



HAL
open science

Épidémiologie d'une zoonose, la leptospirose, dans deux îles de l'océan Indien, la Réunion et Mayotte - Etude comparée du rôle de différentes espèces sauvages et domestiques

Amélie Desvars

► To cite this version:

Amélie Desvars. Épidémiologie d'une zoonose, la leptospirose, dans deux îles de l'océan Indien, la Réunion et Mayotte - Etude comparée du rôle de différentes espèces sauvages et domestiques. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2012. Français. NNT : 2012LARE0039 . tel-04093720

HAL Id: tel-04093720

<https://theses.hal.science/tel-04093720v1>

Submitted on 10 May 2023

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.



Académie de La Réunion

THÈSE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Épidémiologie
École doctorale : Sciences Technologies Santé (ED 542)

ÉPIDÉMIOLOGIE D'UNE ZONOSE, LA LEPTOSPIROSE, DANS DEUX ÎLES DE L'OCÉAN INDIEN, LA RÉUNION ET MAYOTTE - ÉTUDE COMPARÉE DU RÔLE DE DIFFÉRENTES ESPÈCES SAUVAGES ET DOMESTIQUES -

Amélie DESVARS

Docteur en Médecine Vétérinaire
Diplômée en Parasitologie

Soutenue publiquement le 26 avril 2012, devant le Jury composé de :

Matthieu	LE CORRE	Professeur, Université de La Réunion	Président du Jury
Fahafahantsoa	RAPELANORO RABENJA	Professeur, Faculté de Médecine, Antananarivo	Rapporteur
Angéli	KODJO	Professeur, HDR, Vet AgroSup, Lyon	Rapporteur
Alain	MICHAULT	Docteur en Pharmacie, Biologiste, GHSR/CHR	Examineur
Koussay	DELLAGI	Professeur, IRD/CRVOI	Examineur
Eric	CARDINALE	Docteur en Sciences, HDR, CIRAD/CRVOI	Directeur de thèse

« La science a certes quelques magnifiques réussites à son actif mais à tout prendre, je préfère de loin être heureux plutôt qu'avoir raison. »

Douglas Adams (Le guide du routard galactique)

« These minute filamental organisms dart through the soft medium with great rapidity, first in one direction and then in another, searching for a loose spot which they can pierce through. When encountering an impenetrable obstacle they reverse their progression and start anew. A striking sight is thus presented by these little vermicular organisms darting in all directions. »

Hideyo Noguchi, 1918 [1]

« Quelqu'un qui fait sa thèse sur la syphilis finit même par aimer le spirochète pâle. »

Umberto Eco (Le Pendule de Foucault)

Remerciements

Un grand merci...

Une thèse ne pouvant se faire toute seule, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée et soutenue durant ces années et sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour...

En premier lieu, mes plus vifs remerciements s'adressent au Docteur Alain Michault, qui a su me faire confiance et sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Il m'a consciencieusement suivie tout au long de ce travail en laissant une grande latitude à mes initiatives personnelles.

Je tiens à remercier sincèrement Florence Naze, qui a contribué efficacement, patiemment, et plus que son temps ne le lui permettait, à ce travail. Qui m'a formée en biologie moléculaire (mission hautement périlleuse !), qui a partagé mes doutes, mes échecs (aïe !) et mes joies au laboratoire.

Un grand merci aussi à Cyrille Goarant, pour cette correspondance assidue... qui a répondu patiemment à toutes mes questions techniques, et moins techniques... Un très grand merci pour la relecture, les corrections et les suggestions constructives qui ont alimenté ce manuscrit.

Je remercie Eric Cardinale pour son encadrement.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Le Groupe Hospitalier Sud Réunion, qui m'a accueillie dans les locaux du Laboratoire de Parasitologie-Bactériologie-Virologie-Hygiène.

Un très grand merci à toute l'équipe du laboratoire: Mr Bertil, Géraldine, Jérôme, Olga, Catherine, Miguel, Ketty, Marie, Marianne, Jimmy, Audrey, Frédéric, Marie-Noëlle, Edwige, Antoine, Françoise, Bernard...pour m'avoir formée, aidée, rassurée, offert le café, et pour leur bonne humeur quotidienne.

J'ai eu la chance de croiser la route de deux internes d'exception... Henintsoa et Irène...que je remercie pour leur bonne humeur et leur contribution appliquée à ce travail... *Misaotra betsaka !*

Pour le terrain, merci à toute l'équipe de l'abattoir et de la DSV, Irène Sanchez et Sandrine Candat, les chasseurs de la Fédération de Chasse de La Réunion, Roselyne Baronce (il n'y aurait pas eu de prélèvements de tangles sans ta motivation !), Thomas Duval, Sarah Caceres, Ben Warren, Stéphane Roué, Sébastien Boyer, Eric & Bérangère Buffard, Thomas Hüe, sans oublier Jocelyne pour l'accueil chaleureux à chacun de mes passages et les bons dîners post-piégeage...

Un grand merci à Pascale Bourhy et Mathieu Picardeau, pour leur accueil en juin 2010 et tout le soutien qu'ils ont apporté à ce travail. Merci pour tous vos bons conseils.

Un grand merci à Nicolas Barré, Michel Pascal (*El Ratator*) et Thierry Baldet qui m'ont vraiment donné le goût de la recherche. Vous ne le savez pas, mais votre rencontre à tous les trois, à différents moments de ma vie, a été décisive pour mon orientation professionnelle. Merci Michel pour ta relecture du manuscrit entre deux missions à l'autre bout du monde !

Merci à Gwenaël Vourc'h, François Moutou, Virginie Michel, Vincent Porphyre, Guy Lempérière, Hélène Delatte, Olivier Pruvost, Nathalie Ah-You, Pierre Lefeuvre, Gilles Cellier, Bernard Reynaud, pour leur soutien (très) précieux et leur aide tout au long de cette thèse.

Merci aux statisticiens Frédéric Chiroleu, Sylvaine Jégo, et Aurore Benneveau, d'avoir pallié à mon manque d'"R"...

Merci à Henri Brouchoud et Yves Guillot pour leurs nombreux dépannages informatiques !

Je remercie le Pôle 3P et le Pôle Elevage pour le soutien logistique, le Laboratoire Vétérinaire Départemental pour le prêt de leur balance de précision, Sébastien Girard qui a réalisé la carte de Mayotte et Vincent Michault qui a corrigé l'anglais des articles publiés.

Merci à Annie, Sylvie et Farida pour leur aide lors de mon stage à l'Institut Pasteur.

Je remercie aussi tous les amis de La Réunion qui m'ont entourée pendant ces années de travail : Pascal & Gwen, Tom Tom, David, Fab, Miguel, Clotilde & Stéph, Tony, Fabien, Zordi, Magali, Daphné, Angéla & Céd.

Merci à tous les copains de l'escalade (ils se reconnaîtront !) et en particulier Petit Poulet, Gildas, Laure, Emeline, Sarah & Padrig, Anne & Eric, Olivier (le vieux), Olivier (le jeune), Dom, Père Samir, Cristina, Céline & Steven. Votre amitié m'a portée tout au long de ce travail.

Et rien n'aurait été possible sans ma "team moral" : Mélanie & Thierry, Tizan & Naomé, Hélène & Baptiste, Aline, Eric & Manuela, Nawel & Elijah, Marion & Julien. Pardon de vous avoir tant ennuyés avec cette leptospirose...j'le ferais plus...

Et sans oublier le Petit Monde d'Anna...qui m'a fait du bien toute cette dernière année...

Mille remerciements à Pierre, Mickaël et Jean-Sam qui m'ont maintenue à peu près debout toutes ces années, entre un semi raid et un bras cassé...

Grand merci à mes amis de longues dates, Agathe & Antoine, Céline & Maxime, Virginie & Romain, Audrey, Cédric, Sandra, Nathalie & Laurent, Cécile. Les kilomètres n'ont pas eu raison de notre amitié !

Merci à Isa, d'avoir partagé les plus mauvais et les meilleurs moments.

Merci à Olivier et Eliana d'être toujours là pour moi.

Merci à Dominique, Prune, Antoine et Eden. Pour leur soutien.

Merci à Anthony Cheke, qui m'a fait l'honneur de collaborer à la partie "Hypothèses sur les origines et la diversité des leptospires à La Réunion et à Mayotte par l'histoire du peuplement par les mammifères".

Pour le soutien financier qui a permis l'aboutissement de ce travail de doctorat, je voudrais remercier :

- La Région Réunion, qui m'a octroyé une bourse de thèse pour trois ans ;
- L'Association Réunionnaise de Recherche en Infectiologie (ARRI) ;
- Le CIRAD ;
- L'Institut Pasteur de Paris.

Je tiens à remercier ma famille (beaucoup beaucoup !), et en particulier :

Mes parents, pour leur amour et leur soutien.
Ma sœur et sa petite famille, qui grandit qui grandit...et qui me manque.
Mes grands-parents.

Merci aux chats...

Enfin, un grand merci à mon Doudou, qui a été d'une patience infinie, qui m'a épaulée, m'a ramenée sur terre bien souvent, qui a (presque) tout compris à la lepto et qui a partagé les hauts et les nombreux bas de la thèse. Voilà, c'est fini...

Love (vraiment).

Il paraît qu'il y a une vie après la thèse...

Résumé

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale dont les formes graves peuvent être mortelles pour l'Homme. Tous les mammifères sont susceptibles d'être réservoirs, la connaissance des hôtes réservoirs de *Leptospira* est essentielle à la mise en place de mesures de prévention. L'objectif de ce travail était de conduire une étude épidémiologique descriptive transversale de la leptospirose animale dans deux îles de l'Océan Indien : La Réunion et Mayotte.

À La Réunion, 579 animaux appartenant à 13 espèces ont été prélevés. Nous montrons que la maladie circule chez l'ensemble des espèces, sa séroprévalence varie de 15,7% chez les tangués à 79,8% chez les rats, tandis que la prévalence du portage rénal varie de 0% chez les tangués à 84,6% chez les souris. Ce travail est le premier qui quantifie la charge bactérienne rénale d'animaux infectés naturellement.

À Mayotte, 292 animaux ont été étudiés. La séroprévalence est de 2% chez les lémuriers, 10,2% chez les roussettes, 11,2% chez les rats noirs alors qu'elle est supérieure à 85% chez les chiens. Nous confirmons l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae à Mayotte et montrons que le sérotype Mini est le principal sérotype circulant chez les rats et les chiens non vaccinés. La prévalence du portage rénal a été estimée à 29,8% chez les rats. Les résultats du séquençage montrent une grande diversité génétique des souches circulant chez le rat ainsi qu'une parfaite homologie avec celles isolées chez des patients mahorais, désignant le rat noir comme source majeure de contamination pour l'Homme.

Dans des zones tropicales comme La Réunion et Mayotte, la prophylaxie doit considérer l'écosystème dans sa globalité.

Mots-clés : leptospirose, zoonose, La Réunion, Mayotte, test de microagglutination, PCR quantitative, épidémiologie, séroprévalence, portage rénal, séquençage, mammifères.

Abstract

Leptospirosis is a widespread zoonosis which could be lethal for humans. All mammals could be reservoir of the bacteria in their kidneys and knowledge about the maintenance hosts is essential to improve preventive measures. The aim of this work was to conduct an epidemiological descriptive transversal study on animal leptospirosis on two Indian Ocean islands: Reunion and Mayotte.

