol/L, CPK > 443 U/L, CRP > 282 mg/L, Hemoglobin < 12.2 g/dL, lymphocytes < 0.49 G/L, platelet < 92 G/L, and prothrombin time < 68%.

Molecular typing was performed in genomic DNA from the 102 acute-blood samples (Table 4). Species determination by sequencing the 16S rRNA (*rrs*) was successful for 85 patients (83%) and the samples corresponded to one of the following 6 pathogenic species: *L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, and *L. noguchii*. Molecular identification at the subspecies level was successful for 57 patients (56%) by sequencing the *secY* gene and MLVA. For 22 patients (of 45 tested), culture were positive. Finally, MAT was performed from acute and convalescent serum samples, allowing the identification of the putative serogroups in 70 patients (68.6%). Based on our knowledge of *Leptospira* circulating agents in Martinique, (12) our data has shown that the most common serogroups identified were Icterohaemorrhagiae (39), Ballum (11), Celledoni (10), Tarassovi (7), and Australis (3). Serogroup Icterohaemorrhagiae can be subdivided into serovars Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (20) and Bogvere (10); the remaining (9) cannot be unambiguously typed at the serovar level. The identification of the putative serogroup was not possible for 32 patients because DNA sequences were not interpretable or did not match the genotype of known serovars (see Supplementary Material).

To determine whether the success of genomic identification correlated with leptospiremia, we compared median leptospiremia of specimens with and without species identification and found that the latter was significantly lower in the univariate analysis ( $P=0.0001$ , Table 4). On the basis of melting temperature ( $T_m$ ) variability among the *lfb1* amplification products, we observed that *L. interrogans* strains had a median melting peak at  $83.1^\circ\text{C}$  ( $82.8\text{-}83.4$ ) which was significantly different from other species for which the median melting peak was  $85^\circ\text{C}$  ( $84\text{-}85.9$ ) ( $P=0.0001$ ). Among the genomic species identified, *L. interrogans* was associated with severity ( $P=0.001$ ), highest level of leptospiremia ( $P=0.0001$ , Table 4), and previous exposure to rats ( $P=0.02$ ). Interestingly, serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni was identified in 11 out of the 12 cases with severe disease showing that this serovar is commonly associated with severe leptospirosis ( $P=0.03$ ).

## DISCUSSION

This prospective study allowed us to report the potential contribution of molecular based techniques to timely diagnosis and disease severity evaluation of acute leptospirosis at the point-of-care in an endemic area. qPCR-determined leptospiremia  $> 6.5 \log_{10}$  (leptospires/ml), identification of the genomic species *L. interrogans*, and the identification of serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni were associated with severe leptospirosis. We also

identify several clinical and biological variables present at the time of admission that were associated with severe forms of leptospirosis.

We classified the severity of leptospirosis based on treatment-related criteria rather than complication-related criteria (e.g. Weil's syndrome) or the type of hospitalization (e.g. Intensive Care Unit). This classification was preferred in order to reflect everyday patient management, as it was reported in two previous studies in Guadeloupe and New Caledonia (11, 18). Contrary to those two studies for which the case-fatality rate was from 14% to 25%, none of our cases were fatal (11, 18). Since our patients were included early in the course of the disease (when qPCR is positive), absence of fatal cases could be related to combined factors such as the reduced diagnosis time, early antibiotic treatment, early hospitalization within an ICU, or other factors that were not taken into account (e.g. inherent pathogenicity of leptospiral strains). Contrary to previous studies in endemic areas, we did not identify factors such as age, chronic hypertension, chronic alcoholism, smoking, or delay of antibacterial therapy to be associated with severity (4, 11, 18). As previously reported, we identified clinical and laboratory parameters at the time of admission that were associated with severe leptospirosis and could be used to promptly identify at risk patients (4, 11, 18, 19).

Noteworthy, patients had their qPCR diagnosis test performed after a median of 3 [2-5] days after fever onset, while only 8 of our patients had their diagnosis confirmed by MAT on the first serum specimen. As the qPCR assay used can be completed in less than five hours, only direct qPCR allows an unequivocal diagnosis based on a single specimen during the early acute phase of illness – when treatment is likely to have the greatest benefit – and before serological and/or culture results become available (8, 20, 21). Finally, the precocity of diagnosis may provide potential benefits for epidemiologic investigation as we previously reported for two sporting events in Martinique (14, 22).

Our results show a strong association between leptospiremia levels and complications and we defined a leptospiremia critical threshold of 6.5 log<sub>10</sub> leptospores/ml associated with disease severity. Bacterial load in blood has already been identified as a predictor of disease severity and outcome for other pathogens such as *Neisseria meningitidis* (23). A critical threshold of 10<sup>4</sup>/ml for the vital prognosis of leptospirosis patients was initially reported in New Caledonia, based on 12 confirmed cases (9). In a retrospective study in Sri Lanka, median bacterial load was lowest in the uncomplicated group, but was not statistically different from other outcome categories, which could possibly be explained by the small number of severe leptospirosis cases in the study (24). In the largest retrospective study published to date, a critical threshold of 10<sup>3</sup> leptospores/ml associated with disease severity

was reported in New Caledonia (11). Differences between critical thresholds may be related to factors such as the variability of virulence among different leptospiral serovars, host factors, qPCR technique, or the timing of sampling. Regardless, our lower limit of detection (100 bacteria/ml) was comparable to those in previous published studies (25).

The same samples obtained during acute illness and used for qPCR-based diagnosis were also used for direct *Leptospira* genomic identification and a genomic species was identified for 85 patients without the need for culture isolation (12). Definitive identification of the infecting serovar still relies on culture as the gold standard, but the technique is challenging and requires several weeks of incubation. Conversely, identification of the putative serogroup by MAT can be impeded by the absence of convalescent-phase samples, or paradoxical- and cross-reactions between serogroups (26). As similarly reported by Agomposi et al., molecular typing performance was impaired for samples with the lowest leptospiremia in our study (27). The most common serogroup identified in our study, Icterohaemorrhagiae, was significantly associated with severe leptospirosis, as was the species *L. interrogans*. Molecular typing was able to identify *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni as the major cause of severe leptospirosis, but not *L. kirschneri* serovar Bogvere, which also belongs to the serogroup Icterohaemorrhagiae. Melting curve analysis of the assay targeting *lfb1* may provide rapid and useful additional information as it can differentiate between *L. interrogans* and other pathogenic species (13, 25), but additional PCR-based methods should be developed to specifically detect serovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni from acute-blood samples.

Importantly, the presence of rats in the house and surroundings was also associated with disease severity. Two rat species (*Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*) are common in Caribbean islands, and are usual carriers of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae (28). The potential correlation between disease severity and serogroup Icterohaemorrhagiae has been reported in tropical islands like Hawaii, Guadeloupe and New Caledonia (11, 18, 29). Consistent to those studies, our results emphasize the importance of public health action for rodent control measures. In France, a human vaccine containing only serovar Icterohaemorrhagiae is given to a restricted group of professionals such as those working within sewage-containing environments (30). Immunization should be evaluated in the French West Indies with the objective to reduce the incidence of severe disease among people with frequent rodent exposure.

The main limitation of our study was the small number of patients in the severe category. Concordantly, we were not able to assess if high levels of leptospiremia and the

identification of *L. interrogans* were independent factors associated with severe leptospirosis. Moreover, culture isolation of infecting serovars was not performed for all patients. Although we defined the sensitivity of the qPCR using bacterial concentrations from  $10^2$  to  $10^7$  leptospire/ml, some patients had qPCR-determined leptospiremia higher than this and we cannot confirm that the test is linear at higher concentrations. Nevertheless, using a Roc analysis we found a critical threshold of 6.5 log<sub>10</sub> (leptospire/ml) that could be considered for severe leptospirosis, and that threshold was within the range of our  $10^2$  -  $10^7$  standard curve. Future studies should take place in other populations and other locations, and explore whether high levels of leptospiremia are related to factors such as pathogen's virulence characteristics, host factors, or infection inoculum at the time of exposure.

In conclusion, qPCR is not only a rapid diagnostic method in the diagnosis of acute leptospirosis. It may also provide timely information regarding disease severity evaluation. Cost still restrains the use of molecular-based diagnostic testing in many tropical countries. However, although the genomic identification of *Leptospira* species requires the expertise of reference centres, the determination of qPCR-determined leptospiremia seems increasingly accessible and should be evaluated in other endemic areas.

### ***Acknowledgments***

*We thank Olivier Verlaeten and Ludovic Jeanneau who introduced the qPCR technique in the University Hospital of Fort de France; Dorothee Haug and the technical staff at the Service de Bactériologie of the University Hospital of Fort-de-France ; Janick Jean-Marie and the staff at the Centre d'Investigation Clinique et d'Epidémiologie Clinique Antilles-Guyane (CIC-EC, INSERM CIE 802); Christopher Pappas for editorial assistance. We thank the French Ministry of Health with the participation of the Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Sud-Ouest Outre-Mer (PHRCI 2011) for funding; the Direction de la Recherche Clinique et de innovation (DRCI) of the University Hospital of Fort-de-France, Martinique, France.*

### **References**

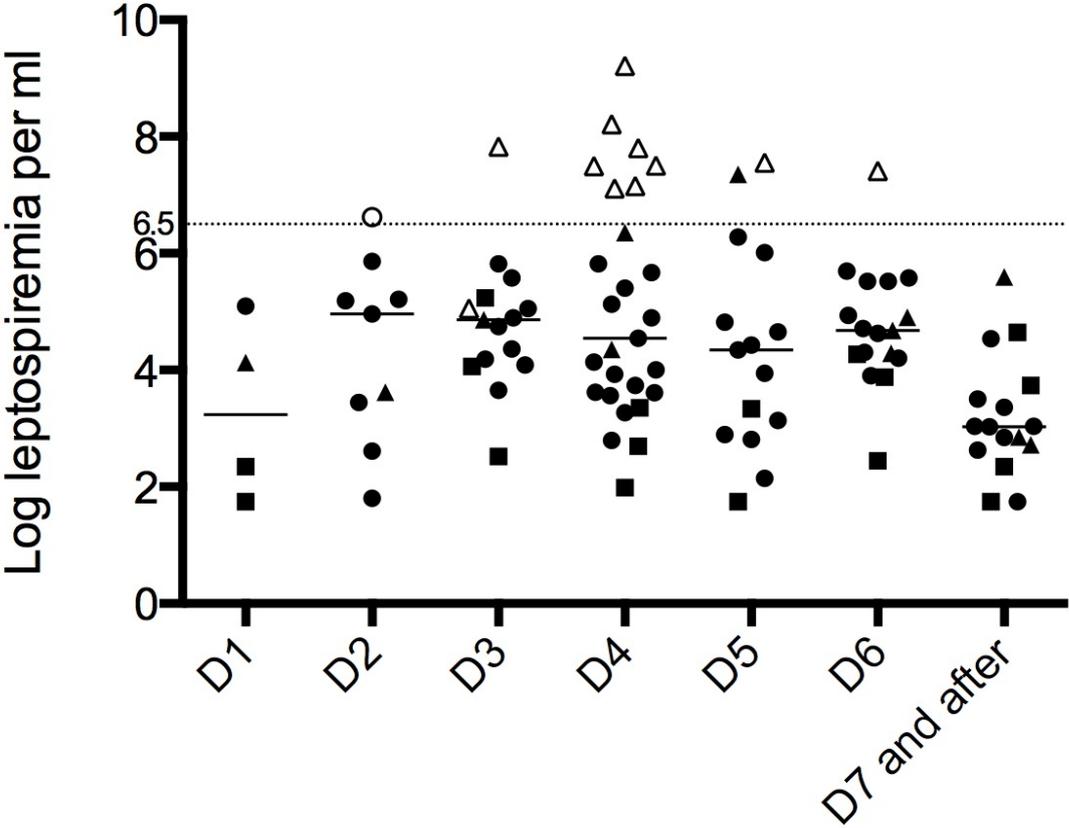
1. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):296-326.