In Reunion Island, we studied 579 mammals belonging to 13 species. Results showed that seroprevalence of leptospirosis varied greatly regarding the species, from 15.7% in the insectivorous tenrecs, to 79.5% in rats and prevalence of the renal carriage varied from 0% in tenrecs to 84.6% in mice. This is the first report that evaluates the concentration of leptospire in the kidney tissue of naturally infected mammals.

In Mayotte, 292 animals were studied. We showed that the seroprevalence was 2% in lemurs, 10.2% in flying foxes, 11.2% in black rats, while it was over 85% in domestic and stray dogs. We showed that Mini was the most prevalent serogroup found in rats and non-vaccinated dogs and corroborated recent findings showing that serogroup Icterohaemorrhagiae was not present in Mayotte. We reported 29.8% of renal carriage amongst rats. DNA sequencing showed a great diversity among *Leptospira* strains circulating within rat population and a perfect homology with the strains isolated from ill patients in Mayotte. These results strongly suggest that black rats are the main source of human contamination in Mayotte.

These data have practical applications in human and veterinary medicine. In tropical areas such as Reunion and Mayotte islands, prophylaxia should be considered at the ecosystem level.

Key words: leptospirosis, zoonosis, Reunion Island, Mayotte, microagglutination test, real-time quantitative PCR, epidemiology, seroprevalence, renal carriage, sequencing, mammals.

Sommaire

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE	1
1. Importance sanitaire de la leptospirose	3
2. Aspects historiques	5
3. <i>Leptospira</i>	7
3.1. Nomenclature	7
3.2. Systématique	8
3.3. Caractéristiques biologiques	8
3.4. Mode de transmission	10
3.5. Classification antigénique (ou sérologique)	11
3.6. Classification génomique	12
3.7. Le génome de <i>Leptospira</i> spp.	16
4. Problématique, objectifs et plan de la thèse	19
CHAPITRE II : LA LEPTOSPIROSE HUMAINE, EXPRESSION CLINIQUE, DIAGNOSTIC, PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE	23
1. Expression clinique	25
1.1. Leptospirose anictérique	25
1.2. Leptospirose ictérique	26
1.3. Formes graves	26
1.4. Symptômes oculaires	28
1.5. Complications	29
1.6. Diagnostic différentiel	30
2. Diagnostic biologique	31
3. Facteurs de risque de leptospirose	33
3.1. Facteurs de risque liés au climat	33
3.2. Facteurs de risque socio-économiques	45
3.3. Autres facteurs de risque	46
3.3.1. Le sexe et l'âge du patient	46
3.3.2. L'exposition par les loisirs	47
CHAPITRE III : LA LEPTOSPIROSE, UNE MALADIE (RE-) EMERGENTE ?	49
1. Emergence du syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS, Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome)	51
2. Emergence liée aux nouvelles activités de loisirs et à la mondialisation des échanges	52
3. Emergence liée au changement climatique	54
4. Urbanisation, exode rural et pauvreté	54

5. Perte de biodiversité mammalienne	55
6. La leptospirose : une maladie émergente chez les chiens ?	57
CHAPITRE IV : LA LEPTOSPIROSE ANIMALE	59
1. Rôle des animaux dans l'épidémiologie de la leptospirose : la notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible	61
1.1. Notion d'hôte	61
1.2. Comment définir une "espèce réservoir" par les résultats d'analyses de laboratoire ?	64
2. Signes cliniques chez quelques espèces domestiques	67
2.1. Chien	67
2.2. Chat	68
2.3. Cheval	69
2.4. Bovin	70
2.5. Ovin et caprin	71
2.6. Porcin	71
3. La leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales	72
CHAPITRE V : CONTEXTES GEOGRAPHIQUES, MATERIELS ET METHODES	95
1. L'île de La Réunion	97
1.1. Géographie et climat	97
1.2. La leptospirose humaine à La Réunion	100
2. L'île de Mayotte	105
2.1. Géographie et climat	105
2.2. La leptospirose humaine à Mayotte	106
3. Monographies des mammifères étudiés à La Réunion et à Mayotte	109
3.1. La Souris grise	109
3.2. Le Rat noir	110
3.3. Le Rat surmulot	110
3.4. La Musaraigne musquée	111
3.5. Le Tangué	111
3.6. Le Chat domestique	112
3.7. Le Chien	113
3.8. Le Cerf de Java	113
3.9. Le Bovin	114
3.10. La Chèvre	114
3.11. Le Mouton	115
3.12. Le Cochon	116
3.13. Le Petit Molosse de La Réunion	116
3.14. La Roussette	117
3.15. Le Lémur brun	117
4. Matériels et Méthodes	118
4.1. Capture des animaux et prélèvement du matériel biologique	118
4.1.1. Petits mammifères	118
4.1.2. Carnivores errants	119
4.1.3. Animaux de rente	120

4.1.4. Microchiroptères	120
4.1.5. Roussettes (Mayotte)	121
4.1.6. Lémuriens (Mayotte)	121
4.1.7. Analyse semi-quantitative des urines par bandelettes urinaires	122
4.1.8. Zonage : Est versus Ouest (La Réunion)	124
4.2. Traitement des échantillons et des données collectées	125
4.3. Aspects réglementaires	125
4.3.1. La Réunion	125
4.3.2. Mayotte	127
4.4. Sérologie par test de micro-agglutination (MAT)	127
4.5. Extraction	131
4.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)	131
4.6.1. Définitions	131
4.6.2. Présentation de LipL32	131
4.6.3. Construction d'un contrôle positif et d'un standard pour la PCR quantitative	133
4.6.4. Construction d'un contrôle interne (CI) – Prélèvements de La Réunion	133
4.6.5. Détection du génome de <i>Leptospira</i> par qPCR	134
4.6.6. Détection du contrôle interne (CI) par qPCR	135
4.7. Culture de tissu rénal et d'urines sur milieu EMJH (animaux de La Réunion)	136
4.8. Analyse des séquences d'ARNr 16S (prélèvements de reins de rats noirs de Mayotte)	137
4.9. Analyses statistiques (animaux de La Réunion)	138
4.9.1. Comparaison des charges bactériennes rénales	138
4.9.2. Facteurs de risque d'infection par <i>Leptospira</i>	138
4.9.3. Corrélation entre l'infection rénale et l'analyse semi-quantitative des paramètres urinaires	141

CHAPITRE VI : EPIDEMIOLOGIE ET ECOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE A LA REUNION **143**

1. Résultats	145
1.1. Bilan des captures	145
1.2. Résultats sérologiques	150
1.2.1. Rats noirs	151
1.2.2. Rats surmulots	151
1.2.3. Tenrec	151
1.2.4. Chats errants	152
1.2.5. Chiens errants	152
1.2.6. Bovins	152
1.2.7. Caprins, Cervidés et Porcins	152
1.2.8. Souris et Musaraigne	153
1.3. Prévalence du portage rénal (résultats des qPCR)	156
1.4. Résultats des cultures de reins et d'urines	158
1.5. Charge bactérienne rénale moyenne	158
1.5.1. Description des données	158
1.5.2. Modélisation	159
1.6. Facteurs de risque de séropositivité	162
1.6.1. Tableaux de contingence	162
1.6.2. Résultats des analyses statistiques	162
1.7. Facteurs de risque de portage rénal	168
1.7.1. Tableaux de contingence	168
1.7.2. Résultats des analyses statistiques	168
1.7.3. Lien entre séropositivité et portage rénal	169
1.8. Analyses par bandelettes urinaires	173
1.8.1. Tableaux de contingence	173

1.8.2. Résultats des analyses statistiques	174
2. Discussion sur l'épidémiologie et l'écologie de la leptospirose animale à La Réunion	175
2.1. Espèces hôtes de <i>Leptospira</i>	175
2.1.1. Rats (<i>Rattus rattus</i> et <i>Rattus norvegicus</i>) et souris domestiques (<i>Mus musculus</i>)	176
2.1.2. Insectivores : musaraigne musquée (<i>Suncus murinus</i>) et tangué (<i>Tenrec ecaudatus</i>)	181
2.1.3. Chiens et chats errants	183
2.1.4. Animaux d'élevage	187
2.1.5. Petit Molosse de La Réunion (<i>Mormopterus francoismoutoui</i>)	201
2.2. Charge bactérienne rénale	203
2.3. Etude des paramètres urinaires	206
2.4. Transmission de la leptospirose de l'animal à L'Homme à La Réunion	208
3. Publication des résultats	213
CHAPITRE VII : EPIDEMIOLOGIE ET ECOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE A MAYOTTE	241
<hr/>	
1. Rappel de la problématique	243
2. Résultats	243
1.1. Bilan des captures	243
1.2. Résultats sérologiques	246
1.3. Résultats de prévalence du portage rénal chez <i>R. rattus</i>	251
1.4. Résultats du séquençage	251
3. Discussion	253
3.1. Animaux réservoirs	253
3.1.1. Populations animales étudiées, partage des écosystèmes	253
3.1.2. Roussettes (<i>Pteropus seychellensis</i>)	254
3.1.3. Lémurs bruns (<i>Eulemur fulvus</i>)	255
3.1.4. Chiens	257
3.1.5. Rats noirs	260
3.2. Epidémiologie de la leptospirose humaine à Mayotte	261
3.2.1. Risque lié au réservoir animal	261
3.2.2. Risque lié aux conditions de vie	263
4. Publication des résultats	267
CHAPITRE VIII : DISCUSSION GENERALE	293
<hr/>	
1. Discussion sur la méthodologie	295
1.1. Quelle(s) méthode(s) d'investigation ?	295
1.1.1. Test de microagglutination (MAT)	295
1.1.2. Amorces utilisées pour la qPCR	296
1.1.3. Comparaison des techniques	297
1.1.4. Amélioration de la technique de culture	299
1.2. Utilisation des séro-buvards	300
1.3. Méthode de quantification de la charge bactérienne rénale	301
1.4. Représentativité des échantillonnages	302

2. Hypothèses sur les origines et la diversité des leptospires à La Réunion et à Mayotte par l'histoire du peuplement par les mammifères	304
2.1. Colonisation de La Réunion et Mayotte par les mammifères	304
2.2. Les origines géographiques des <i>Leptospira</i> comme explication à la diversité des souches sur les deux îles	306
2.3. Notion de co-évolution hôte-pathogène : <i>Rattus rattus</i> , espèce clé de la diversité des souches de <i>Leptospira</i> ?	309
3. Epidémiologie comparée de la leptospirose sur les deux îles	312
4. Conséquences en santé vétérinaire	316
4.1. Prévention de la leptospirose chez les animaux domestiques	316
4.2. Prévention de la leptospirose chez les animaux de rente	318
5. Intérêt de ce travail pour la santé humaine	320
5.1. Coût de la maladie	320
5.2. Population à risque et mesures de prévention	321
5.2.1. Mesures générales en population humaine	322
5.2.2. Quels moyens de lutte contre les petits mammifères ?	323
5.2.3 Vacciner le cheptel pour protéger la population humaine	325
CHAPITRE IX : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	327
1. Conclusions	329
1.1. Epidémiologie de la leptospirose sur l'île de La Réunion	330
1.2. Epidémiologie de la leptospirose sur l'île de Mayotte	331
1.3. Ecologie et mesures de lutte	332
2. Perspectives de recherche	336
GLOSSAIRE	339
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITÉES	345
ANNEXES	375