2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. Apr;17(4):494-501.
3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757-71.
4. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Jr., Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet*. 1999 Sep 4;354(9181):820-5.
5. McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Oct;18(5):376-86.
6. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*. 2009 Sep;9(5):760-8.
7. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Oct;7(10):736-47.
8. Organisation WH. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003.
9. Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol Lett*. 2001 Nov 13;204(2):317-21.
10. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, et al. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis*. 2005 Feb 1;40(3):343-51.
11. Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefevre P, Gourinat AC, et al. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis*. Jan;7(1):e1991.
12. Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, et al. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis*. Mar;7(3):e2114.
13. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Aug 1;249(1):139-47.

14. Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, et al. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Euro Surveill.*18(18):20472.
15. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992 Sep;30(9):2219-24.
16. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Perolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol.* 2000 Jun;151(5):333-41.
17. Bourhy P, Collet L, Clement S, Huerre M, Ave P, Giry C, et al. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis.*4(6):e724.
18. Herrmann-Storck C, Saint-Louis M, Foucand T, Lamaury I, Deloumeaux J, Baranton G, et al. Severe leptospirosis in hospitalized patients, Guadeloupe. *Emerg Infect Dis.* 2010 Feb;16(2):331-4.
19. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Thinkamrop B. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. *Int J Infect Dis.* 2002 Mar;6(1):52-9.
20. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis.* 1995 Jul;172(1):281-5.
21. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005 Jan;54(Pt 1):45-9.
22. Hochedez P, Rosine J, Theodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, et al. Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr;84(4):621-6.
23. Darton T, Guiver M, Naylor S, Jack DL, Kaczmarek EB, Borrow R, et al. Severity of meningococcal disease associated with genomic bacterial load. *Clin Infect Dis.* 2009 Mar 1;48(5):587-94.
24. Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in sri lanka. *Clin Infect Dis.* May;54(9):1249-55.

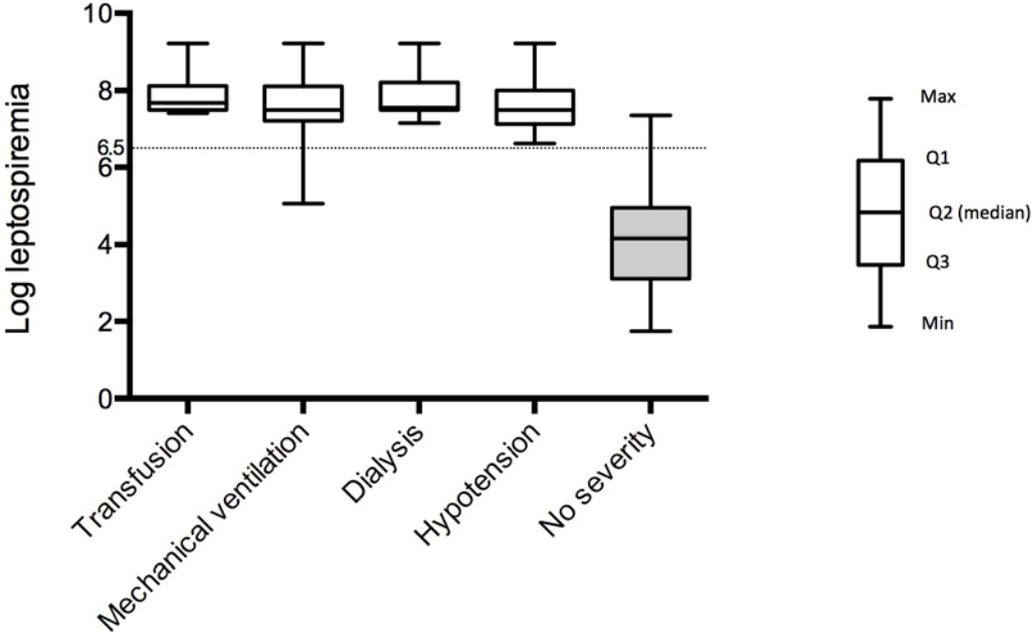
25. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* Jun;49(6):2154-60.
26. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003 Feb 15;36(4):447-52.
27. Agampodi SB, Moreno AC, Vinetz JM, Matthias MA. Utility and Limitations of Direct Multi-Locus Sequence Typing on qPCR-Positive Blood to Determine Infecting *Leptospira* Strain. *Am J Trop Med Hyg.* Dec 3.
28. Desvars A, Cardinale E, Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol Infect.* Feb;139(2):167-88.
29. Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clin Infect Dis.* 2001 Dec 1;33(11):1834-41.
30. Mailloux M, Lambert R, Chenu M. Résultats de la vaccination humaine contre la leptospirose ictérohémorragique dans la région parisienne. *Bull AcadNatl Med.* 1982;166:1151-60.

**Figure 1.** Leptospiremia in 102 confirmed cases of qPCR-confirmed leptospirosis and the day of sample since the occurrence of symptoms in Martinique, 2010-2013.



Each dot (triangle, circle or square) represents the leptospiremia of one leptospirosis case at the day when the sample was made. D1: first day of symptom onset. Severe cases are represented in white-coloured figures, non-severe cases are represented in black-coloured figures. Triangle corresponds to *Leptospira interrogans* species. Circle corresponds to other identified species, and square corresponds to cases without genomic identification. The line represents the threshold for severe diseases determined by Roc curve analysis.

**Figure 2.** Distribution of leptospiremia among 102 qPCR-confirmed cases of leptospirosis, grouped by severity criteria \* in Martinique, 2010-2013.



\*Criteria that met our clinical definition for severe leptospirosis: shock treated with vasoactive drugs, acute renal failure requiring dialysis, internal bleeding requiring blood transfusion (e.g, alveolar haemorrhage), and respiratory insufficiency requiring mechanical ventilation or death during hospitalization.

**Table 1. Complications in 102 confirmed cases of leptospirosis and their associated leptospiremia in Martinique, 2010-2013.**

Complications	Cases n (%) Leptospiremia (log10/ml)	Controls n (%) Leptospiremia (log10/ml)	P value
Icteric leptospirosis	40 (39%) 4.88 (3.91-6.86)	62 (61%) 4.13 (3.14-4.90)	0.0035
Acute renal failure	28 (27%) 4.77 (3.55-7.28)	74 (73%) 4.25 (3.34-5.09)	0.09
Multi organ failure	24 (23%) 5.55 (4.07-7.49)	78 (77%) 4.16 (3.34-4.96)	0.0052
Arterial hypotension	22 (21%) 6.10 (4.55-7.50)	80 (79%) 4.13 (3.20-4.93)	0.0002
Internal haemorrhage	11 (11%) 7.50 (3.88-7.82)	91 (89%) 4.29 (3.34-5.09)	0.0023
Shock treated with vasoactive drugs *	9 (9%) 7.49 (7.15-7.80)	93 (91%) 4.21 (3.27-5.05)	< 0.0001
Respiratory insufficiency requiring mechanical ventilation*	8 (8%) 7.49 (7.28-8)	94 (92%) 4.24 (3.27-5.09)	< 0.0001
Alveolar haemorrhage	8 (8%) 7.53 (7.45-8.01)	94 (92%) 4.28 (3.27-5.09)	0.0001
Internal bleeding requiring blood transfusion*	8 (8%) 7.68 (7.5-8.02)	94 (92%) 4.24 (3.27-5.05)	< 0.0001
Acute renal failure requiring dialysis*	7 (7%) 7.56 (7.49-8.21)	95 (93%) 4.27 (3.27-5.09)	< 0.0001
Altered mental status	4 (4%) 7.49 (7.06-7.86)	98 (96%) 4.29 (3.34-5.19)	0.002

\*Complications that met our clinical definition for severe leptospirosis

**Table 2. Clinical characteristics as a function of severity among 102 patients with qPCR confirmed leptospirosis in Martinique, 2010-2013.**

Characteristics	All cases N=102	Cases with severe disease N=12	Cases with non- severe disease N=90	P value
Fever (> 38°C)	88 (86.3)	9 (75)	79 (87.8)	0.364
Hypotension SBP < 90 mm Hg	10 (9.8)	5 (41.7)	5 (5.6)	0.002
Cough	12 (11.8)	3 (25)	9 (10)	0.148
Abnormalities at chest auscultation	7 (6.9)	4 (33.3)	3 (3.3)	0.003
Abdominal pain	30 (29.4)	5 (41.7)	25 (27.8)	0.329
Vomiting	42 (41.2)	5 (41.7)	37 (41.1)	1
Diarrhea	30 (29.4)	3 (25)	27 (30)	1
Icterus	39 (38.2)	9 (75)	30 (33.3)	0.009
Conjunctival suffusion	20 (19.61)	1 (8.3)	19 (21.1)	0.45
Consciousness disorders	2 (1.96)	1 (8.3)	1 (1.1)	0.2
Hemorrhage*	6 (5.9)	1 (8.3)	5 (5.6)	0.54
Oliguria** or anuria	8 (7.84)	5 (41.7)	3 (3.3)	0.0001

\*hemoptysis, hematuria, bleeding of the gums, and hematemesis

\*\*urinary volume < 500 mL/ day

**Table 3. Initial laboratory findings as a function of severity among 102 patients with qPCR confirmed leptospirosis in Martinique, 2010-2013.**

Initial laboratory findings	All cases N=102 n/N (%)	Cases with severe disease N=12 n/N (%)	Cases with non-severe disease N=90 n/N (%)	P value
Bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	20 (12-49)	56.5 (35.5-103)	18 (12-38)	0.0035
Bilirubin* >49	25/99 (25.2%)	7/12 (58.3%)	18/87 (20.7%)	0.01
Creatinine ( $\mu\text{mol/l}$ )	104 (88-154)	169.5 (132.5-217.5)	100 (87-137)	0.0084
Creat>154	26/101 (25.7%)	7/12 (58.3%)	19/89 (21.3%)	0.011
Urea nitrogen ( $\text{mmo/l}$ )	5.7 (4.2-9.3)	10.1 (8-18.5)	5.5 (4-8.6)	0.0068
Urea > 9.3	21/84 (25%)	4/8 (50%)	17/76 (22.4%)	0.103
CPK (U/l)	170 (70-443)	953 (204-1332)	145 (64-390)	0.0202
CPK>443	19/75 (25.3%)	5/9 (55.6%)	14/66 (21.2%)	0.041
CRP ( $\text{mg/l}$ )	188.5 (108-282)	338.5 (197.5-464.5)	177.9 (89-265)	0.0017
CRP>282	26/102 (25.5%)	7/12 (58.3%)	19/90 (21.1%)	0.011
Potassium ( $\text{mmol/l}$ )	3.7 (3.4-4.1)	3.75 (3.35-4.15)	3.7 (3.3-4.1)	0.8
Sodium ( $\text{mmo/l}$ )	134 (132-136)	134 (131.5-135)	134 (132-136)	0.44
AST (U/l)	61.5 (32-102)	73.5 (59-126.5)	57.5 (31-102)	0.19
ALT (U/l)	55 (30-96)	49 (33.5-74.5)	55 (30-99)	0.69
Hemoglobin ( $\text{g/dl}$ )	13.2 (12.2-14.5)	12.2 (11.6-13)	13.3 (12.4-14.7)	0.027
	26/102 (25.5%)	6/12 (50%)	20/90 (22.2%)	0.071

Hb < 12.2				
Leucocytes (G/l)	8.51 (6.2-10.9)	10.3 (9.1-11.4)	7.8 (6.1-10.5)	0.07
Lymphocytes (G/l)	0.7 (0.49-1)	0.5 (0.2-0.7)	0.7 (0.5-1)	0.043
			(n=78)	
Lympho.<0.49	24/92 (26%)	4/8 (50%)	20/84 (23.8%)	0.19
Platelet count (G/l)	138 (92-183)	70.5 (32.5-115)	141 (99-191)	0.0011
Platelet <92	26/101 (25.7%)	7/12 (58.3%)	19/89 (21.3%)	0.011
Prothrombin time (%)	74 (68-90.5)	66.5 (56-74.5)	75.5 (69-91)	0.0166
	20/76 (26.3%)	7/12 (58.3%)	13/64 (20.3%)	0.011
TP < 68				

\*Hematological and biochemical variables were categorized into two groups using Q1 or Q3 value as appropriate

**Table 4. Genomic identification based on 16S rRNA sequencing of PCR products, and the relative leptospiremia in confirmed cases of leptospirosis in Martinique, 2010-2013.**

Species	All cases N=102	Cases with severe disease N=12 no (%)	Leptospiremia log10/ml median (p25-p75)
<i>L. interrogans</i> *	23	11 (48)	6.35 (4.35-7.50)
<i>L. santarosai</i>	22	0	4.39 (3.62-4.94)
<i>L. borgpetersenii</i>	18	1(6)	4.11 (2.85-5.21)
<i>L. kirschneri</i>	15	0	4.81 (3.90-5.58)
<i>L. kmetyi</i>	4	0	3.26 (2.41-4.02)
<i>L. noguchii</i>	3	0	4.21 (3.27-5.13)
Unidentified**	17	0	2.69 (2.34-3.88)

\*Compared with other species, *L. interrogans* was associated with highest level of leptospiremia (P=0.0001).

\*\* Leptospiremia of specimens without species identification was significantly lower (P=0.0001)

## 4. SYNTHÈSE ET DISCUSSION

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale avec une incidence plus forte dans les régions tropicales comme aux Antilles où les conditions sont favorables à une transmission à l'homme tout au long de l'année, particulièrement pendant les périodes de fortes pluviosités. Les activités extérieures (agriculture, élevage, activités en eau douce) sont favorisées tout au long de l'année du fait du climat chaud, et plus souvent sans protection pour les mêmes raisons. Compte tenu de la diversité du réservoir animal observé en milieu tropical et à la survie prolongée des leptospires dans l'environnement, les circonstances conduisant à un contact direct ou indirect avec des animaux domestiques ou sauvages sont multiples et chacun peut être potentiellement exposé au cours de sa vie. De la pratique clinique émerge plusieurs problématiques de santé publique : quels sont les facteurs de risques de leptospirose, quels sont les facteurs pronostiques de la maladie, et quelle est l'incidence réelle de la leptospirose aux Antilles. L'objectif de ce travail était de contribuer à répondre à ces questions à travers l'utilisation précoce de la biologie moléculaire pour favoriser le diagnostic, l'analyse des facteurs de risque de leptospirose chez des sportifs exposés en milieu tropical et l'analyse des facteurs de risque de forme sévère dans une cohorte de patients diagnostiqués par RT-PCR.

### 4.1 Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques

La survenue de cas groupés de leptospirose après une compétition de trail et après des exercices de canyoning, les 2 événements s'étant déroulés après des périodes de pluies inhabituelles, nous a permis de rapporter pour la première fois aux Antilles ce type de contamination lors d'activités de loisir et d'identifier la présence d'abrasions cutanées comme facteur de risque de l'infection (*QS Illustration des sites de trail et de canyoning en ANNEXE 7.2*). Le recours au diagnostic par RT-PCR a permis dans les 2 cas de confirmer rapidement le diagnostic de leptospirose, d'informer l'ensemble des participants de leur exposition potentielle et de la conduite à tenir en cas de fièvre, et de mettre en place une enquête épidémiologique. La connaissance rapide du diagnostic, en particulier chez les pratiquants de canyoning, a aussi conduit à la prescription très précoce d'antibiotique pour les cas confirmés et les cas symptomatiques en attente de confirmation diagnostique. Ces travaux

nous ont conduit à promouvoir l'information systématique des participants à ces compétitions en plein air sur le risque de leptospirose et les moyens de prévention (protection vestimentaire en particulier), spécialement après des périodes de pluies inhabituelles ou d'inondations. Cette information est depuis donnée régulièrement avant les grands regroupements sportifs, sous la responsabilité de l'Agence Régionale de Santé et des flyers sont distribués individuellement à l'occasion de la remise des dossards (**QS *Fiches d'informations destinées aux pratiquants des sports à risque de leptospirose en ANNEXE 7.3***).

L'engouement croissant pour les loisirs aquatiques et les compétitions sportives en milieu tropical, qui s'accompagnent de regroupement important de participants, créent des conditions favorables à la contamination par les leptospires. Des cas groupés ont ainsi été rapportés, essentiellement en région tropicale, après la pratique de loisirs aquatiques comme la natation, le rafting ou les raids multisport (CDC 1997; Morgan 2002; Sejvar 2003; Stern 2010). Suite à ces événements, le principal facteur de risque identifié était l'ingestion d'eau d'un lac ou d'une rivière (Morgan 2002; Sejvar 2003; Stern 2010). En dehors du contexte sportif, l'ingestion d'eau d'un puits contaminé ou la présence de plaies cutanées chez les personnes ayant nettoyé un étang ont été identifiés comme des facteurs de risque de contamination dans des épidémies en Italie, à Okinawa et en Thaïlande (Cacciapuoti 1987; Corwin 1990; Phraisuwan 2002). Pour les cas survenus après la course dans la forêt martiniquaise, il semble que la présence d'abrasions cutanée ait facilité la pénétration des leptospires lors de contact avec la boue ou les nombreuses rivières traversées. Pour les cas survenus après le canyoning, l'inoculation a pu survenir par voie muqueuse à l'occasion d'ingestion accidentelle d'eau de rivière ou par voie cutanée à l'occasion d'abrasions cutanées.

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de leptospires dans l'eau de rivière. La mise en évidence des leptospires dans les eaux de surface grâce à des techniques de RT-PCR a été rapporté dans des environnements divers comme des marais de la région lyonnaise, des caniveaux et flaques d'eau en Amazonie, ou plus récemment dans des barrages d'eau et sources de montagne sur l'île de St Kits dans la Caraïbe (Ganoza 2006; Vein 2012; Rawlins 2014). A ce jour, les enquêtes environnementales (PCR ou culture) ont échoué dans les suites de compétitions sportives américaines marquées par des cas groupés de leptospirose (Morgan 2002; Stern 2010). Ces échecs peuvent être liés à l'absence de bactérie au moment du prélèvement, à leur présence en dessous du seuil de détection, ou à la présence d'inhibiteurs dans l'eau recueillie.

## 4.2 Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs pronostiques

La mise en place de cette étude de cohorte prospective nous a permis de montrer l'intérêt potentiel de ces techniques de biologie moléculaire pour obtenir un diagnostic précoce et une évaluation de la sévérité à la phase aigüe de la maladie en milieu de soins dans une région d'endémie. Nos critères de définition de la sévérité basés sur le type de traitement plutôt que sur le type de complications ou d'hospitalisation avait pour but de refléter la prise en charge habituelle des patients comme cela avait été rapporté dans 2 études récentes en Guadeloupe et en Nouvelle Calédonie (Herrmann-Storck 2010; Tubiana 2013). L'absence de décès dans notre étude peut résulter de plusieurs facteurs combinés : un diagnostic et un traitement antibiotique précoce par rapport au début de la maladie, une prise en charge rapide en réanimation, ou d'autres facteurs non pris en considération comme la pathogénicité propre des souches infectantes ou les facteurs d'hôte.

Dans notre étude, nous avons montré une association forte entre le niveau de leptospirémie et la sévérité et défini qu'un seuil critique de  $6.5 \log_{10}$  (leptospores/ml) pouvait être considéré pour la sévérité de la maladie en Martinique. Le lien entre leptospirémie élevée et gravité a été pour la première fois rapportée par Mérien en Nouvelle Calédonie sur une série de 12 patients (Merien 2005). Dans une étude réalisée au Pérou chez 7 patients présentant une atteinte pulmonaire sévère au cours de la leptospirose, les auteurs ont mis en évidence une leptospirémie supérieure à  $10^4$ /ml de sang ou par milligramme de tissu (à l'autopsie) (Segura 2005). Dans une autre étude rétrospective réalisée au Sri Lanka, les leptospirémies étaient plus basses chez les patients non compliquées mais sans différence significative, probablement du fait du faible effectif des formes réellement sévères (Agampodi). Enfin, dans une étude rétrospective en Nouvelle Calédonie sur 176 cas, l'association entre leptospirémie élevée et sévérité était rapportée et un seuil de  $10^3$  leptospores/ml était associé à la sévérité (Tubiana 2013). Nos différences de seuils critiques pourraient s'expliquer par des différences dans les sérovars, des facteurs d'hôtes, des différences de technique ou de timing de prélèvement.

Les résultats nous permettent aussi de rapporter l'association entre l'espèce *Leptospira interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae/Copenhageni et la sévérité de la maladie en Martinique. Il est notable de préciser que dans notre étude l'identification génomique a été fait plus souvent à partir des prélèvements utilisés pour la RT-PCR sans recours systématique à la

culture, technique de référence mais qui est longue et difficile. Contrairement à la détermination de la leptospirémie, l'identification génomique nécessite des étapes supplémentaires (envoi des extraits au CNR) et ne peut être utilisée pour évaluer la sévérité en pratique courante. Cependant, comme cela a été rapporté dans notre travail et dans d'autres publications, l'analyse de la courbe de fusion de la PCR (Figure 17) permet de distinguer l'espèce *L. interrogans* des autres espèces et la détermination de la température de fusion (Tm) pourrait donc donner des informations en temps réel sur la souche infectante et son caractère pathogène potentiel (Merien 2005; Bourhy 2011).

Dans cette étude le sérotype Icterohaemorrhagiae, le sérovar Icterohaemorrhagiae /Copenhageni, et la présence de rats au domicile (hôtes habituels de ce sérotype) étaient significativement associés à la gravité. L'association entre la sévérité et le sérotype Icterohaemorrhagiae, déjà rapportée sur d'autres îles tropicales, confirme l'importance des mesures de contrôle des populations de rongeurs (Katz 2002; Herrmann-Storck 2010; Tubiana 2013). Par ailleurs, le vaccin disponible en France (qui contient uniquement le sérovar Icterohaemorrhagiae), actuellement utilisé en milieu professionnel, devrait être évalué plus largement chez les personnes exposées régulièrement aux rongeurs en zone d'endémie.

Le nombre relativement faible de patients sévères dans notre étude ne nous a pas permis de déterminer si le haut niveau de leptospirémie et l'identification de *L. interrogans* étaient des facteurs indépendants associés à la gravité. La physiopathologie de la leptospirose n'est que partiellement comprise et nos résultats s'ajoutent à un tableau complexe. Des études ultérieures, réalisées dans d'autres populations et d'autres régions, devraient explorer si les hauts niveaux de leptospirémie sont liés à des facteurs comme la virulence de la souche, l'inoculum au moment de l'exposition, ou bien des liens à l'hôte.

Ce travail nous a aussi permis de déterminer quels critères cliniques et biologiques recueillis à l'admission du patient étaient associés à la sévérité. Nous avons identifié 4 critères cliniques de gravité qui peuvent être utilisés dès l'admission pour mieux orienter la prise en charge d'un patient chez qui une leptospirose est suspectée ou confirmée: l'hypotension, les anomalies auscultatoires, l'ictère, l'oligo- anurie. Les différents critères biologiques identifiés peuvent servir à conforter l'évaluation initiale de la gravité. Il est fondamental de dépister tôt ces critères cliniques de gravité car la mortalité au cours de la leptospirose est surtout liée au type d'atteinte viscérale (en particulier les atteintes rénales et pulmonaires) et donc à la précocité d'une prise en charge réanimatoire spécifique (Panaphut 2002; Tantitanawat 2003; Paganin 2007; Spichler 2008; Herrmann-Storck 2010).