Liste des Figures

Figure 1 : Cartographie de l'incidence annuelle globale de la leptospirose humaine dans le monde.	4
Figure 2 : Diagramme schématique d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique.....	9
Figure 3 : Voies de transmission de la leptospirose.....	11
Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de <i>Leptospira</i>	14
Figure 5 : Diagramme montrant le nombre de gènes uniques et partagés entre <i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> et <i>L. biflexa</i>	17
Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénie de l'insuffisance rénale aigüe lors d'infection par <i>Leptospira</i>	26
Figure 7 : Nature biphasique de la leptospirose et investigations cliniques pertinentes aux différents stades de la maladie.....	33
Figure 8 : Le continuum hôte-pathogène.	57
Figure 9 : Représentation simplifiée des réponses immunitaires possibles chez un animal infecté par <i>Leptospira</i>	66
Figure 10 : Poumon de chien atteint d'hémorragie pulmonaire aigüe diffuse sévère.....	68
Figure 11 : La Réunion et Mayotte dans le contexte régional Océan Indien.	98
Figure 12 : Géographie de La Réunion.	98
Figure 13 : Altitude – Climat : coupe schématique de l'île (Saint Gilles - Saint Benoît).	100
Figure 14 : L'île de Mayotte.....	106
Figure 15 : Distribution des cas du sérotype Mini (ligne continue) par rapport au nombre total de cas de leptospirose à Mayotte (histogramme bleu), entre 1998 et 2009	107
Figure 16 : Arbre phylogénétique des isolats de <i>Leptospira</i> (n=95) basé sur les séquences de gènes Multiple Locus Sequence Typing (MLST).....	108
Figure 17 : Arbre couvrant de poids minimal (Minimum Spanning Tree, MST) de 372 souches de <i>Leptospira</i> , incluant des souches de Mayotte et des souches précédemment décrites.	109
Figure 18 : Poste de piégeage composé d'une souricière INRA et d'un piège Manufrance®.	119
Figure 19 : Prélèvement sanguin sur buvard.....	119
Figure 20 : Île de La Réunion : carte des précipitations moyennes annuelles.....	124
Figure 21 : Microscopie électronique après immunomarquage de la protéine LipL32 par antisérum anti-LipL32 à l'or colloïdal à la surface de <i>L. kirschneri</i>	132
Figure 22 : Lieux de capture des différents animaux étudiés (prélèvements de 2009).	145
Figure 23 : Types d'environnements explorés pour la capture de micromammifères à La Réunion.....	146
Figure 24 : Séroprévalence par espèce et intervalle de confiance à 95% chez les animaux de La Réunion prélevés en 2009 (MAT).	151
Figure 25 : Nombre d'animaux séropositifs par sérotype et par espèce (224 animaux séropositifs de La Réunion, 2009).....	153
Figure 26 : Prévalence du portage rénal de <i>Leptospira</i> par espèce (animaux de La Réunion, 2009) évaluée par qPCR ciblant le gène <i>lipL32</i> et intervalle de confiance à 95%.	157
Figure 27 : Prévalence de l'excrétion urinaire par espèce (animaux de La Réunion, 2009) évaluée par qPCR ciblant le gène <i>lipL32</i>	157
Figure 28 : Cartographie des résultats de charge bactérienne rénale par espèce.....	160

Figure 29 : Poids des rats noirs adultes et jeunes en fonction de la charge bactérienne rénale ($\ln[x+1]$), droite de régression et équation de la droite.....	161
Figure 30 : Observation au microscope électronique à balayage d'une section de tissu rénal de <i>R. norvegicus</i> 28 jours après infection par 108 leptospires (grossissement x5000).....	205
Figure 31 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 173 animaux séropositifs à La Réunion (prélèvements faits en 2009).....	211
Figure 32 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 423 patients diagnostiqués à La Réunion entre 1998 et 2009 (données du CNRL).	211
Figure 33 : Voies présumées de transmission rurale de <i>Leptospira</i> à La Réunion.....	212
Figure 34 : Voies présumées de transmission sylvatique de <i>Leptospira</i> à La Réunion.	212
Figure 35 : Voies présumées de transmission urbaine de <i>Leptospira</i> à La Réunion.	213
Figure 36 : Cartographie de Mayotte présentant les lieux de capture des animaux (Carte S. Girard, ADEM-GESAM/CIRAD).....	244
Figure 37 : Capture et prélèvements sur lémurs bruns et roussettes à Mayotte (ChikAni, 2007).	246
Figure 38 : Séroprévalence (et intervalle de confiance à 95%) de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte.	247
Figure 39 : Proportion des différents sérogroupes (déterminés par MAT) par espèce et catégorie chez les animaux étudiés à Mayotte.....	249
Figure 40 : Arbre enraciné sur <i>L. liceresiae</i> montrant les relations phylogénétiques entre des souches de références de <i>Leptospira</i> (en couleur), des souches isolées chez les patients mahorais (Souche X) et des souches identifiées chez les rats noirs à Mayotte (Rein Y).....	252
Figure 41 : Voies probables de transmission de <i>Leptospira</i> à Mayotte.....	266
Figure 42 : Séquences nucléotidiques du gène <i>lipL32</i> de <i>L. interrogans</i> sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130 (FioL1-130) et <i>L. borgpetersenii</i> souche 200801929 (Lborg1929).....	297
Figure 43 : Origine géographique des mammifères introduits de La Réunion et de Mayotte.....	306
Figure 44 : Représentation schématique du phénomène de co-évolution.	309
Figure 45 : Sérogroupes identifiés par MAT chez les animaux de deux îles de l'Océan Indien.	315
Figure 46 : Exemple de zone attractive pour les rats dans une exploitation bovine.....	319
Figure 47 : Ecologie de la leptospirose.....	335

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Incidence annuelle de la leptospirose dans quelques pays du monde	4
Tableau 2 : Nombre et répartition des sérovars dans les 23 sérogroupees et les sept espèces pathogènes.....	15
Tableau 3 : Résumé des caractères principaux des génomes des <i>Leptospira</i> pathogènes et saprophytes	18
Tableau 4 : Synthèse des signes cliniques de la leptospirose.....	30
Tableau 5 : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de <i>Leptospira</i>	62
Tableau 6 : Températures en fonction de l'altitude à La Réunion.....	99
Tableau 7 : Souches en culture (milieu EMJH) utilisées pour les analyses sérologiques sur les animaux de La Réunion capturées en 2009 et raisons d'inclusion dans le panel	129
Tableau 8 : Souches utilisées pour le MAT sur les sérums des animaux de Mayotte capturés en 2007.....	130
Tableau 9 : Amorces et sondes utilisées pour les qPCR.	136
Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR nichée (prélèvements de reins de rats noirs, Mayotte 2007).....	137
Tableau 11 : Animaux prélevés à La Réunion en 2009 et 2010.	148
Tableau 12 : Types de prélèvements effectués par espèce (animaux de La Réunion, prélèvements 2009 et 2010).	149
Tableau 13 : Séroprévalence et intervalle de confiance à 95% de la séroprévalence chez 9 espèces animales de La Réunion prélevées en 2009 (MAT).....	150
Tableau 14 : Résumé des résultats sérologiques par espèce et par sérogroupe sur 224 animaux de La Réunion séropositifs par MAT (captures de 2009).....	154
Tableau 15 : Titres minimum et maximum obtenus par MAT pour chaque sérogroupe, par espèce (224 animaux séropositifs de La Réunion, 2009).	154
Tableau 16 : Résultats détaillés de séroprévalence, minimum et maximum des titres en anticorps (MAT).....	155
Tableau 17 : Prévalence du portage rénal chez 12 espèces animale étudiées à La Réunion (2009) évaluée par qPCR ciblant le gène <i>lipL32</i> et intervalle de confiance à 95% (IC95%).....	156
Tableau 18 : Quantification de la concentration en leptospires dans le tissu rénal par qPCR visant le gène <i>lipL32</i> . Moyennes brutes et écart-types, données transformées (ln[x+1]) et écart-types de la charge bactérienne rénale par espèce.	158
Tableau 19 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les carnivores domestiques.....	165
Tableau 20 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les rongeurs. ..	165
Tableau 21 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les tenrecs.	165
Tableau 22 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les caprins.	165
Tableau 23 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, l'âge, le type d'élevage, le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein et la race chez les bovins.	166
Tableau 24 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les cerfs.	166
Tableau 25 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT) et le résultat de la qPCR (visant <i>lipL32</i>) sur rein chez les porcins.	166

Tableau 26 : Facteurs de risque de séropositivité (déterminée par MAT) parmi les différentes espèces étudiées à La Réunion (2009).....	167
Tableau 27 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les carnivores domestiques.....	170
Tableau 28 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les rongeurs. ..	170
Tableau 29 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), le sexe, l'âge et le lieu de capture pour les musaraignes.....	170
Tableau 30 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), le sexe, l'âge, e type d'élevage, la localisation du dernier élevage, le résultat de la sérologie (par MAT) et la race pour les bovins.....	171
Tableau 31 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), le sexe et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les caprins.....	171
Tableau 32 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant <i>lipL32</i>), la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les cerfs.....	171
Tableau 33 : Facteurs de risque d'infection rénale par <i>Leptospira</i> (déterminée par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) parmi les différentes espèces étudiées.....	172
Tableau 34 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) et l'espèce pour les quatre espèces étudiées.....	173
Tableau 35 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) et la présence d'une hématurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).....	173
Tableau 36 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>)et la présence d'une cétonurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).....	173
Tableau 37 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) et la présence de nitrites dans les urines, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).....	174
Tableau 38 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) et la présence d'une leucocyturie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).....	174
Tableau 39 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène <i>lipL32</i>) et la présence d'une protéinurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).....	174
Tableau 40 : Espèces génomiques, sérovars, souches de référence et origine des souches de <i>Leptospira</i> appartenant au séro groupe Pyrogenes	200
Tableau 41 : Animaux prélevés à Mayotte en 2007.....	245
Tableau 42 : Motif de la consultation vétérinaire pour les chiens domestiques échantillonnés à Mayotte en 2007 (données fournies par les vétérinaires).....	245
Tableau 43 : Séroprévalence de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte et intervalle de confiance à 95% (IC95%).....	246
Tableau 44 : Résultats du MAT et titres observés (entre parenthèses) chez les animaux de Mayotte.....	248
Tableau 45 : Proportions relatives des sérogroupes infectant (déterminés par MAT) circulant chez les animaux non vaccinés séropositifs à Mayotte (2007), et proportions relatives des différentes espèces génomiques identifiées par génotypage chez les patients mahorais (2007-2010) et par séquençage chez les rats (2007).....	265
Tableau 46 : Résultats comparés pour trois espèces animales à La Réunion et à Mayotte, les chiens, les rats noirs, les bovins.	312
Tableau 47 : Confort des résidences à Mayotte et à La Réunion.....	313

Liste des Abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique.
AIC :	Critère d'Information d'Akaike (Akaike Information Criterion).
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché.
ARN :	Acide RiboNucléique.
ARNr :	Acide RiboNucléique ribosomique.
BET :	Bromure d'éthidium.
CHR :	Centre Hospitalier Régional.
CI :	Contrôle Interne.
CIRAD :	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.
CITES :	Convention on International Trade in Endangered Species.
CIVD :	Coagulation Intravasculaire Disséminée.
CNPN :	Centre National de Protection de la Nature.
CNRL :	Centre National de Référence des Leptospires.
Cq :	Cycle de quantification.
DAF :	Direction de l'Agriculture et de la Forêt.
DIREN :	Direction Régionale de l'Environnement.
DOM :	Département d'Outre-Mer.
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
EMJH :	Ellinghausen - McCullough modifié par Johnson et Harris.
GHSR :	Groupe Hospitalier Sud Réunion.
HRM :	High Resolution Melting.
IC 95% :	Intervalle de Confiance à 95%.
IgG :	Immunoglobuline de type G.
IgM :	Immunoglobuline de type M.
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique.
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement.
JORF :	Journal Officiel de la République Française.
Da :	Dalton (kDA = kiloDalton).
LipL32 :	Lipoprotéine L32.
LPHS :	Leptospirosis-associated Pulmonary Haemorrhage Syndrome.
LPS :	Lipopolysaccharide.
MAT :	Microscopic Agglutination Test (test de microagglutination microscopique).
MIQE :	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
MLST :	Multi Locus sequence Typing.
MLVA :	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis.
na :	Not available (non disponible).
nd :	Non déterminé.
ns :	Non significatif.
OR :	Odds Ratio.
PBS :	Phosphate Buffered Saline.
PCR :	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne).
qPCR :	Real-time Quantitative PCR.
SPHS :	Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome.
TLR :	Toll-Like Receptor.
VNTR :	Variable Number Tandem Repeat.
VZV :	Varicella-Zoster Virus.



CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE



1. Importance sanitaire de la leptospirose

La leptospirose est une maladie zoonotique ayant un impact significatif sur la santé humaine dans de nombreuses régions du globe, en particulier en Amérique du Sud et en Asie. La maladie peut présenter des formes sévères voire mortelles comme le syndrome de Weil ou le syndrome d'hémorragie pulmonaire sévère. L'incidence véritable de la leptospirose est méconnue. Elle est estimée entre 0,1 et 1 cas pour 100 000 habitants par an dans les zones tempérées et ce chiffre peut atteindre 10 à 100 cas pour 100 000 habitants en zones tropicales (**Figure 1, Tableau 1**). Lors d'épidémie, l'incidence annuelle peut être supérieure à 10 cas pour 100 000 habitants. Le nombre de cas de leptospirose est sous-estimé pour diverses raisons, comme par exemple la difficulté du diagnostic différentiel avec d'autres maladies endémiques s'exprimant aussi par un syndrome grippal, le manque de laboratoires de diagnostic dans certaines régions ou la difficulté de son diagnostic biologique [2]. La majorité des cas diagnostiqués présentent des manifestations sévères, pour lesquelles la mortalité atteint voire dépasse 10% [3].

Les populations les plus sévèrement touchées sont aussi les plus pauvres, notamment les populations des zones rurales ou les populations des favelas des grandes agglomérations sud-américaines. L'infection du seul travailleur d'une famille peut réduire de façon dramatique le revenu familial ; en outre, cette situation peut se compliquer de l'incapacité des autres membres de la famille à travailler par le simple fait qu'ils s'occupent du malade. Les coûts médicaux peuvent endetter une famille. Malgré ce constat, la leptospirose reste une maladie peu prise en compte par les pouvoirs publics.

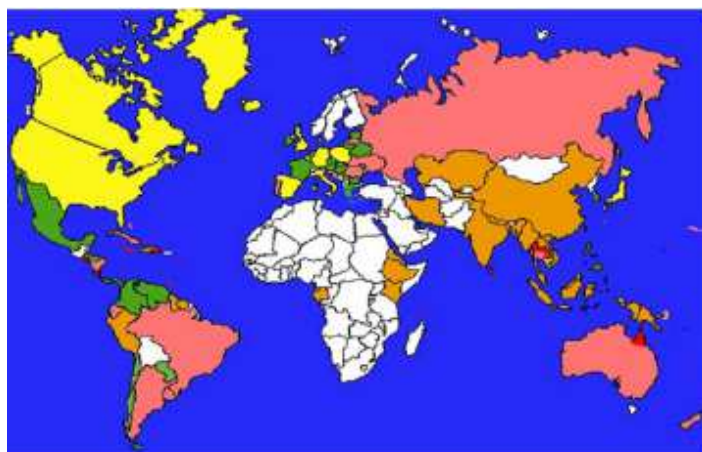


Figure 1 : Cartographie de l'incidence annuelle globale de la leptospirose humaine dans le monde.

Les couleurs représentent l'incidence, par ordre décroissant : rouge, rose, vert, jaune. L'orange désigne les zones avec une incidence probablement élevée, mais non estimée. Le blanc représente les pays pour lesquels il n'existe pas de donnée [4].

Tableau 1 : Incidence annuelle de la leptospirose dans quelques pays du monde (d'après [4]).

Rang	Pays	Incidence annuelle pour 100 000 habitants	Autres pays	Incidence annuelle pour 100 000 habitants
1	Seychelles	43,21	Biélorussie	0,34
2	Trinidad et Tobago	12,04	Bulgarie	0,37
3	Barbados	10,03	Chili	0,16
4	Jamaïque	7,8	Colombie	0,16
5	Costa Rica	6,72	République Tchèque	0,18
6	Sri Lanka	5,4	France	0,39
7	Thaïlande	4,89	Allemagne	0,07
8	Salvador	3,58	Grèce	0,3
9	Nouvelle-Zélande	2,6	Honduras	0,31
10	Uruguay	2,5	Hongrie	0,31
11	Cuba	2,47	Irlande	0,22
12	Nicaragua	2,33	Italie	0,07
13	Croatie	1,73	Lituanie	0,22
14	Russie	1,72	Mexique	0,1
15	Ukraine	1,53	Pays-Bas	0,19
16	République Dominicaine	1,38	Panama	0,13
17	Brésil	1,28	Paraguay	0,19
18	Equateur	1,16	Serbie Montenegro	0,15
19	Argentine	0,95	Singapour	0,2
20	Roumanie	0,94	Corée du Sud	0,28

Pays pour lesquels aucune donnée n'est disponible mais dans lesquels la leptospirose est probablement endémique :

Inde, Malaisie, Bangladesh, Vietnam, Laos, Népal, Cambodge, Indonésie, Birmanie, Chine, Pérou, Haïti, Iran, Suriname.

Une étude rétrospective récente a souligné le rôle de la faune sauvage comme source de maladies infectieuses émergentes et leur augmentation depuis 1940. L'augmentation de la population humaine induit une augmentation de la demande alimentaire qui conduit à des pratiques d'agriculture intensive impliquant parfois un très grand nombre d'animaux, ou la mise en place de fermes de production multi-espèces au sein d'une même région. Ces pratiques facilitent les infections inter-espèces [5, 6].

En parallèle des altérations écologiques provoquées par les hommes, une augmentation exponentielle des conflits d'espace entre les hommes et la faune sauvage est observée. Elle est liée à l'augmentation de la population, du tourisme et des échanges, qui conduisent à exposer l'Homme à de nouveaux agents infectieux ou à l'exposer davantage à des agents déjà connus [5-8].

2. Aspects historiques

“*Leptospira*” vient du grec "leptos" (fin) et du grec "speira" (boucle).

Dans la langue chinoise, des noms anciens existaient pour désigner la leptospirose, tels que "wei ni", ou "jaunisse des cultivateurs de riz", ou dans les provinces de Hunan et Sichuan "lo ya goz te". Certains champs étaient "tan hwan bi" ("champs hantés"), où un fantôme, un esprit pouvait provoquer la "jaunisse du champ de riz". Au Japon, les noms traditionnels de la maladie étaient "nanukayami" ou "nanokayami" ("fièvre des sept jours" ou "fièvre d'automne"). Ces fièvres étaient associées avec la saison, la profession, ou avec la région ("hasamiyami" dans le district de Hasamiyami). Plus tard, en Europe, au Japon, en Australie et ailleurs, des associations entre la maladie et la profession ou l'environnement ont été reconnues ("cane-cutter's disease"¹, "swine-herd's disease"², "Schlammfieber"³, "mud fever"⁴), longtemps avant que l'étiologie de la maladie ne soit connue [9]. Dans ces

¹ Maladie des coupeurs de canne à sucre.

² Maladie des élevages de porcs.

³ Fièvre de la boue.

⁴ Fièvre de la boue.

dénominations empiriques apparaissent déjà des éléments essentiels de l'épidémiologie de la leptospirose.

On prête à Larrey la première description correcte de la "fièvre jaune", en 1812, parmi les troupes napoléoniennes à Héliopolis, lors du siège du Caire en 1800 [9]. La maladie décrite par Larrey était semblable à celle déjà connue sous le nom de "typhus icterodes" par les nosologistes français et anglais, ou sous le nom de "vomito prieto" par les espagnols, et décrit comme "fièvre jaune" par Humboldt au Mexique en 1811 [9].

En 1886 à Heidelberg, Adolf Weil décrit pour la première fois un ensemble de signes et symptômes, aujourd'hui éponymiques du syndrome de Weil, forme clinique la plus connue de la leptospirose (son premier patient souffrait de saignement nasal, "nasenbluten", au second jour de la maladie) [10]. Néanmoins, il semble qu'un syndrome identique ait été décrit chez un égoutier plusieurs années auparavant [11]. Inada et Ido identifiaient l'agent causal 30 ans plus tard [12].

Il a été suggéré que *Leptospira interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae a été introduit en Europe de l'ouest au XVIII^e siècle lors de l'extension vers l'ouest de l'aire de répartition de *Rattus norvegicus* à partir de l'Eurasie [13]. Néanmoins, des descriptions d'un syndrome ictérique ont été retrouvées très tôt dans les écrits. Entre 1616 et 1619, une épidémie a fait des ravages dans la population d'Indiens d'Amérique. La maladie a probablement épargné les pêcheurs et commerciaux européens qui vivaient à proximité. Les manifestations cliniques les plus sévères étaient: fièvre, céphalées, épistaxis, jaunisse et lésions cutanées. Plusieurs hypothèses ont été émises sur les pathologies responsables de ces symptômes : la peste, la fièvre jaune, la petite variole, mais aussi la grippe, la varicelle, le typhus, la fièvre typhoïde, la trichinose, les méningites cérébrospinales ainsi que les infections systémiques par le virus de l'hépatite B (HBV) ou D (HDV). Récemment, des auteurs proposent la leptospirose comme cause de ces symptômes observés [14]. Les rongeurs réservoirs auraient été transportés par bateaux depuis l'Europe et auraient infecté les réservoirs animaux indigènes ainsi que les eaux douces. L'écologie locale et les pratiques de la vie quotidienne de la population autochtone (non partagées par les européens) auraient favorisé la contamination. La réduction de la population d'Indiens a pu être progressive, épisodique ou continue. Les modes de vie locaux exposant la population de façon permanente, la leptospirose est devenue hyperendémique dans la région, et seulement une fraction de la population a survécu [14].