### **4.3 Apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude de l'incidence**

L'utilisation du diagnostic par biologie moléculaire contribue à une meilleure estimation de l'incidence de la leptospirose aux Antilles. La leptospirose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France et les données sur l'incidence de la leptospirose en métropole comme dans les Départements d'Outre-Mer sont mise à jour par le CNR de la leptospirose à Pasteur (CNRL) et reposent essentiellement sur les résultats des sérologies (MAT) et les identifications des cultures adressées par les laboratoires publics et privés. La sous-estimation du nombre de cas est largement dépendante des difficultés diagnostiques et de l'absence d'un système de surveillance épidémiologique adapté. Concernant l'Outre-Mer, la Nouvelle Calédonie est une exception puisque la leptospirose est une maladie à déclaration obligatoire.

En 2011, une étude d'incidence a été mise en place par la CIRE Antilles-Guyane et l'INVS, en coopération avec le CNRL afin d'établir une estimation plus exacte de l'importance de l'endémie aux Antilles et apporter des arguments scientifiques pour faciliter l'inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale les différents examens nécessaires au diagnostic de la leptospirose (Cassadou 2013). Pour la période 2002-2008, l'incidence en Martinique et en Guadeloupe était de 13,9 et 22,5 respectivement (taux annuel moyen/100 000 habitants) contre 0,47 en métropole. Pour l'année 2011, en cumulant les données de source hospitalière et ambulatoire, l'incidence était estimée à près de 61 cas pour 100 000 habitants en Martinique et 70 cas pour 100 000 habitants en Guadeloupe ; soit une incidence trois à quatre fois supérieure, conduisant à un écart d'autant plus important avec l'incidence observée en métropole sur la période de référence (Cassadou 2013). Pour la Martinique, la PCR en temps réel était le test ayant permis la confirmation des cas dans 80% et on notait qu'un deuxième prélèvement était peu réalisé. En dehors des possibles variations annuelles d'incidence liées aux conditions météorologiques (forte pluviosité en 2011), ces résultats montrent que le recours au diagnostic par biologie moléculaire et par ELISA IgM, permet d'objectiver un nombre de cas très supérieur à celui comptabilisé antérieurement, sans le recours à ces tests. Il est difficile de mettre les résultats de cette étude en perspective avec les données d'autres îles tropicales où les cas ambulatoires ne sont pas toujours comptabilisés

et où le diagnostic par PCR n'est pas utilisé. Ainsi à Hawaii sur la période 1999-2008, la moyenne des incidences annuelles n'était que de 1,63 pour 100 000 habitants, mais la confirmation d'un cas nécessitait 2 sérologies et la PCR n'était pas utilisée pour le diagnostic (Katz 2011). A contrario en Nouvelle Calédonie, territoire pionnier pour la mise au point et l'utilisation du diagnostic par PCR, et où la maladie est à déclaration obligatoire, l'incidence rapportée par l'Institut Pasteur était de 23 cas/100 000 en 2013 (Picardeau 2013).

Finally, the results of the study of incidence of leptospirosis in the Antilles, which underline the contribution of the diagnostic by RT-PCR in a better evaluation of the incidence, are in agreement with the recommendations published by the HAS in June 2011. In effect, one can read that the PCR in real time and the test ELISA IgM (this latter must be confirmed by the MAT) find their place in the diagnostic strategy of leptospirosis, respectively for the first week of the disease and at the immune phase (HAS 2011). Following the publication in the Official Journal of August 14, 2014, the Ministry of Social Affairs and Health decided to modify the list of acts and services taken in charge by the health insurance for the diagnostic of leptospirosis. It is thus noted that the detection of the DNA of the genus *Leptospira* by real time genetic amplification in the blood will be privileged in the first ten days (B100) and that in the case of real time genetic amplification not available, negative or not adapted to the period, it is necessary to undertake a serological search starting from the seventh day (Research of IgM of *Leptospira* by EIA ; B40).

## 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La leptospirose est une préoccupation majeure de santé publique en raison de sa distribution mondiale, de son poids sur la santé humaine et animale en zone rurale, du risque d'épidémies, des taux de mortalité potentiellement élevés sans traitement, et de son émergence chez les populations les plus défavorisées des zones urbaines. Le réchauffement climatique et l'apparition plus fréquente de phénomènes climatiques extrêmes comme les inondations, devrait encore aggraver dans l'avenir l'impact de cette pathologie chez les personnes les plus vulnérables. A côté des expositions rurales et urbaines, l'engouement pour les loisirs en eau douce expose un nombre croissant de pratiquant au risque de contamination lors de leur pratique sportive.

Pour mettre au point des mesures de santé publique efficace, il est nécessaire de connaître l'incidence de la maladie et de disposer d'outils diagnostics fiables afin de proposer des traitements effectifs et une prévention adaptée à chaque zone géographique. Comme on l'a vu dans nos travaux, la PCR quantitative est une méthode de diagnostic rapide utilisable en pratique courante en zone d'endémie de leptospirose, et qui permet aussi de donner des informations sur l'évaluation de la gravité. A ce jour, seul le recours à la PCR permet un diagnostic de certitude sur un seul prélèvement, à la phase aigüe de la maladie, quand le traitement antibiotique a le plus de chance d'être efficace, et avant que les résultats des sérologies ou de la culture soient disponibles. Si l'identification génomique requiert des centres d'expertises, les méthodes diagnostiques par biologie moléculaire deviennent plus accessibles comme en témoigne les publications toujours plus nombreuses dans les pays tropicaux.

L'utilisation du diagnostic par biologie moléculaire nous a permis de contribuer à l'étude des facteurs de risque et des facteurs pronostiques, mais aussi à mieux connaître le poids réel de la maladie aux Antilles. Notre travail a conduit à promouvoir l'information systématique des participants à ces compétitions en plein air sur le risque de leptospirose et les moyens de prévention, spécialement après des périodes de pluies inhabituelles ou d'inondations. En pratique clinique, la mortalité au cours de la leptospirose étant directement liée au type d'atteinte viscérale et à la précocité du traitement, l'identification de critères de gravité clinico-biologiques présents à l'admission peut être utilisée pour raccourcir le délai de prise en charge dans les services de réanimation.

Dans la continuité de l'étude de cohorte visant à identifier les facteurs clinique et biologiques associés à la gravité, nous avons mis au point un protocole de recherche clinique intitulé « Etude de la cinétique de décroissance de la leptospirémie au cours du traitement antibiotique de la leptospirose en Martinique » (acronyme Ciné Lepto), qui a obtenu le financement de l'Appel à Projet Interrégional DOMien 2013 (***QS résumé du protocole de recherche clinique CinéLepto en ANNEXE 7.3***). L'objectif principal de l'étude est d'étudier l'évolution de la concentration des leptospires dans le sang chez des patients diagnostiqués par PCR dans les premiers jours de la maladie et traités par antibiotique. L'objectif secondaire est d'identifier les facteurs associés à la persistance d'une leptospirémie détectable après une semaine de traitement. Ce protocole de recherche clinique pourrait contribuer à la réflexion sur le raccourcissement des durées de traitement. Si les résultats de l'étude montrent une décroissance rapide des leptospires dans le sang sous antibiotique, cela appuierait la mise en place d'un essai comparant une durée habituelle de 7 jours à une durée plus courte qui pourrait être 3 jours (durée nécessaire pour récupérer les résultats des bilans microbiologiques).

Dans le cadre de l'étude intitulée « Étude de la valeur pronostique de la leptospirémie quantitative déterminée par PCR en temps réel au cours de la leptospirose aux Antilles » (***QS résumé du protocole de recherche clinique LEPTO en ANNEXE 7.1***), nous avons réalisé une collection d'échantillons biologiques afin de réaliser des études complémentaires sur la susceptibilité individuelle à l'infection (polymorphismes génétiques, génotypage HLA...) comme cela a été suggéré dans plusieurs études (Lingappa 2004; Fialho 2009). Compte tenu de la complexité des techniques utilisées et la nécessité d'avoir un grand d'échantillon pour détecter un marqueur de susceptibilité, nous avons décidé de ne pas exploiter cette collection pour l'instant de la poursuivre dans le cadre des inclusions de l'étude CinéLepto. La collection sera idéalement utilisée dans le cadre d'une étude comparant différents marqueurs de susceptibilité potentiels chez nos patients comparés à des témoins. Un des objectifs de l'étude d'incidence réalisée en 2011 était de s'inscrire dans la perspective de la mise en place d'un système intégré articulant surveillance, alerte et gestion à l'image du dispositif existant pour la dengue aux Antilles et en Guyane. Le but étant de détecter d'éventuels foyers de la maladie ou des recrudescences saisonnières pouvant conduire à des actions ciblées des ARS (zones à éviter, dératisation), et à faciliter l'information des praticiens pour prendre en compte les différents niveaux de risque (saisonnier, géographique). Les outils de diagnostics ont été mis en place chez l'homme et pourront contribuer à la surveillance de la maladie humaine mais il reste à mettre en place une surveillance animale et environnementale. Nous souhaitons

poursuivre la mise au point des techniques de recherche de leptospires dans l'environnement afin d'être capable d'identifier la source d'une contamination lors d'une enquête épidémiologique. Enfin, les sites les plus fréquentés pour des activités de loisir en eau douce (rivière, bassins), pourraient faire l'objet d'une surveillance régulière conduisant à autoriser ou non la pratique des sports aquatiques en fonction du niveau de contamination des eaux de surfaces.

## 6. ARTICLES ET POSTERS ECRITS PENDANT LA THESE

### 6.1 Publications liées au travail de thèse sur la leptospirose

#### 6.1.1 Articles

- **Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique.** Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, Quénel P, Cabié A. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Apr;84(4):621-6.
- **Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011.** Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, Théodose R, Bourhy P, Picardeau M, Olive C, Ledrans M, Cabie A. *Euro Surveill.* 2013 May 2;18(18):20472.
- **Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies.** Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini , Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114.
- **Severe leptospirosis is associated with high levels of leptospiremia and *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in Martinique.** Patrick Hochedez, Rafaelle Theodose, Claude Olive, Pascale Bourhy, Guillaume Hurtrel, Nicolas Vignier, Hossein Mehdaoui, Ruddy Valentino, Roland Martinez, Jean-Marie Delord , Cécile Herrmann, Isabelle Lamaury, Raymond Césaire, Mathieu Picardeau, André Cabié. *[Manuscrit soumis au journal Emerging Infectious Diseases le 28/06/2014]*

#### 6.1.2 Posters présentés en congrès

- Cas groupés de Leptospirose après un raid sportif aux Antilles. *Journées Nationales d'Infectiologie- Montpellier 2011.*
- Cas groupés de Leptospirose après la pratique de canyoning en Martinique. Intérêt du diagnostic par PCR. *Journées Nationales d'Infectiologie- Tours 2012.*

### **6.1.3 Rapport d'évaluation technologique. Diagnostic biologique de la leptospirose**

- Participation comme expert au groupe de travail à distance sur le diagnostic biologique de la leptospirose. Haute Autorité de Santé – Juin 2011.

### **6.1.4 Etude sur l'incidence de la leptospirose aux Antilles**

- Institut de Veille Sanitaire - Incidence de la leptospirose aux Antilles. Etude du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre 2011. Participation à l'étude comme référent clinicien en Martinique (Cassadou 2013).