Bien que Stimson ait démontré dès 1907 [15] par observation à la coloration argentique, la présence d'agrégats de spirochètes dans les tubules rénaux d'un patient mort de « fièvre jaune », cette observation pionnière a été ignorée pendant des années et ce n'est qu'en 1918 que Noguchi décrit la bactérie pour la première fois [1]. Les spirochètes présentant des extrémités en crochet, Stimson les a nommés *Spirochaeta interrogans* à cause de leur ressemblance avec un point d'interrogation.

L'agent étiologique de la leptospirose a donc été découvert "officiellement" en 1915 par deux équipes indépendantes au Japon et en Allemagne. Au Japon, Inada et Ido [16] ont mis en évidence les spirochètes mais aussi les anticorps spécifiques dans le sang de mineurs japonais atteints de jaunisse infectieuse. En Allemagne, deux équipes de médecins allemands, Uhlenhuth et Fromme [17] et Hubener et Reiter [18], ont détecté des spirochètes dans le sang de cobayes inoculés avec du sang de soldats atteints de "French disease" dans les tranchées du nord-est de la France. Après la publication en Europe du travail de Inada, la confirmation de la présence de la leptospirose dans les deux camps du front ouest a été rapidement faite [19, 20].

Peu après la découverte de l'agent de la leptospirose comme cause de la maladie de Weil au Japon, la même équipe a décrit le rôle du rat comme porteur de la bactérie [21]. Cette observation importante a permis la compréhension des principes épidémiologiques de transmission de la bactérie par un animal porteur et a ouvert la porte à la possibilité de mettre en place des mesures de contrôle de la maladie ainsi qu'à l'expérimentation sur les réservoirs animaux potentiels. Il a fallu de nombreuses années avant que d'autres animaux domestiques ou sauvages soient reconnus comme sources excrétrices de leptospires et que le caractère zoonotique de la maladie soit reconnu [9].

3. *Leptospira*

3.1. Nomenclature

A son congrès de 2002, the Committee on the Taxonomy of *Leptospira* of the International Union of Microbiological Societies a approuvé la nomenclature suivante pour les sérovars de *Leptospira* : le genre et l'espèce doivent être écrits en italique, le nom du sérovar ne doit pas être en italique et doit avoir une majuscule [22].

3.2. Systématique

Le genre *Leptospira* est un des genres de la famille des Leptospiraceae, ordre des Spirochaetales, classe des *Spirochaetes*, division ou phylum des "*Spirochaetes*", domaine ou empire des "*Bacteria*". L'ordre des spirochètes comprend quatre autres genres : *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* et *Borrelia* [23, 24].

Les spirochètes incluent un grand nombre de bactéries d'importance médicale, causant différentes maladies dont les plus connues chez l'Homme sont la syphilis (*Treponema pallidum*), la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), et la leptospirose (*Leptospira* spp.). Les spirochètes sont aussi des agents de maladies parodontales (*Treponema denticola*). Parmi les animaux de rente, *Brachyspira* (= *Serpulina*, *Treponema*) *hyodysenteriae* est l'agent de la dysenterie porcine (diarrhée hémorragique ou entérite hémorragique) et a une importance économique majeure. *Brachyspira pilosicoli* est associée à des diarrhées chez l'homme, chez des individus immunodéprimés [25]. Beaucoup de spirochètes sont des organismes libres dans l'environnement, comme par exemple les genres *Spirochaeta*, *Spirosymplokos*, ainsi que plusieurs *Leptospira* dont *L. biflexa* [26].

3.3. Caractéristiques biologiques

Les leptospires ont un diamètre de 0,2 µm et une longueur de 6 à 20 µm, avec des extrémités en crochet caractéristiques [9]. Les souches pathogènes ont un temps de génération d'environ vingt heures, tandis que les souches saprophytes ont une croissance plus rapide avec un temps de génération d'environ cinq heures [9]. Ces deux groupes ont aussi des besoins nutritionnels différents et se distinguent sur d'autres caractères phénotypiques. Par exemple, la croissance des souches pathogènes est inhibée par la 8-azaguanine (un analogue de la purine) alors que les souches saprophytes croissent normalement en présence de ce composé [27].

Les leptospires possèdent une double membrane externe lipidique, qui entoure la cellule bactérienne comme une gaine. L'espace entre la membrane cellulaire protoplasmique et cette gaine est appelé périplasma, son originalité tient du fait qu'il contient les flagelles périplasmiques ou endoflagelles (**Figure 2**), permettant la motilité [28-30]. Chez les Leptospiraceae (genres *Leptospira* spp. et *Leptonema* spp.) le diamètre des deux flagelles est

d'environ 0,1 μm pour 10-20 μm de long [30]. Chez *Leptospira* un flagelle court est attaché à chacune des extrémités de la cellule et s'étend vers l'extrémité opposée [26, 30, 31].

Comme chez les bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) est le composant lipidique principal de la couche externe de la membrane externe de *Leptospira* [32], il constitue son principal antigène [33], tandis que les lipoprotéines sont les protéines de surface de la membrane externe les plus abondantes et les plus exposées.

Le LPS est l'antigène le plus immunogène de *Leptospira* et est responsable de la spécificité sérovar/sérogroupe. Le LPS est généralement composé d'un lipide A, responsable de l'activité endotoxique et servant d'ancrage dans la membrane bactérienne, d'un core oligosaccharidique conservé, et d'un oligosaccharide ou polysaccharide appelé antigène O [34]. Un des facteurs clé contribuant à la sensibilité de l'homme à l'infection leptospirosique est vraisemblablement lié à l'incapacité du système immunitaire humain à détecter le LPS des leptospires *via* les récepteurs Toll-like 4 (TLR4) [35]. Cette incapacité est due à la structure inhabituelle du lipide A du LPS de *Leptospira* qui possède un unique phosphate méthylé, non retrouvé dans le lipide A d'autres bactéries [36]. Les cellules humaines peuvent détecter le LPS des leptospires, mais par les récepteurs TLR2 et non TLR4 [35]. Au contraire, le LPS de *Leptospira* est détecté par les récepteurs TLR2 et TLR4 murins [37], et TLR2 est aussi nécessaire à la reconnaissance des lipoprotéines telles que LipL32 [35].

L'absence de gènes codant pour des sphingomyélinases dans le génome de *L. biflexa* [38] et par conséquent l'absence de ces protéines dans la membrane externe de cette bactérie non pathogène [39] laisse supposer que ces protéines ont un rôle dans la virulence de la bactérie [40].

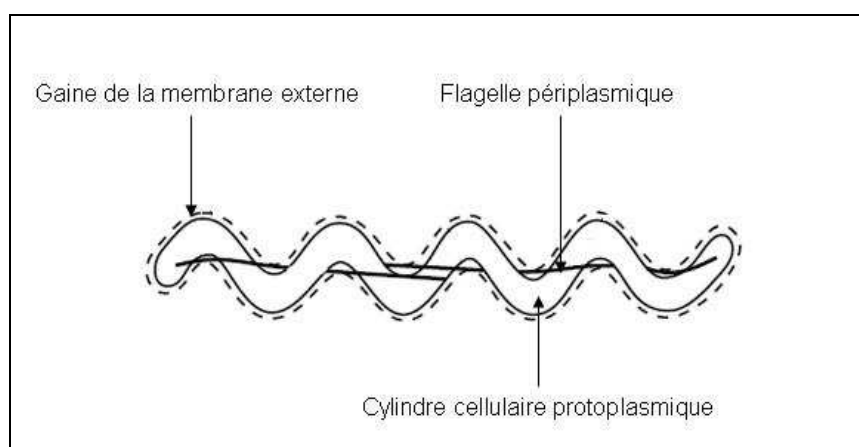


Figure 2 : Diagramme schématisé d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique (d'après [30]).

Les lipoprotéines ont souvent été nommées en fonction de leur poids moléculaire. On estime à plus de 300 le nombre de lipoprotéines potentielles, elles incluent les protéines majeures de la membrane externe (*major outer membran proteins, MOMP*). Environ 12 protéines de la membrane externe de *Leptospira* ont été identifiées, dont la porine OmpL1 [41], l'antigène immunodominant LipL32 [42, 43], l'immunoglobulin-like repeat containing protein B (LigB) [44], LenA36, LenD36 et Loa22 [45], LipL41 [46] mais la grande majorité d'entre elles attendent encore d'être caractérisées [32]. Parmi ces protéines, OmpL1, LipL32 et LipL41 sont des antigènes majeurs de la réponse immunitaire humorale et sont la base de différentes techniques de diagnostic immunologique [47-49].

3.4. Mode de transmission

Les espèces mammaliennes infectées chroniquement excrètent les leptospires pathogènes dans leurs urines et servent donc de réservoirs pour la transmission de la bactérie (**Figure 3**). Les leptospires sont maintenus dans des environnements domestiques et sylvatiques grâce à la transmission entre populations d'animaux réservoirs. Chez ces animaux, l'infection induit le plus souvent un portage asymptomatique et chronique. Les leptospires peuvent infecter le bétail, les animaux domestiques et sauvages, et provoquer des symptômes divers (voir **Chapitre IV**). Le statut de réservoir varie en fonction des espèces animales.

La leptospirose est transmise à l'Homme par contact direct avec des animaux réservoirs ou par exposition à des eaux de surface ou un sol contaminés par leurs urines (Figure 3) [50].
--

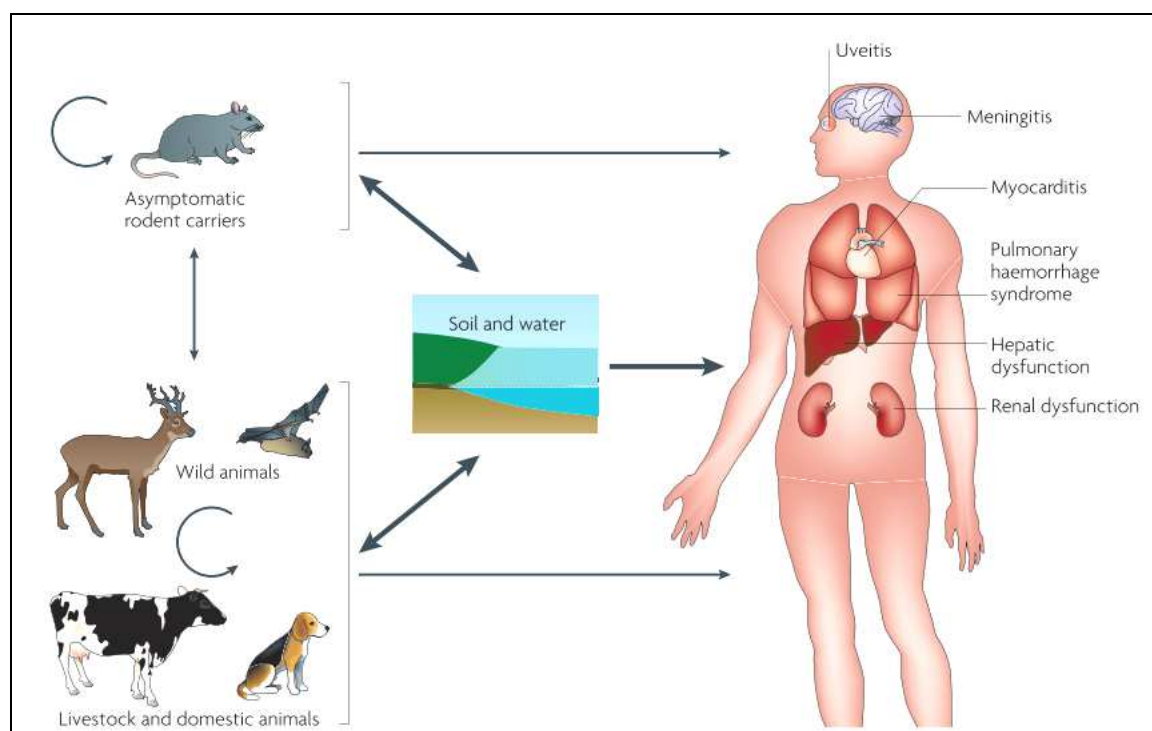


Figure 3 : Voies de transmission de la leptospirose (d'après [50]).