### **6.1.5 Chapitres de livres**

- Chapitre « Leptospirose » du livre **Médecine Tropicale - 6<sup>o</sup> édition** (M. Gentilini et coll.). Médecine Sciences – Publications. Editions Lavoisier, Paris, 2012.
- Chapitre « Leptospirose » de l'EMC : P. Bourhy, P. Hochedez, M. Picardeau. Leptospirose. EMC - Maladies infectieuses 2012;9(1):1-12

## **6.2 Publications non liées au travail de thèse**

- Clinical and microbiologic characteristics of children treated at the Fort de France university hospital after the 2010 Haiti earthquake. Arquès I, Vincent M, Olive C, Cabié A, Canivet I, Hochedez P. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 May;32(5):568-9
- Human infection with *Shewanella putrefaciens* and *S. algae*: report of 16 cases in Martinique and review of the literature. Vignier N, Barreau M, Olive C, Baubion E, Théodose R, Hochedez P, Cabié A. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Jul;89(1):151-6

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- Abdulkader, R. C., E. F. Daher, et al. (2002). "Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **44**(2): 79-83.
- Abdulkader, R. C., A. C. Seguro, et al. (1996). "Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis." Am J Trop Med Hyg **54**(1): 1-6.
- Abela-Ridder, B., R. Sikkema, et al. (2010). "Estimating the burden of human leptospirosis." Int J Antimicrob Agents **36 Suppl 1**: S5-7.
- Agampodi, S. B., A. C. Moreno, et al. (2012). "Utility and Limitations of Direct Multi-Locus Sequence Typing on qPCR-Positive Blood to Determine Infecting *Leptospira* Strain." Am J Trop Med Hyg.
- Ahmed, N., S. M. Devi, et al. (2006). "Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species." Ann Clin Microbiol Antimicrob **5**: 28.
- Amato, M. B., C. S. Barbas, et al. (1998). "Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome." N Engl J Med **338**(6): 347-54.
- Andrade, L., E. de Francesco Daher, et al. (2008). "Leptospiral nephropathy." Semin Nephrol **28**(4): 383-94.
- Antoniadis, A., S. Alexiou-Daniel, et al. (1995). "Comparison of the clinical and serologic diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis." Eur J Epidemiol **11**(1): 91-2.
- Ashford, D. A., R. M. Kaiser, et al. (2000). "Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua." Am J Trop Med Hyg **63**(5-6): 249-54.
- Baranton, G. and D. Postic (2006). "Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003." Int J Infect Dis **10**(2): 162-70.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, et al. (2003). "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance." Lancet Infect Dis **3**(12): 757-71.
- Bourhy, P., S. Bremont, et al. (2011). "Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences." J Clin Microbiol **49**(6): 2154-60.
- Bourhy, P., L. Collet, et al. (2014). "*Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans." Int J Syst Evol Microbiol.
- Bourhy, P., C. Herrmann Storck, et al. (2013). "Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies." PLoS Negl Trop Dis **7**(3): e2114.
- Bourhy, P., P. Hochedez, et al. (2012). "Leptospirose." Encyclopédie Médico Chirurgicale **9**(1): 1-12.
- Bovet, P., C. Yersin, et al. (1999). "Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean)." Int J Epidemiol **28**(3): 583-90.
- Brett-Major, D. M. and R. J. Lipnick (2009). "Antibiotic prophylaxis for leptospirosis." Cochrane Database Syst Rev(3): CD007342.
- Bulach, D. M., R. L. Zuerner, et al. (2006). "Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14560-5.
- Cacciapuoti, B., L. Ciceroni, et al. (1987). "A waterborne outbreak of leptospirosis." Am J Epidemiol **126**(3): 535-45.

- Cassadou, S., J. Rosine, et al. (2013). "Incidence de la leptospirose aux Antilles. Etude du 1er janvier au 31 décembre 2011."
- CDC (1997). "From the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996." *JAMA* **278**(10): 808-9.
- Cerqueira, G. M. and M. Picardeau (2009). "A century of *Leptospira* strain typing." *Infect Genet Evol* **9**(5): 760-8.
- Chusri, S., E. B. McNeil, et al. (2014). "Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: A non-randomized controlled trial." *J Infect Chemother*.
- Corwin, A., A. Ryan, et al. (1990). "A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan." *Int J Epidemiol* **19**(3): 743-8.
- Coursin, D. B., S. J. Updike, et al. (2000). "Massive rhabdomyolysis and multiple organ dysfunction syndrome caused by leptospirosis." *Intensive Care Med* **26**(6): 808-12.
- Cullen, P. A., D. A. Haake, et al. (2003). "LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species." *Infect Immun* **71**(5): 2414-21.
- Cumberland, P., C. O. Everard, et al. (2001). "Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989." *Eur J Epidemiol* **17**(7): 601-8.
- Daher, E., D. M. Zanetta, et al. (1999). "Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure." *Am J Trop Med Hyg* **61**(4): 630-4.
- de Brito, T., C. F. Morais, et al. (1987). "Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen." *Ann Trop Med Parasitol* **81**(3): 207-14.
- de la Pena-Moctezuma, A., D. M. Bulach, et al. (1999). "Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis." *FEMS Microbiol Lett* **177**(2): 319-26.
- de Vries, S. G., B. J. Visser, et al. (2014). "Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review." *Int J Infect Dis* **28C**: 47-64.
- Dechet, A. M., M. Parsons, et al. (2012). "Leptospirosis outbreak following severe flooding: a rapid assessment and mass prophylaxis campaign; Guyana, January-February 2005." *PLoS One* **7**(7): e39672.
- Desvars, A., E. Cardinale, et al. (2010). "Animal leptospirosis in small tropical areas." *Epidemiol Infect* **139**(2): 167-88.
- Desvars, A., S. Jégo, et al. (2011). "Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data." *PLoS ONE* **6**(5): e20377.
- Dupont, H., D. Dupont-Perdrizet, et al. (1997). "Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality." *Clin Infect Dis* **25**(3): 720-4.
- Edwards, C. N., G. D. Nicholson, et al. (1986). "Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation." *Am J Trop Med Hyg* **35**(2): 352-4.
- Edwards, C. N., G. D. Nicholson, et al. (1988). "Penicillin therapy in icteric leptospirosis." *Am J Trop Med Hyg* **39**(4): 388-90.
- Ellinghausen, H. C., Jr. and W. G. McCullough (1965). "Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80." *Am J Vet Res* **26**: 45-51.
- Esen, S., M. Sunbul, et al. (2004). "Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis." *Swiss Med Wkly* **134**(23-24): 347-52.

- Everard, C. O., C. N. Edwards, et al. (1984). "The prevalence of severe leptospirosis among humans on Barbados." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(5): 596-603.
- Faine, S., B. Adler, et al. (1999). "Leptospira and Leptospirosis. ." Second Edition. MediSci, Melbourne, Australia.
- Felzemburgh, R. D., G. S. Ribeiro, et al. (2014). "Prospective study of leptospirosis transmission in an urban slum community: role of poor environment in repeated exposures to the Leptospira agent." PLoS Negl Trop Dis **8**(5): e2927.
- Fialho, R. N., L. Martins, et al. (2009). "Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis." Hum Immunol **70**(11): 915-20.
- Flannery, B., M. M. Pereira, et al. (2001). "Referral pattern of leptospirosis cases during a large urban epidemic of dengue." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 657-63.
- Forwell, M. A., P. J. Redding, et al. (1984). "Leptospirosis complicated by fatal intracerebral haemorrhage." Br Med J (Clin Res Ed) **289**(6458): 1583.
- Friedland, J. S. and D. A. Warrell (1991). "The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: possible pathogenesis and review." Rev Infect Dis **13**(2): 207-10.
- Galloway, R. L. and P. N. Levett (2010). "Application and validation of PFGE for serovar identification of Leptospira clinical isolates." PLoS Negl Trop Dis **4**(9).
- Ganoza, C. A., M. A. Matthias, et al. (2006). "Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic Leptospira." PLoS Med **3**(8): e308.
- Ganoza, C. A., M. A. Matthias, et al. (2010). "Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by Leptospira." PLoS Negl Trop Dis **4**(2): e612.
- Gonsalez, C. R., J. Casseb, et al. (1998). "Use of doxycycline for leptospirosis after high-risk exposure in Sao Paulo, Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **40**(1): 59-61.
- Gouveia, E. L., J. Metcalfe, et al. (2008). "Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil." Emerg Infect Dis **14**(3): 505-8.
- Haake, D. A., M. Dundoo, et al. (2002). "Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis." Clin Infect Dis **34**(9): e40-3.
- HAS (2011). "Diagnostic Biologique de la Leptospirose." Haute Autorité de Santé.(Ce rapport d'évaluation est téléchargeable sur [www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)).
- Herrmann-Storck, C., A. Brioude, et al. (2005). "Retrospective review of leptospirosis in Guadeloupe, French West Indies 1994-2001." West Indian Med J **54**(1): 42-6.
- Herrmann-Storck, C., M. Saint-Louis, et al. (2010). "Severe leptospirosis in hospitalized patients, Guadeloupe." Emerg Infect Dis **16**(2): 331-4.
- Herrmann, J. L., E. Bellenger, et al. (1992). "Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification." J Clin Microbiol **30**(7): 1696-702.
- Hotez, P. J., M. E. Bottazzi, et al. (2008). "The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination." PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e300.
- Janaud, L. (2007). "Diagnostic de la leptospirose par PCR en temps réel au centre hospitalier de Fort de France. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine. "
- Johnson, M. A., H. Smith, et al. (2004). "Environmental exposure and leptospirosis, Peru." Emerg Infect Dis **10**(6): 1016-22.
- Johnson, R. C. and V. G. Harris (1967). "Differentiation of pathogenic and saprophytic letospires. I. Growth at low temperatures." J Bacteriol **94**(1): 27-31.

- Katz, A. R., V. E. Ansdell, et al. (2001). "Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998." Clin Infect Dis **33**(11): 1834-41.
- Katz, A. R., V. E. Ansdell, et al. (2002). "Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases." Am J Trop Med Hyg **66**(1): 61-70.
- Katz, A. R., A. E. Buchholz, et al. (2011). "Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999-2008." Emerg Infect Dis **17**(2): 221-6.
- Katz, A. R., P. V. Effler, et al. (2003). "Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii, 1979-1998." Trop Med Int Health **8**(7): 639-42.
- Katz, A. R., D. M. Sasaki, et al. (1997). "Leptospirosis on Oahu: an outbreak among military personnel associated with recreational exposure." Mil Med **162**(2): 101-4.
- Ko, A. I., M. Galvao Reis, et al. (1999). "Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group." Lancet **354**(9181): 820-5.
- Ko, A. I., C. Goarant, et al. (2009). "Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen." Nat Rev Microbiol **7**(10): 736-47.
- Kusum, M., N. Boonsarthorn, et al. (2005). "Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in northeastern region, Thailand." J Med Assoc Thai **88**(8): 1098-102.
- LaRocque, R. C., R. F. Breiman, et al. (2005). "Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh." Emerg Infect Dis **11**(5): 766-9.
- Lau, C. L., L. D. Smythe, et al. (2010). "Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire?" Trans R Soc Trop Med Hyg **104**(10): 631-8.
- Lessa, I. and E. Cortes (1981). "Cerebrovascular accident as a complication of leptospirosis." Lancet **2**(8255): 1113.
- Levett, P. and L. Smythe (2006). "International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Leptospiraceae*" Int J Syst Evol Microbiol **56**: 2019-20.
- Levett, P. N. (2001). "Leptospirosis." Clin Microbiol Rev **14**(2): 296-326.
- Levett, P. N. (2003). "Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis." Clin Infect Dis **36**(4): 447-52.
- Lingappa, J., T. Kuffner, et al. (2004). "HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis." Genes Immun **5**(3): 197-202.
- Mailloux, M., R. Lambert, et al. (1982). "Résultats de la vaccination humaine contre la leptospire ictérohémorragique dans la région parisienne." Bull AcadNatl Med **166**: 1151-1160.
- Mailloux, M., R. Lambert, et al. (1983). "La vaccination humaine contre la leptospire ictéro-hémorragique." Med Hyg **41**: 1025-30.
- Majed, Z., E. Bellenger, et al. (2005). "Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*." J Clin Microbiol **43**(2): 539-45.
- Marotto, P. C., C. M. Nascimento, et al. (1999). "Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality." Clin Infect Dis **29**(6): 1561-3.
- Martin, L., A. Pettit, et al. (1918). "Séro-diagnostic de la spirochaetose ictérohaemorrhagique." Bull Mem Soc Med Hop Paris **42**: 672-5.
- McBride, A. J., D. A. Athanzio, et al. (2005). "Leptospirosis." Curr Opin Infect Dis **18**(5): 376-86.
- McClain, J. B., W. R. Ballou, et al. (1984). "Doxycycline therapy for leptospirosis." Ann Intern Med **100**(5): 696-8.

- McMichael, A. J., R. E. Woodruff, et al. (2006). "Climate change and human health: present and future risks." Lancet **367**(9513): 859-69.
- Merien, F., P. Amouriaux, et al. (1992). "Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples." J Clin Microbiol **30**(9): 2219-24.
- Merien, F., D. Portnoi, et al. (2005). "A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis." FEMS Microbiol Lett **249**(1): 139-47.
- Ministère des Affaires sociales et de la Santé, s. l. a. d. H. C. d. l. s. p. (2013). "Vaccination contre la leptospirose." Calendrier vaccinal et recommandations vaccinales 2013: 17.
- Monsuez, J. J., R. Kidouche, et al. (1997). "Leptospirosis presenting as haemorrhagic fever in visitor to Africa." Lancet **349**(9047): 254-5.
- Morgan, A. G. and F. Cawich (1980). "Ascending polyneuropathy in leptospirosis--a case study." Ann Trop Med Parasitol **74**(5): 567-8.
- Morgan, J., S. L. Bornstein, et al. (2002). "Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998." Clin Infect Dis **34**(12): 1593-9.
- Nally, J. E., C. Chantranuwat, et al. (2004). "Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis." Am J Pathol **164**(3): 1115-27.
- Nally, J. E., E. Chow, et al. (2005). "Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections." Infect Immun **73**(6): 3251-60.
- Nardone, A., I. Capek, et al. (2004). "Risk factors for leptospirosis in metropolitan France: results of a national case-control study, 1999-2000." Clin Infect Dis **39**(5): 751-3.
- Nascimento, A. L., A. I. Ko, et al. (2004). "Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis." J Bacteriol **186**(7): 2164-72.
- Network., T. A. R. D. S. (2000). "Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network." N Engl J Med **342**(18): 1301-8.
- O'Neil, K. M., L. S. Rickman, et al. (1991). "Pulmonary manifestations of leptospirosis." Rev Infect Dis **13**(4): 705-9.
- Paganin, F., A. Bourdin, et al. (2009). "[Pulmonary manifestations of leptospirosis]." Rev Mal Respir **26**(9): 971-9.
- Paganin, F., A. Bourdin, et al. (2007). "Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases." Intensive Care Med **33**(11): 1959-66.
- Palaniappan, R. U., Y. F. Chang, et al. (2002). "Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*." Infect Immun **70**(11): 5924-30.
- Panaphut, T., S. Domrongkitchaiporn, et al. (2002). "Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand." Int J Infect Dis **6**(1): 52-9.
- Panaphut, T., S. Domrongkitchaiporn, et al. (2003). "Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis." Clin Infect Dis **36**(12): 1507-13.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, et al. (2008). "The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends." Int J Infect Dis **12**(4): 351-7.
- Park, S. K., S. H. Lee, et al. (1989). "Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients." Am J Trop Med Hyg **41**(3): 345-51.
- Perrocheau, A. and P. Perolat (1997). "Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey." Eur J Epidemiol **13**(2): 161-7.

- Phraisuwan, P., E. A. Whitney, et al. (2002). "Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999." *Emerg Infect Dis* **8**(12): 1455-9.
- Picardeau, M. (2013). "Diagnosis and epidemiology of leptospirosis." *Med Mal Infect* **43**(1): 1-9.
- Picardeau, M. and P. Bourhy (2012). "Centre National de Référence de la Leptospire. Rapport Annuel d'Activité." (Disponible à partir de l'URL: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-ccoms-des-leptospire/actualites-rapports>).
- Picardeau, M. and P. Bourhy (2013). "Centre National de Référence de la Leptospire. Rapport Annuel d'Activité." (Disponible à partir de l'URL: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-ccoms-des-leptospire/actualites-rapports>).
- Picardeau, M., D. M. Bulach, et al. (2008). "Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis." *PLoS ONE* **3**(2): e1607.
- Picardeau, M., M. Cornet, et al. (2008). "Impact du changement de nomenclature médicale sur le diag-nostic et la surveillance de la leptospire en France." *Bull Epidemiol Hebd* **37**: 329-31.
- Postic, D., F. Mérien, et al. (2000). "Diagnostic biologique Leptospire-Borréliose de Lyme. paris: Institut Pasteur."
- Rajiv, C., R. J. Manjuran, et al. (1996). "Cardiovascular involvement in leptospirosis." *Indian Heart J* **48**(6): 691-4.
- Ramachandran, S. and M. V. Perera (1977). "Cardiac and pulmonary involvement in leptospirosis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **71**(1): 56-9.
- Rathnam, S. R. (2005). "Ocular manifestations of leptospirosis." *J Postgrad Med* **51**(3): 189-94.
- Rathnam, S. R., S. Rathnam, et al. (1997). "Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis." *Am J Ophthalmol* **124**(1): 71-9.
- Rawlins, J., A. Portanova, et al. (2014). "Molecular detection of leptospiral DNA in environmental water on St. Kitts." *Int J Environ Res Public Health* **11**(8): 7953-60.
- Reis, R. B., G. S. Ribeiro, et al. (2008). "Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums." *PLoS Negl Trop Dis* **2**(4): e228.
- Ren, S. X., G. Fu, et al. (2003). "Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing." *Nature* **422**(6934): 888-93.
- Ricaldi, J. N., M. A. Swancutt, et al. (2013). "Current trends in translational research in leptospirosis." *Curr Opin Infect Dis* **26**(5): 399-403.
- Riley, L. W., A. I. Ko, et al. (2007). "Slum health: diseases of neglected populations." *BMC Int Health Hum Rights* **7**: 2.
- Ristow, P., P. Bourhy, et al. (2008). "Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospire." *Microbiology* **154**(Pt 5): 1309-17.
- Rodrigo, C., N. Lakshitha de Silva, et al. (2014). "High dose corticosteroids in severe leptospirosis: a systematic review." *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
- Rojas, P., A. M. Monahan, et al. (2010). "Detection and quantification of leptospire in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**(10): 1305-9.
- Saint Girons, I., D. Margarita, et al. (1990). "First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*." *Res Microbiol* **141**(9): 1131-8.

- Salaun, L., F. Merien, et al. (2006). "Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis." J Clin Microbiol **44**(11): 3954-62.
- Salkade, H. P., S. Divate, et al. (2005). "A study of sutopsy findings in 62 cases of leptospirosis in a metropolitan city in India." J Postgrad Med **51**(3): 169-73.
- Sarkar, U., S. F. Nascimento, et al. (2002). "Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic." Am J Trop Med Hyg **66**(5): 605-10.
- Segura, E. R., C. A. Ganoza, et al. (2005). "Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden." Clin Infect Dis **40**(3): 343-51.
- Seguro, A. C., A. V. Lomar, et al. (1990). "Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms." Nephron **55**(2): 146-51.
- Sehgal, S. C., A. P. Sugunan, et al. (2000). "Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area." Int J Antimicrob Agents **13**(4): 249-55.
- Sejvar, J., E. Bancroft, et al. (2003). "Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000." Emerg Infect Dis **9**(6): 702-7.
- Smythe, L. D., V. Wuthiekanun, et al. (2009). "The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand." Am J Trop Med Hyg **81**(4): 695-7.
- Spichler, A. S., P. J. Vilaca, et al. (2008). "Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil." Am J Trop Med Hyg **79**(6): 911-4.
- Stern, E. J., R. Galloway, et al. (2010). "Outbreak of Leptospirosis among Adventure Race Participants in Florida, 2005." Clin Infect Dis **50**(6): 843-9.
- Stoddard, R. A., J. E. Gee, et al. (2009). "Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene." Diagn Microbiol Infect Dis **64**(3): 247-55.
- Storck, C. H., D. Postic, et al. (2008). "Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003--2004, a two El Nino Southern Oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies." Epidemiol Infect **136**(10): 1407-15.
- Suputtamongkol, Y., K. Niwattayakul, et al. (2004). "An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis." Clin Infect Dis **39**(10): 1417-24.
- Takafuji, E. T., J. W. Kirkpatrick, et al. (1984). "An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis." N Engl J Med **310**(8): 497-500.
- Tantitanawat, S. and S. Tanjatham (2003). "Prognostic factors associated with severe leptospirosis." J Med Assoc Thai **86**(10): 925-31.
- Trevejo, R. T., J. G. Rigau-Perez, et al. (1998). "Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995." J Infect Dis **178**(5): 1457-63.
- Trombert-Paolantoni, S., P. Thomas, et al. (2009). "Leptospirosis screening: performance of the Serion Elisa Classic *Leptospira* IgM KIT." Pathol Biol (Paris) **58**(1): 95-9.
- Trueba, G., S. Zapata, et al. (2004). "Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water." Int Microbiol **7**(1): 35-40.
- Tubiana, S., M. Mikulski, et al. (2013). "Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia." PLoS Negl Trop Dis **7**(1): e1991.
- Vein, J., A. Perrin, et al. (2012). "Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water." Can J Microbiol **58**(7): 828-35.

- Vinetz, J. M. (2003). "A mountain out of a molehill: do we treat acute leptospirosis, and if so, with what?" *Clin Infect Dis* **36**(12): 1514-5.
- Watt, G., L. P. Padre, et al. (1988). "Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis." *Lancet* **1**(8583): 433-5.
- Weinberger, D., N. Baroux, et al. (2014). "El Nino Southern Oscillation and leptospirosis outbreaks in New Caledonia." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(4): e2798.
- WHO (1999). "Leptospirosis worldwide, 1999." *Wkly Epidemiol Rec* **74**(29): 237-42.
- WHO (2003). "Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control."
- WHO (2011). "Leptospirosis: an emerging public health problem." *Wkly Epidemiol Rec* **86**(6): 45-50.
- Yersin, C., P. Bovet, et al. (2000). "Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**(1): 71-6.
- Yersin, C., P. Bovet, et al. (1998). "Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study." *Am J Trop Med Hyg* **59**(6): 933-40.
- Zaki, S. R. and W. J. Shieh (1996). "Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua." *Lancet* **347**(9000): 535-6.

## 8. ANNEXES

### 8.1 Résumé du Protocole de Recherche Clinique LEPTO

Titre de la recherche

**Étude de la valeur pronostique de la leptospirémie quantitative déterminée par PCR en temps réel au cours de la leptospirose aux Antilles**

Titre abrégé : Étude RT-PCR Leptospirose aux Antilles

Acronyme de la Recherche : **LEPTO**

Code promoteur : 10/B/13

Numéro ID RCB : 2010-A00999-30 Ref Afssaps : B101170-20

#### **PROTOCOLE DE RECHERCHE CLINIQUE**

Version n°5.0 du 26/11/2013 – amendement 4.0

A reçu un avis favorable pour sa mise en œuvre du CPP Sud Ouest et Outre Mer III le 27/10/2010, pour son amendement 1.0 le 27/04/2011, pour son amendement 2.0 le 31/10/2012, pour son amendement 3.0 le 27/03/2013 et pour son amendement 4.0 le 18/12/2013

A reçu une autorisation de réalisation de l'AFSSAPS le 12 octobre 2010, pour son amendement 1.0 le 14/06/2011 et pour son amendement 4.0 le 04/02/2014

Cette recherche clinique a obtenu le financement de l'Appel à Projet Local Martinique du conseil scientifique du CHU de Martinique en date du 9 septembre 2010 et du PHRC2011-Appel à projets Interrégionaux en date du 03/02/2011.