Actuellement, il n'y a aucune évidence que l'Homme contribue significativement à la contamination de l'environnement par *Leptospira*, mais des données récentes semblent montrer qu'un portage rénal durable serait tout de même possible [51]. En effet, l'Homme pourrait excréter des leptospires pendant une période dépassant une année : une étude a montré l'excrétion urinaire de leptospires pathogènes ou intermédiaires chez dix personnes asymptomatiques (c'est-à-dire sans épisode fébrile depuis au moins un an). Il est probable que cette observation soit la manifestation d'un portage rénal asymptomatique de *Leptospira*. Le nombre de leptospires retrouvées dans ces urines d'humains est en moyenne de 75 à 229 bactéries par ml [51]. L'étude suggère aussi que le portage rénal de longue durée de *Leptospira* est plus fréquent chez les femmes âgées que chez les hommes [51].

3.5. Classification antigénique (ou sérologique)

Avant 1989, le genre *Leptospira* était divisé en deux espèces, *L. interrogans* « *sensu lato* » (*s.l.*), qui regroupait toutes les souches pathogènes, et *L. biflexa s.l.*, regroupant toutes les souches saprophytes isolées de l'environnement. *L. biflexa s.l.* se différenciait de *L. interrogans s.l.* par sa croissance à 13°C en présence de 8-azaguanine. Ces appellations sont aujourd'hui considérées comme inexactes et doivent être abandonnées.

La classification antigénique (ou sérologique) est le reflet de l'expression des épitopes de surface au sein des antigènes du lipopolysaccharide (LPS). Ainsi, *L. interrogans s.l.* et *L. biflexa s.l.* sont divisées en nombreux sérovars définis d'après le test d'absorption croisée avec des antigènes homologues. D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé [52] : « Deux souches sont considérées comme appartenant à des types sérologiques distincts si, après absorption croisée par une quantité appropriée d'antigène hétérologue, l'antisérum de chaque souche conserve régulièrement, lorsqu'on l'éprouve de nouveau par rapport à la souche homologue, un titre au moins égal à 10% de celui qu'il accusait primitivement avec cette souche ».

Plus de 60 sérovars sont décrits pour les leptospires saprophytes, et plus de 260 pour les pathogènes [53]. Les sérovars proches antigéniquement sont regroupés en sérogroupe. La classification sérologique présente néanmoins de nombreux inconvénients, l'identification est coûteuse, lourde, lente (parfois plusieurs mois pour déterminer le sérovar) et complexe, ce qui la réserve à quelques laboratoires de référence [13]. De plus, les sérogroupe et même les sérovars regroupent le plus souvent des souches appartenant à des espèces génétiquement distinctes. Néanmoins, même si les sérogroupe n'ont qu'une valeur taxonomique limitée, il sont extrêmement utiles pour les études épidémiologiques [13].

Cette classification sérologique reste cependant très utilisée car elle est étroitement liée à la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de leptospirose (test de microagglutination ou MAT).

3.6. Classification génomique

Une espèce génomique (*genomospecies*) est définie comme des "souches ayant 70% ou plus d'homologie ADN-ADN et avec un ΔT_m de 5°C ou moins" [54].

La proximité des souches révélée par le MAT qui permet de définir des sérogroupe ne reflète pas toujours une proximité génomique: des sérovars appartenant au même sérogroupe sont dispersés au sein de plusieurs espèces, et une même espèce peut comporter de nombreux sérogroupe.

Brenner *et al.* [55] ont montré que sur 303 souches de leptospires étudiées, représentant 268 sérovars groupés en 30 sérogroupe, seules les souches du sérogroupe

Ballum sont confinées dans une seule espèce, *Leptospira borgpetersenii* [55] (**Tableau 2**, ne représentant que les espèces pathogènes).

Dans la classification génomique, le sous-groupe des espèces saprophytes, au nombre de six, forme la branche la plus ancienne du genre *Leptospira*. Un autre sous-groupe inclut les neuf espèces pathogènes tandis qu'une autre branche de l'évolution, de découverte plus récente, comprend les espèces appelées intermédiaires, pour lesquelles la pathogénicité n'a pas été clairement démontrée [50, 56] (**Figure 4**). Bien que *L. kmeyti* ait été isolé à partir du sol en Malaisie [57], l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S montre que cette souche appartient au cluster des espèces pathogènes. La variabilité de l'ADN entre les espèces est comprise entre 0,1 et 1,3% pour les espèces pathogènes, entre 0,3 et 2,9% pour les espèces intermédiaires, et entre 0 et 0,3% pour les espèces saprophytes [56].

Brenner *et al.* [55] émettent l'hypothèse que la distribution géographique des espèces est délimitée. Par exemple, les six souches identifiées de *L. alexanderi* sp. ont toutes été isolées en Chine. Soixante-deux souches parmi les 65 souches de *L. santarosai* proviennent d'Amérique du Nord et du Sud, de même que les 20 souches de *L. noguchii*. Presque la moitié des 91 souches de *L. interrogans* ont été isolées en Océanie (ce qui représente 70% des souches isolées dans cette région) [55]. Enfin, les 37 souches africaines (caractérisées par hybridation ADN-ADN dans l'étude de Feresu *et al.* [58]) appartiennent toutes soit à *L. kirschneri* soit à *L. santarosai*.

La classification génomique et la classification antigénique ne sont pas concordantes et plusieurs études ont montré que les sérogroupes ne peuvent être superposés aux groupes formés par une classification génétique [13] (ce qui suggérerait que les gènes qui déterminent les sérotypes pourraient être transférés latéralement entre les différentes espèces [50]).

Ainsi, un système de classification basé sur les ressemblances génétiques est utilisé conjointement avec la classification antigénique. Récemment, le séquençage du génome de souches appartenant à plusieurs espèces de *Leptospira* a permis l'introduction de diverses approches de génotypage des leptospires, dont les méthodes MLVA [59-61] ou MLST [62-64], qui pourraient devenir des méthodes standard de génotypage de *Leptospira* spp. comme c'est déjà le cas pour d'autres espèces bactériennes [65, 66]. Cette taxonomie moléculaire s'impose difficilement auprès des cliniciens et des spécialistes de la leptospirose malgré plusieurs avantages : reproductibilité, rapidité, faible coût. Enfin, les méthodes génétiques

sont accessibles à un plus grand nombre de laboratoires car des réactifs sont commercialisés et la nécessité de posséder une collection complète de sérovars est remplacée par la comparaison à des bases de données accessibles sur Internet.

Le sérovar a été une unité taxonomique historique très utile dans le contexte diagnostique. Cependant, dans une perspective de recherche, et spécialement si on tient compte de la génétique de la biosynthèse du LPS, ce taxon ne représente en aucun cas un groupe de souches avec une structure de LPS identique.

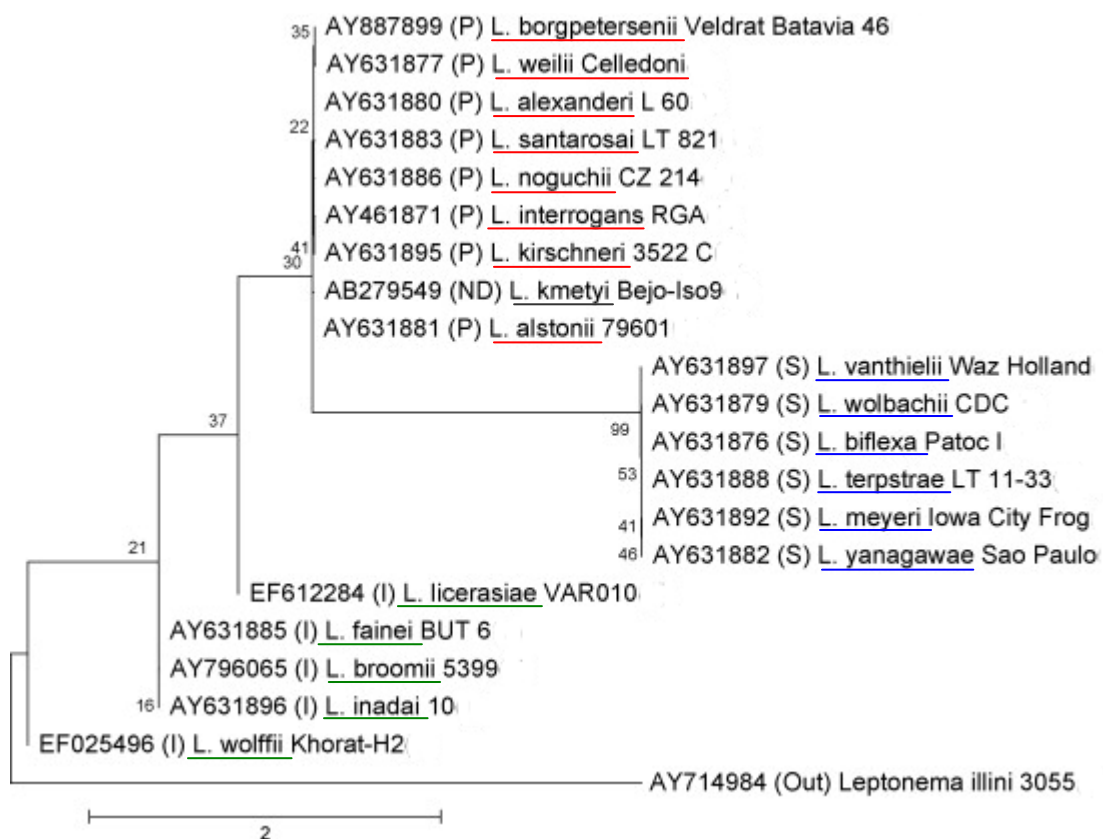


Figure 4 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de *Leptospira*.

L'arbre phylogénétique a été construit grâce à l'alignement de 1155 pb des séquences nucléotidiques du gène *rrs* de *Leptospira*. La méthode de Neighbor-joining a été utilisée (1000 bootstraps). Les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S regroupent les souches en trois groupes majeurs correspondant aux espèces pathogènes (P), intermédiaires (I), saprophytes (S) ou non déterminées (ND). ND fait référence aux espèces non testées sur modèle animal ou non isolées à partir d'humains ou d'animaux. Les numéros d'accèsion des séquences utilisés sont indiqués, suivis de l'espèce et de la souche. L'arbre phylogénétique final a été obtenu en prenant *Leptonema illini* comme groupe externe pour enraciner l'arbre. Les valeurs des bootstraps sont données en pourcentages. La barre d'échelle correspond à 2 substitutions pour 100 nucléotides (d'après [56]).