**Promoteur**

CHU de Martinique  
CS 90632, 97261  
Fort-de-France cedex

**Centre de Méthodologie et de Gestion des données :**

Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique  
Antilles-Guyane (Inserm CIE 802)

**Investigateur coordonnateur**

Dr Patrick Hochedez  
Service des Maladies Infectieuses  
et Tropicales  
CHU de Martinique  
CS 90632, 97261 Fort-de-France cedex

**Unité de vigilance de la recherche clinique :**

Centre Régional de Pharmacovigilance (CRPV) de Bordeaux  
Hôpital Pellegrin  
33076 Bordeaux cedex  
[françoise.haramburu@u-bordeaux2.fr](mailto:françoise.haramburu@u-bordeaux2.fr)  
[g.hada.mircmont@u-bordeaux2.fr](mailto:g.hada.mircmont@u-bordeaux2.fr)  
[anne.gimbert@u-bordeaux2.fr](mailto:anne.gimbert@u-bordeaux2.fr)  
Tél : 05.57.57.15.61 Fax : 05.57.57.46.60

**Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 1.0 du 03/09/2008 du protocole-type de la DIRC Sud-Ouest Outre-Mer**

CIC-EC Antilles-Guyane

## 1 Résumé de la recherche

Promoteur	CHU de Martinique
Investigateur coordonnateur	Dr Patrick Hochedez Service des Maladies Infectieuses et Tropicales CHU de Martinique CS 90632, 97261 Fort-de-France cedex
Titre	Étude de la valeur pronostique de la leptospirémie quantitative déterminée par PCR en temps réel au cours de la leptospirose aux Antilles
Numéro d'identification	Code Promoteur : 10/B/13 Numéro d'enregistrement dans Clinicaltrials.gov : NCT01607047 Numéro ID RCB : 2010- A00999-30
Version du protocole	Version n°5.0 du 26/11/2013 – amendement 4
Justification / contexte	<p>La leptospirose évolue sur un mode endémique aux Antilles françaises et son incidence en 2008 était de 15.6/100 000 habitants, soit 27 fois plus que celui de la France métropolitaine (incidence 0.56). Si des cas peuvent survenir toute l'année, les périodes de fortes précipitations comme celles observées pendant la saison des pluies sont associées à la survenue de pics épidémiques.</p> <p>La symptomatologie de la leptospirose est caractérisée par un polymorphisme important : la présentation clinique la plus fréquente est la forme anictérique pseudo-grippale mais des présentations plus sévères sont décrites comme les méningites, les uvéites et surtout les hémorragies pulmonaires et l'atteinte hépato-rénale (syndrome de Weil) qui constituent les formes les plus sévères de la maladie.</p> <p>Sur le plan biologique, l'examen diagnostique de référence est le test de microagglutination (MAT) qui nécessite l'envoi des échantillons au CNR de la Leptospirose à l'Institut Pasteur de Paris. Bien qu'indispensable pour obtenir un diagnostic d'espèce, ce test ne permet pas de répondre à l'attente des cliniciens à la phase précoce de la maladie, car les anticorps n'apparaissent pas avant la deuxième semaine de la maladie et un deuxième prélèvement est nécessaire à 15 jours d'intervalle pour conclure définitivement. De même, si la culture</p>

a un rôle épidémiologique fondamental et permet d'augmenter la sensibilité du MAT en incluant de nouvelles souches identifiées aux antigènes déjà employés, elle ne peut être utilisée comme test de diagnostic rapide.

A l'heure actuelle, la PCR est le seul test permettant un diagnostic précoce de la leptospirose avec de très bonnes sensibilité et spécificité. Dans la pratique clinique, la technique de PCR en temps réel permet la détection et la quantification des leptospires pathogènes pendant la première semaine de la maladie.

La présentation clinique de la leptospirose étant très polymorphe, le diagnostic de certitude chez un patient pris en charge pour un syndrome fébrile doit reposer sur des tests biologiques rapides et spécifiques, particulièrement en zone tropicale où les diagnostics différentiels sont nombreux (dengue, paludisme ...).

La technique de diagnostic de Leptospirose par PCR en temps réel a été mise en place et testée en 2007 au CHU de Martinique puis mise à disposition des cliniciens à partir de 2008. L'évaluation initiale de la technique sur des échantillons de sérum provenant de patients cliniquement suspects de leptospirose a montré sa plus grande sensibilité comparée au test de microagglutination (MAT) et à la culture, dans la phase précoce de la maladie.

Cette technique demande à être évaluée prospectivement dans la pratique clinique; elle devrait permettre de raccourcir le délai de prise en charge des patients fébriles suspect de leptospirose par un diagnostic plus précoce.

Par ailleurs, la description clinique et biologique de la leptospirose ne permet d'appréhender qu'une partie de l'impact de la maladie sur l'individu; la perception de la maladie par les patients, l'absentéisme professionnel, la durée du syndrome de fatigue post-infectieux constitue autant de facteurs participant à la gravité « sociale » de la leptospirose. Une évaluation de la qualité de vie est prévue pour apprécier le retentissement de la maladie.

Le choix de la Martinique et de la Guadeloupe comme sites de l'étude est d'abord justifié sur un plan épidémiologique par le caractère endémique de la maladie aux Antilles françaises. Une enquête réalisée en juin 2000 par la CIRE Antilles-Guyane avait ainsi classé la leptospirose en 2<sup>o</sup> position (juste après la dengue) dans les maladies infectieuses prioritaires selon les médecins interrogés. Enfin l'UF Bactériologie Hygiène en collaboration avec le service de virologie-Immunologie du CHU de Martinique possède une compétence et une expertise ancienne dans les techniques d'amplification génique ;

	d'abord pour les virus VIH, HTLV-1 et la dengue puis plus récemment pour la leptospirose.
Objectifs	<p><b>1. Objectif principal</b></p> <p>Déterminer si la leptospirémie quantitative prélevée au moment du diagnostic précoce de leptospirose par PCR est prédictive d'une évolution sévère de la maladie (défaillance viscérale, hémorragie interne, décès).</p> <p><b>2. Objectifs secondaires</b></p> <p>1) Décrire les caractéristiques cliniques, biologiques et bactériologiques associées à, ou prédictives de la survenue d'une évolution sévère de la leptospirose (défaillance viscérale, hémorragie interne, décès) dans une cohorte d'adultes atteints de leptospirose confirmée par PCR en milieu hospitalier.</p> <p>2) Décrire les caractéristiques cliniques, biologiques et bactériologiques associées à, ou prédictives de la survenue d'une altération de la qualité de vie au-delà de la phase aiguë de la maladie chez les patients de la cohorte définie ci-dessus.</p> <p>3) Réalisation d'une DNAtèque</p> <p>Une collection d'échantillons biologiques humains sera réalisée sous forme de DNAtèque, avec pour objectif de permettre la réalisation d'études complémentaires de la susceptibilité individuelle à l'infection (polymorphismes génétiques, génotypage HLA...).</p> <p>4) Collection d'ADN de Leptospire</p> <p>Une DNAtèque de leptospire sera réalisée, avec pour objectif de permettre la réalisation d'études ultérieures sur la leptospirose.</p>
Schéma de la recherche	Recherche biomédicale, hors produits de santé, multicentrique ouverte et prospective avec données anonymisées associées.
Critères d'inclusion	<p>Adultes (plus de 18 ans)</p> <p>Recours à un des services hospitaliers participant à la recherche : en salle d'urgence, en hospitalisation complète, en hospitalisation de jour ou en consultation externe</p> <p>Diagnostic de leptospirose confirmé par PCR</p> <p>Possibilité de suivi durant toute la durée de l'étude (12 semaines).</p> <p>Patients affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale</p> <p>Acceptation de participer à l'étude et au suivi proposé, et signature du consentement éclairé signé par la personne ou par son représentant</p>

Critères de non-inclusion	<p>Test de PCR négatif</p> <p>Enfants de moins de 18 ans</p> <p>Pas de suivi possible après la première visite</p> <p>Refus de participation à l'étude</p> <p>Patients non affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.</p>
Déroulement de la recherche	<p>Dans le cadre de la prise en charge habituelle d'un patient suspect de leptospirose, un bilan bactériologique associant une PCR, une culture bactérienne et une première sérologie MAT est effectué. La visite d'inclusion aura lieu dès que le résultat positif de la PCR sera connu et la participation à l'étude sera proposée au patient. Si le patient accepte de participer à l'étude (signature du consentement éclairé) le prélèvement initial de PCR sera repris pour réalisation d'une PCR quantitative avec détermination de la leptospirémie. Un exemplaire du formulaire de consentement éclairé ainsi que la note d'information seront remis au patient. Un consentement spécifique pour la réalisation d'une collection d'échantillon biologique, le typage HLA et des analyses complémentaires est prévu.</p> <p>Le suivi de l'étude comporte trois périodes : la phase aiguë de la maladie (de J1 à J10), la phase de convalescence (entre J15 et J21), et la phase guérison (S12). L'inclusion se déroulera idéalement en phase aiguë, mais reste possible jusqu'à J21 afin de prendre en compte les patients pris initialement en réanimation sans possibilité de signature du consentement éclairé. Pour les deux premières périodes, les visites de l'étude se feront au cours des visites prévues par l'investigateur pour le suivi habituel du patient. Le calendrier proposé dans le cadre de l'étude est indicatif et correspond au recueil de données idéal, le plus approprié pour répondre aux objectifs de l'étude. Le recueil de données cliniques et biologiques est prévu aux deux premières phases de la maladie. Le remplissage d'un questionnaire de qualité de vie avec l'aide du patient est prévu au cours des 3 phases de la maladie. L'évolution est notée : simple, compliquée avec survie ou décès. A S12, il n'y a pas de visite prévue, mais un contact téléphonique pour le suivi évolutif et remplir le questionnaire de qualité de vie.</p>
Critères de jugement	<p><u>Critère principal :</u></p> <p>Évolution sévère de la leptospirose au cours du suivi (12 semaines suivant le début des symptômes) définie par la survenue d'une défaillance d'un ou plusieurs organes ou systèmes (encéphale, cœur, poumon, foie, rein, hémostasie), d'une hémorragie interne ou du décès</p>

	<p>du patient.</p> <p><u>Critères secondaires :</u></p> <p>Altération de la qualité de la vie mesurée par le questionnaire EuroQol® dans les 3 premières semaines d'évolution et 12 semaines après le début des symptômes de la leptospirose.</p> <p><u>Variables utilisées pour l'étude descriptive et dont on étudiera la valeur pronostique :</u></p> <p>Age, sexe, signes cliniques et biologiques, quantification de la leptospirémie et sérotype impliqué (Déterminé directement par culture ou indirectement par MAT).</p>
Taille d'étude	Il est prévu de recruter 150 patients sur 48 mois.
Nombre prévu de centres	<p>2 centres</p> <p>Recours à un des services hospitaliers participant à la recherche (Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France et Centre Hospitalier Universitaire de Pointe à Pitre/Abymes): en salle d'urgence, en hospitalisation complète, en hospitalisation de jour ou en consultation externe.</p>
Durée de la recherche	L'étude sera conduite sur une période de 48 mois consécutifs à compter de la date d'inclusion du premier patient.
Analyse statistique des données	Les data seront analysées avec le logiciel Stata® 10. Une analyse multivariée sera réalisée pour déterminer si une association indépendante peut être démontrée entre le taux de leptospires initial et l'évolution sévère de la maladie. Une analyse intermédiaire d'incidence descriptive sera réalisée après 50 patients.
Retombées attendues	En permettant d'améliorer les connaissances sur la leptospirose et ses formes graves aux Antilles, cette étude permettra d'affiner et améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des cas de Leptospirose. Cette étude permettra aussi d'approfondir les connaissances sur les facteurs d'exposition et l'écologie bactérienne aux Antilles. Ce travail est l'occasion de poursuivre une collaboration entre les services de Maladies Infectieuses et Tropicales, les laboratoires de microbiologie et les acteurs de recherche biomédicale des Antilles (CIC-EC, CIRE).