Tableau 2 : Nombre et répartition des sérovars dans les 23 sérogroupes et les sept espèces pathogènes.
(d'après Brenner *et al.* [55], restreint aux stricts pathogènes)

Sérogroupes	<i>L. interrogans sensu stricto</i>	<i>L. santarosai</i>	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. noguchii</i>	<i>L. weilii</i>	<i>L. alexanderi</i>	Total
Australis	9		1	1	5			16
Autumnalis	7	1	1	5	1			15
Ballum			6					6
Bataviae	5	5	1	2	2			15
Canicola	12			3				15
Celledoni			2			3		5
Cynopteri		2		1				3
Djasiman	3			1	1			5
Grippotyphosa	4	1		4				9
Hebdomadis	2	8	3	2		1	2	18
Icterohaemorrhagiae	13		1	5				19
Javanica		3	10			3	1	17
Louisiana	1				2			3
Manhao						1	2	3
Mini	1	4	1			1	1	8
Panama					2			2
Pomona	4	2		3	1			10
Pyrogenes	8	5	2		1	1		17
Ranarum	1				1			2
Sarmin	1	3				1		5
Sejroe	10	5	8			1		24
Shermani		3			1			4
Tarassovi		12	7		1	3		23
Total	81	54	43	27	18	15	6	244

3.7. Le génome de *Leptospira* spp.

L'étude du génome des *Leptospira* a connu une grande avancée ces dix dernières années avec le séquençage complet du génome de représentants de deux espèces pathogènes, *Leptospira interrogans* [67, 68] et *L. borgpetersenii* [69], et de l'espèce saprophyte *L. biflexa* [38].

Le génome de *Leptospira* a un taux de (G+C) compris entre 35 et 41% et possède deux chromosomes circulaires d'approximativement 4 Mb et 300 kb. Un réplicon circulaire de 74 kb ainsi qu'un prophage circulaire nommé LE1 ont en plus été identifiés chez *L. biflexa* [38, 70, 71].

Une analyse comparative des génomes de *Leptospira* spp. (**Figure 5, Tableau 3**) montre des différences entre les espèces pathogènes et saprophytes. De plus, il existe aussi des différences génétiques importantes au sein même du groupe des espèces pathogènes [72].

La comparaison des protéines codées par les génomes de *L. interrogans*, *L. biflexa* et *L. borgpetersenii* révèle un squelette commun (« *core genome* ») de 2052 protéines pour le genre *Leptospira* [38]. Les génomes de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* contiennent respectivement environ 3400 et 2800 régions codantes (sans compter les transposases et les pseudogènes), parmi lesquelles 656 sont spécifiques des leptospires pathogènes et non retrouvées chez l'espèce saprophyte *L. biflexa*. Les fonctions de 59% de ces gènes sont inconnues, ce qui suggère l'existence de mécanismes de pathogénicité uniques au genre *Leptospira*.

L. biflexa survit exclusivement dans l'environnement et possède beaucoup plus de gènes codant pour des protéines impliquées dans les interactions avec l'environnement ou des protéines métaboliques que les espèces pathogènes [38]. *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* partagent 2708 gènes ; 627 gènes et 265 gènes de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* respectivement ne sont pas partagés avec l'autre espèce pathogène. *L. interrogans* semble avoir conservé plus de gènes de son ancêtre saprophyte, dont la plupart lui permettraient de survivre dans le milieu extérieur [38]. *L. borgpetersenii* a un génome réduit, 3,9 Mb comparé à 4,6 Mb chez *L. interrogans*, et une plus grande proportion de transposases ou de pseudogènes, 20% comparé à 2% chez *L. interrogans*.

Ainsi, ces données suggèrent que *L. borgpetersenii* subit un processus de réduction et de spécialisation de son génome [69]. Cette réduction de taille du génome serait liée à une perte des capacités de *L. borgpetersenii* à survivre dans le milieu extérieur, et par conséquent

supporte l'hypothèse que le mode principal de transmission pour cette espèce pathogène se ferait directement d'animal à animal plutôt que *via* l'environnement [69].

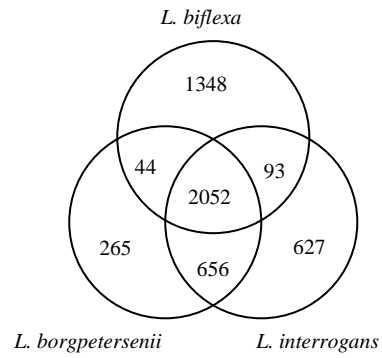


Figure 5 : Diagramme montrant le nombre de gènes uniques et partagés entre *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* (d'après [38]).

Tableau 3 : Résumé des caractères principaux des génomes des *Leptospira* pathogènes et saprophytes (d'après [38]).

Caractères	<i>L. borgpetersenii</i> ¹		<i>L. interrogans</i> ²		<i>L. biflexa</i> ³			
	CI	CII	CI	CII	CI	CII	P74	Prophage LE-1
Taille (pb)	3 614 456	317 335	4 277 181	350 181	3 603 977	277 995	74 116	73 623
Taux de G+C (%)	41,0	41,2	35,1	35,0	38,9	39,3	37,5	38,5
Pourcentage de protéines codantes	80	80	74,9	75,5	92,3	93,3	90,9	93,4
Séquences codant pour des protéines								
Séquences codantes ⁴	2 607	237	3 105	274	3 268	266	56	82
Avec une fonction assignée	1 644	135	1 817	159	2 042	141	31	19
Avec une fonction hypothétique conservée	373	32	484	34	464	43	5	2
Avec une fonction hypothétique unique	590	70	804	81	762	82	20	61
Transposases	215	26	26	0	8	1	1	0
Pseudogènes	340	28	38	3	32	1	0	0
Gènes codant pour des ARN de transfert	37	0	37	0	35	0	0	0
Gènes codant pour des ARN ribosomiques								
23S	2	0	2	0	2	0	0	0
16S	2	0	2	0	2	0	0	0
5S	1	0	1	0	2	0	0	0

¹ *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo souche L550.

² *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz.

³ *L. biflexa* sérovar Patoc souche Ames.

⁴ Non compris les transposases et pseudogènes.

4. Problématique, objectifs et plan de la thèse

La leptospirose est considérée comme une maladie émergente ou ré-émergente dans de nombreuses régions du monde. La leptospirose animale représente un enjeu sanitaire et économique important, car elle constitue un facteur de réduction de la productivité dans un cheptel infecté, compromettant ainsi la sécurité alimentaire et réduisant le revenu familial. Chez les animaux d'élevage, elle représente également un risque sanitaire du fait de son fort potentiel zoonotique.

Par conséquent, le contrôle de la leptospirose peut avoir un impact fort sur le développement d'une région ou d'un pays.

La leptospirose a été rapportée chez plus de 150 espèces mammaliennes [50]. La bactérie se maintient grâce à la colonisation chronique des reins des animaux porteurs. Un animal infecté peut montrer des symptômes de la maladie, mais il peut aussi être asymptomatique et excréter la bactérie dans ses urines, soit temporairement, soit pendant toute sa vie.

La prévalence des différents sérovars de *Leptospira* dans une population humaine est dépendante des populations de réservoirs animaux présentes localement, des sérovars qu'ils hébergent, des contacts entre l'Homme et la faune, du milieu, mais aussi des pratiques agronomiques et culturelles [73].

Les leptospires pathogènes sont dépendants pour leur survie des conditions environnementales, et d'un animal hôte réservoir, l'Homme étant un hôte accidentel.

L'étude épidémiologique de la leptospirose animale permet d'émettre des hypothèses quant aux circuits de transmission inter-espèces, dont l'Homme. La connaissance des espèces animales (sauvages et domestiques) réservoirs permet la mise en place de mesures de prévention physiques (comme la lutte collective contre les rongeurs, la gestion de l'errance animale, la mise en place de "barrières" entre les zones urbaines de plus en plus étendues et la faune sauvage dont les territoires sont réduits par l'urbanisation croissante), mais aussi vaccinales (vaccin ciblé contre les souches spécifiques circulant dans une région ou un pays).

D'un point de vue économique, la leptospirose peut avoir un impact majeur dans les cheptels et son coût en santé humaine est généralement non négligeable.

Les données concernant la maladie dans une région ne sont pas extrapolables à une autre, et les études doivent être conduites localement. Ce travail de thèse a eu pour objectif global l'étude de la leptospirose animale sur deux îles de l'Océan Indien, La Réunion et Mayotte.

Dans les îles de La Réunion et Mayotte, l'incidence de la maladie humaine est importante (respectivement 8,6 en 2009 et 25 cas pour 100 000 habitants entre 2007 et 2010) et la leptospirose constitue un problème de santé publique majeur. A Mayotte, l'augmentation du nombre de cas dus au séro groupe Mini et l'importance du nombre de souches locales isolées chez les patients [74] posent des questions épidémiologiques essentielles concernant le/les réservoir(s) de ces bactéries.

A ce jour, les travaux sur la leptospirose animale à La Réunion et Mayotte sont peu nombreux :

Tout d'abord, un rapport du Dr F. Moutou [75] de 1980, très détaillé, dresse la situation épidémiologique à La Réunion grâce à des prélèvements faits entre 1977 et 1979 sur des chiens, bovins, porcins, chevaux, et rats.

Publiée en 1983, une étude de Débarbat *et al.* [76] présente les résultats d'une enquête sérologique conduite en 1978-1979 chez des bovins et des chevaux.

La thèse de doctorat vétérinaire de H. Gares établit les principales causes d'avortement en élevage bovin laitier à La Réunion et montre que la leptospirose est un des facteurs importants d'avortement chez les bovins [77].

Enfin, un article de Sigaud *et al.* [78] présente la séroprévalence chez une espèce insectivore sauvage, le tangué.

Concernant Mayotte, nous n'avons connaissance que d'un seul travail publié sur la leptospirose animale, il s'agit de la thèse de doctorat vétérinaire d'A. Charton qui dresse un état des lieux succinct du statut sérologique de quelques espèces mahoraises vis-à-vis de la maladie [79].

Par conséquent, le premier objectif de ce travail de thèse était d'actualiser les données de séroprévalence de la maladie chez sept espèces domestiques et quatre espèces sauvages de La Réunion. A Mayotte, notre étude de séroprévalence a porté sur les chiens domestiques et errants, ainsi que sur trois espèces sauvages commensales de l'homme, le rat noir, le lémur brun, et la roussette. Ces travaux nous ont permis d'établir 1/ la liste des espèces pouvant être

en contact avec la bactérie, donc potentiellement l'excréter, et 2/ la diversité des sérogroupes circulants chez les animaux à La Réunion et Mayotte.

La recherche d'ADN génomique de *Leptospira* pathogènes dans les reins et les urines d'espèces animales par la technique d'amplification génique (PCR) n'avait jamais été réalisée ni à La Réunion, ni à Mayotte. L'originalité de notre travail de recherche a été d'établir la prévalence du portage rénal et/ou de l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez les animaux de ces deux îles et de quantifier (par PCR quantitative) la quantité de bactéries portées au niveau rénal.

La démarche adoptée pour ce travail a consisté en une étude épidémiologique descriptive transversale, comprenant un important travail de terrain sur les deux îles pour la capture des animaux sauvages et leurs prélèvements ou autopsie. A La Réunion, la collecte des échantillons biologiques sur les espèces domestiques et de rente a été conduite à la fourrière de Tampon et à l'abattoir de Saint-Pierre.