## 8.2 Illustration des sites de trail et de canyoning



Traversées de rivières lors de la course du 16 mai 2009



Site de Canyoning sur la rivière Absalon

### 8.3 Fiches d'informations destinées aux pratiquants des sports à risque de leptospirose (recto/verso)



**ars**  
Apprentissage de Santé  
Martinique

Vous pratiquez le canyoning, la baignade en eau douce, les raids sportifs, la pêche en rivière, les randonnées, le kayak en eau douce...

**PROTÉGEZ-VOUS CONTRE LA LEPTOSPIROSE**

**LA LEPTOSPIROSE ? QU'EST-CE QUE C'EST ?**

La leptospirose est une maladie transmise par une bactérie présente dans l'urine de nombreux animaux, notamment des rongeurs (rats, souris...).

**COMMENT ÇA S'ATTRAPE ?**

La contamination se fait par contact de la peau lésée (égratignures) ou des muqueuses avec l'eau douce ou la boue contaminées par l'urine des animaux infectés.

**QU'EST-CE QUE ÇA FAIT ?**

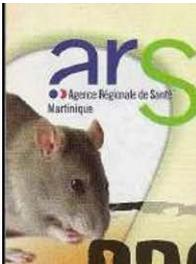
Les symptômes apparaissent 1 à 3 semaines après contamination (fièvre associée à au moins un des signes suivants : frissons, maux de tête, douleurs musculaires ou articulaires, conjonctivite, toux, diarrhée).

Si vous présentez ces symptômes dans le mois suivant l'activité  
**CONSULTEZ SANS DÉLAI VOTRE MÉDECIN TRAITANT**  
en lui précisant le risque auquel vous avez été exposé (leptospirose),  
ou **CONTACTEZ L'HÔPITAL DE LA MEYNARD**  
Service des maladies infectieuses - Châteauboeuf Fort-de-France - 0596 55 23 01

ars-martinique-promotion-sante-environnementale@ars.sante.fr  
0596 39 42 43

Logo de la République Française  
Logo de l'ARS Martinique  
Logo de la Communauté de Communes Fort-de-France

Logo de la Communauté de Communes Fort-de-France - Octobre 2011



Vous pratiquez le canyoning, la baignade en eau douce, les raids sportifs, la pêche en rivière, les randonnées, le kayak en eau douce...



# PROTÉGEZ-VOUS CONTRE LA LEPTOSPIROSE

## AVANT L'ACTIVITÉ

Évitez la pratique d'activités en contact avec l'eau douce après des épisodes de fortes pluies.

Prévoyez des protections adaptées (vêtements couvrant la peau, bottes, chaussures montantes, gants, lunettes de protection...).

Protégez vos plaies et égratignures avec des pansements imperméables.

## PENDANT L'ACTIVITÉ

Ne buvez pas l'eau de la rivière.

Évitez de cueillir et de manger des fruits non lavés à l'eau potable.

Évitez de mettre la tête sous l'eau.



## APRES L'ACTIVITÉ

Douchez-vous rapidement à l'eau potable.

Lavez abondamment les plaies à l'eau potable et au savon.

Désinfectez avec une solution antiseptique.

## 8. 4 Résumé du Protocole de Recherche Clinique Ciné LEPTO



### Titre de la recherche

## **Etude de la cinétique de décroissance de la leptospirémie au cours du traitement antibiotique de la leptospirose en Martinique**

Titre abrégé : Étude de la cinétique de la leptospirémie en Martinique

Acronyme de la Recherche : Ciné LEPTO

Code promoteur : 13/B/16

Numéro I D RCB : 2014-A01666-41

Numéro d'enregistrement dans Clinicaltrials.gov : NCT02000635

## **PROCOLE DE RECHERCHE CLINIQUE**

Version n°2.0 du 17/10/2014

A reçu un avis favorable pour sa mise en œuvre du CPP Sud Ouest et Outre Mer III le  
**JJ/MM/2013**

A reçu une autorisation de réalisation de l'ANSM le **JJ/MM/2013**

Cette recherche clinique a obtenu le financement de l'Appel à Projet Interrégional DOMien  
2013 en date du 19/06/2013

### Promoteur

CHU de Martinique  
Hôpital Pierre Zobda Quitman  
CS 90632 – 97261 Fort-de-France cedex

### Centre de Méthodologie et de Gestion des données :

Centre d'Investigation Clinique-Antilles-Guyane (CIC1424)

### Investigateur coordonnateur

Dr Patrick Hochedez  
Service des Maladies Infectieuses  
et Tropicales  
CHU de Martinique  
CS 90632  
97261 Fort-de-France cedex

### Unité de vigilance de la recherche clinique :

Unité de sécurité et de vigilance de la recherche clinique  
Anne Gimbert (pharmacien), Valérie Marty (ARC), Sandrine Vautrat (ARC)  
Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation-CHU de Bordeaux  
12 rue Dubernat  
33404 Talence cedex  
Tel : 05-57-82-08-34  
Fax : 05-57-82-12-62

**Ce protocole a été conçu et rédigé à partir de la version 1.0 du 03/09/2008 du protocole-  
type de la DIRC Sud-Ouest Outre-M**

## 1 Résumé de la recherche

Promoteur	CHU de Martinique CS 90632, 97261 Fort-de-France cedex
Investigateur coordonnateur	Dr Patrick Hochedez Service des Maladies Infectieuses et Tropicales CHU de Martinique CS 90632, 97261 Fort-de-France cedex
Titre	Etude de la cinétique de décroissance de la leptospirémie au cours du traitement antibiotique de la leptospirose en Martinique.
Numéro d'identification	Code Promoteur : 13/B/16 Numéro d'enregistrement dans Clinicaltrials.gov : <b>NCT02000635</b> Numéro ID RCB : 2014-A01666-41
Version du protocole	Version n°2.0 du 17/10/2014
Justification / contexte	<p>La leptospirose évolue sur un mode endémique aux Antilles françaises et en Martinique, son incidence en 2011 était de 61/100 000 habitants, soit plus de 100 fois celle de la France hexagonale (0,47/100 000). Si des cas peuvent survenir toute l'année, les périodes de fortes précipitations comme celles observées pendant la saison des pluies sont associées à la survenue de pics épidémiques.</p> <p>La symptomatologie de la leptospirose est caractérisée par un polymorphisme important : la présentation clinique la plus fréquente est la forme anictérique pseudo-grippale mais des présentations plus sévères sont décrites comme les méningites, les uvéites et surtout les hémorragies pulmonaires et l'atteinte hépato-rénale (syndrome de Weil) qui constituent les formes les plus sévères de la maladie.</p> <p>A l'heure actuelle, la PCR est le seul test qui permet une confirmation diagnostique au cours de la première semaine d'évolution, avant l'apparition des premiers anticorps.</p> <p>Si l'examen diagnostique de référence reste le test de microagglutination (MAT), il nécessite l'envoi des échantillons au CNR de la Leptospirose à l'Institut Pasteur de Paris et les anticorps n'apparaissent pas avant la deuxième semaine de la maladie. Un deuxième prélèvement est nécessaire à 15 jours d'intervalle pour conclure définitivement. De même, si la culture a un rôle épidémiologique fondamental et permet d'augmenter la sensibilité du MAT en incluant de nouvelles souches identifiées aux antigènes déjà employés, elle ne peut être utilisée comme test de diagnostic rapide.</p>

	<p>Dans la pratique clinique, la technique de PCR en temps réel permet la détection et la quantification des leptospires pathogènes pendant la première semaine de la maladie. La technique de diagnostic de leptospirose par PCR en temps réel a été mise en place et testée en 2007 au CHU de Martinique puis mise à disposition des cliniciens à partir de 2008. La durée optimale du traitement antibiotique n'a pas été étudiée et les experts s'accordent aujourd'hui pour recommander un traitement de 7 à 10 jours, quelle que soit la sévérité de la maladie. L'évolution de la leptospirémie chez les patients traités n'a pas été étudiée à ce jour.</p>
Objectifs	<p><b>1. Objectif principal</b> Etudier l'évolution de la concentration des leptospires dans le sang chez des patients diagnostiqués par PCR dans les premiers jours de la maladie et traités par antibiotique.</p> <p><b>2. Objectif secondaire</b> Identifier les facteurs associés à la persistance d'une leptospirémie détectable après une semaine de traitement.</p>
Schéma de la recherche	Recherche biomédicale, hors produits de santé, monocentrique ouverte et prospective avec données anonymisées associées.
Critères d'inclusion	<p>Adultes (18 ans et plus), Diagnostic de leptospirose confirmé par PCR dans les cinq premiers jours d'évolution, Patients hospitalisés dans un service hospitalier participant à la recherche (en salle d'urgence, hospitalisation complète), Patients affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale, Acceptation de participer à l'étude et au suivi proposé, et signature du consentement éclairé signé par la personne ou par son représentant.</p>
Critères de non-inclusion	<p>Test de PCR négatif Patients de moins de 18 ans Femme enceinte ou allaitant Pas de suivi possible après la première visite Refus de participation à l'étude Patients non affiliés ou bénéficiaires d'un régime de sécurité sociale.</p>
Déroulement de la recherche	<p>Dans le cadre de la prise en charge habituelle d'un patient suspect de leptospirose, un bilan bactériologique associant une PCR, une culture bactérienne et une première sérologie MAT est effectué.</p> <p>La visite d'inclusion aura lieu dès que le résultat positif de la PCR sera connu (2 séries au minimum sont réalisées chaque semaine). Si le</p>

	<p>patient accepte de participer à l'étude (signature du consentement éclairé) le prélèvement initial de PCR sera repris pour réalisation d'une PCR quantitative avec détermination de la leptospirémie. Les prélèvements de NFS réalisés dans le cadre de la prise en charge habituelle (et gardés une semaine par le laboratoire), seront repris si besoin pour réalisation des PCR précoce (H24 à H72). Pour chaque patient, 5 à 6 PCR quantitatives seront réalisés au cours du traitement : H0, H24, H48, H72 et J7. En cas de positivité à J7 de traitement, un prélèvement tardif sera réalisé autour de J14. Un exemplaire du formulaire de consentement éclairé ainsi que la note d'information seront remis au patient.</p> <p>Le recueil de données cliniques et biologiques est prévu lors de la première semaine et à la phase de convalescence. L'évolution est notée : simple, compliquée avec survie ou décès. Pour les deux périodes, les visites de l'étude se feront au cours des visites prévues par l'investigateur pour le suivi habituel du patient.</p>
Critères de jugement	Taux de leptospirémie négative à H24, H48, H72, J7 et autour de J14 à partir du début de l'antibiothérapie.
Taille d'étude	Il est prévu de recruter 50 patients sur 24 mois.
Nombre prévu de centres	<p>1 centre</p> <p>Recours à aux services prenant en charge des patients suspects de leptospirose (Centre Hospitalier Universitaire de Martinique : en salle d'urgence, en hospitalisation complète, en hospitalisation de jour ou en consultation externe.</p>
Durée de la recherche	L'étude sera conduite sur une période de 24 mois consécutifs à compter de la date d'inclusion du premier patient.
Analyse statistique des données	<p>Les data seront analysées avec le logiciel Stata® 13.</p> <p>Une analyse sera réalisée pour déterminer si une association peut être démontrée entre la persistance d'une leptospirémie détectable à la fin du traitement antibiotique et l'évolution de la maladie.</p>
Retombées attendues	La détermination des facteurs associés à la persistance d'une leptospirémie détectable après une semaine de traitement devrait permettre d'identifier les situations pour lesquelles une modulation (prolongation ou raccourcissement) de la durée de traitement peut être envisagée