Une partie conséquente de ce travail a été dédiée au travail de laboratoire, qui a été conduit au Laboratoire de Parasitologie-Bactériologie-Virologie et Hygiène du Groupe Hospitalier Sud Réunion, pour le conditionnement des échantillons, leur identification, et leur analyse.

Pour le travail sur les animaux de Mayotte, les échantillons, issus d'un précédent travail de terrain effectué pour l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA, projet ChikAni), ont été obtenus avec l'accord de l'INRA, et les analyses sérologiques ont été conduites à l'occasion d'un séjour d'un mois à l'Unité de Biologie des Spirochètes, Centre National de Référence des Leptospiroses (CNRL), de l'Institut Pasteur de Paris.

Ce présent travail constitue la première étape établissant le statut des animaux de La Réunion et de Mayotte vis-à-vis de la leptospirose et définissant les espèces potentiellement réservoirs de la maladie. Il se structure en neuf chapitres :

Dans le **Chapitre I**, nous avons décrit l'importance sanitaire de la leptospirose en tant que zoonose majeure au niveau mondial, et dressé un état des connaissances concernant l'agent pathogène.

Dans le **Chapitre II**, nous décrivons la maladie telle qu'elle se présente chez l'Homme, espèce sensible, les méthodes de diagnostic et les principaux facteurs de risque reconnus.

Le **Chapitre III** est une discussion sur le caractère émergent (ou ré-émergent) de la leptospirose.

Dans le **Chapitre IV**, nous présentons la leptospirose animale, et ses signes cliniques chez les principales espèces domestiques et de rente. Pour conclure ce chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique des recherches conduites sur la leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales.


Le **Chapitre V** présente le contexte géographique de nos travaux de recherche, les îles de La Réunion et Mayotte et le protocole suivi pour notre étude.

Les **Chapitres VI et VII** exposent et discutent les résultats majeurs de nos travaux de recherche. Les études conduites à La Réunion et Mayotte, assez similaires dans leurs protocoles, ont permis d'établir la diversité des sérogroupes circulant sur les deux îles, la séroprévalence chez un grand nombre d'espèces animales, et la prévalence du portage rénal et de l'excrétion urinaire (à La Réunion) chez ces espèces.


Les données épidémiologiques et collections d'échantillons biologiques ainsi établies constituent les bases d'un futur travail de génotypage des ADN de *Leptospira* qui permettra d'émettre des hypothèses solides quant aux circuits de transmission de la bactérie sur ces îles.

Le **Chapitre VIII** présente une discussion générale portant dans un premier temps sur la méthodologie employée pour nos recherches. Dans un second temps, nous discutons des origines de la diversité des leptospires à La Réunion et Mayotte, notamment en présentant l'histoire du peuplement par les animaux. Enfin, nous comparons les résultats obtenus sur ces les deux îles étudiées et discutons des conséquences pratiques en santé vétérinaire et humaine.

Pour terminer, le **Chapitre IX** synthétise les résultats de nos recherches sur la leptospirose animale à La Réunion et Mayotte, et ouvre sur des nouvelles perspectives de recherche soulevées par les données obtenues au cours de ce travail.



**CHAPITRE II : LA LEPTOSPIROSE HUMAINE,
EXPRESSION CLINIQUE, DIAGNOSTIC, PRINCIPAUX
FACTEURS DE RISQUE**



1. Expression clinique

Après la contamination par les muqueuses ou la peau abrasée en contact avec de l'eau ou un sol contaminé par des leptospires excrétés *via* les urines d'animaux infectés ou directement *via* ces urines elles-mêmes, les leptospires établissent rapidement une infection systémique en traversant les barrières tissulaires et par invasion du système sanguin [9].

La majorité des infections leptospirosiques sont asymptomatiques ou subcliniques [13].

1.1. Leptospirose anictérique

La période d'incubation moyenne est de 10 jours (extrêmes : 2-30 jours) [9, 50]. La phase aigüe appelée "leptospirémique" dure de 4 à 9 jours et commence par une fièvre brutale, des céphalées, des myalgies, douleurs abdominales, anorexie, nausées et vomissements, et des suffusions conjonctivales (rougeur sans exsudat purulent). D'autres signes moins communs peuvent être observés, tels qu'une lymphadénopathie, une splénomégalie, ou une hépatomégalie.

La phase immune ou "leptospirurique", apparaît en même temps que les immunoglobulines de type M (IgM) [13]. Cette phase dure généralement 4 à 30 jours. Une leptospirurie supérieure à 140 jours a néanmoins été observée chez un patient atteint de forme grave [80].

La méningite aseptique (avec ou sans symptômes) est caractéristique de la phase immune de la maladie, et apparaît dans moins de 25% des cas [13]. Dans les régions endémiques, une proportion significative des cas de méningites aseptiques peut être reliée à la leptospirose [81]. Les patients symptomatiques présentent un mal de tête intense, bitemporal et frontal, s'accompagnant parfois de délire. Les malades présentent une hyperleucocytose restant généralement en-dessous de 500 cellules/mm³. Dans le liquide cérébro-spinal, le taux de protéines est modérément élevé, entre 50 et 100 mg/ml, tandis que la concentration de glucose reste normale [82-84].

1.2. Leptospirose ictérique

La leptospirose ictérique est une maladie grave dans laquelle l'évolution clinique est souvent rapide. En plus des symptômes aigus déjà décrits, d'autres apparaissent, tel qu'un ictère (caractérisé par un taux élevé de bilirubine sérique), une insuffisance rénale, une arythmie cardiaque, des symptômes pulmonaires, des suffusions conjonctivales avec ou sans hémorragies, une photophobie, des douleurs oculaires, une rhabdomyolyse (objectivée par une augmentation de la créatinine sérique), une adénopathie et une hépato-et/ou une splénomégalie. On observe une augmentation de la concentration sérique des marqueurs de dysfonctionnement hépatiques (transaminases et phosphatase alcaline) et rénaux (créatinine et urée), et une thrombocytopénie apparaît dans plus de 50% des cas [13]. Les douleurs abdominales ne sont pas des signes fréquents, mais peuvent indiquer une pancréatite [9, 13, 85, 86].

1.3. Formes graves

La forme la plus connue qui se développe après la phase aigüe est le syndrome de Weil, potentiellement fatal, qui s'accompagne d'une combinaison de symptômes rénaux, d'insuffisance hépatique, et d'hémorragies [9, 13, 85-87]. Dans les cas de formes sévères, le taux de mortalité va de 5% à 40% [9, 13, 88-91]. Le dysfonctionnement rénal (**Figure 6**) est caractérisé initialement par une insuffisance rénale non-oligurique et hypokaliémique très évocatrice. Dans plus de 50% des cas, on retrouve une protéinurie modérée, une leucocyturie et une hématurie [92].

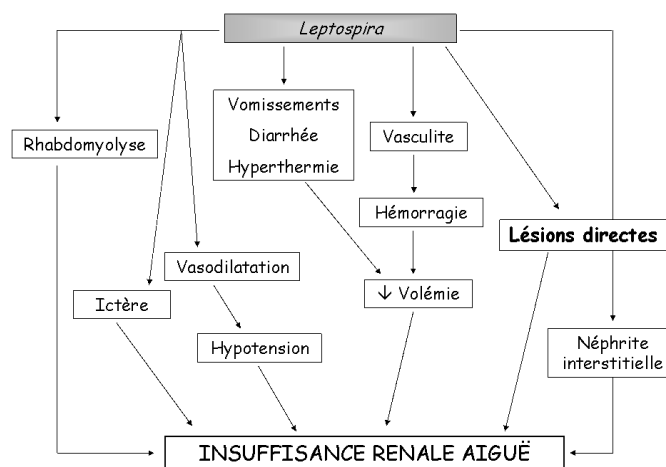


Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénie de l'insuffisance rénale aiguë lors d'infection par *Leptospira* (d'après [92]).

Le syndrome d'hémorragie pulmonaire sévère ou syndrome d'hémorragie pulmonaire associée à la leptospirose (*severe pulmonary hemorrhagic syndrome, SPHS* ou *leptospirosis-associated pulmonary haemorrhage syndrome, LPHS*) peut être une manifestation majeure de l'infection et apparaître en l'absence d'insuffisance hépatique ou rénale [93]. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en Corée et en Chine [94] et a été largement médiatisée après un important épisode clinique au Nicaragua en 1995 [93]. Ensuite, le LPHS a émergé comme une cause majeure de fièvre hémorragique dans les pays en développement [95, 96].

La principale lésion décrite dans le LPHS est un dommage aux endothéliums vasculaires provoquant des hémorragies alvéolaires [97]. A Séoul (Corée du Sud), dans une cohorte de 58 patients atteints de leptospirose, 37 (64%) avaient des signes pulmonaires visibles par radiographie. Trois caractéristiques radiographiques ont pu être relevées chez ces patients : des petits nodules denses (21 patients, 57%), des aires de consolidations confluentes (6 patients, 16%), et une densité diffuse, opaque, mal définie (10 patients, 27%) [98]. Par ailleurs, l'atteinte interstitielle était la plus fréquente des anomalies observées chez 134 patients atteints de leptospirose et hospitalisés à La Réunion [99].

Récemment, plusieurs études ont observé un dépôt linéaire d'immunoglobulines et du complément le long de la membrane basale alvéolaire et dans les espaces intra-alvéolaires des tissus pulmonaires affectés [50, 100], ce qui suggère l'implication d'un processus auto-immun [24]. Néanmoins, les hémorragies pulmonaires sont probablement multifactorielles et de récentes études réfutent l'implication d'un phénomène auto-immun [101]. En effet, le dépôt d'anticorps et du complément sur les septums alvéolaires n'est pas une observation constante dans les cas de leptospirose humaine [102]. La pathogénie de l'affection pulmonaire leptospirosique est actuellement étudiée et deux principaux mécanismes apparaissent à ce jour comme les plus probablement impliqués: l'action de toxines et la réponse immunitaire de l'hôte [103].

L'incidence de l'atteinte pulmonaire dans les cas de leptospirose varie de 20% à 70% et le nombre de diagnostics de leptospirose lié à cette expression clinique est en augmentation ces dernières années [103]. Par ailleurs, l'apparition soudaine du LPHS dans certaines localisations géographiques [104] suggère que l'introduction de clones avec une virulence accrue pourrait contribuer à l'émergence récente de ce syndrome [50].

Les autres manifestations hémorragiques observables sont une hématurie, une hématomèse, la présence de méléna, un épistaxis, des pétéchies, des ecchymoses, des

saignements au niveau des sites de prélèvement sanguin et un saignement subarachnoïde [103].

Plusieurs facteurs de pronostic de la sévérité de l'atteinte leptospirosique ont été identifiés et sont utilisés comme éléments de pronostic chez des patients hospitalisés. Herrmann-Storck *et al.* [105] ont mis en évidence par analyse multivariée neuf facteurs associés à la sévérité de la leptospirose clinique chez les patients (dans l'ordre des odds ratios décroissants) : des antécédents d'hypertension chronique, une hyperamylasémie, des antécédents d'alcoolisme chronique, des anormalités à l'auscultation pulmonaire, un ictère, une oligurie ou anurie, un début de l'antibiothérapie tardive (> 10 jours après le début des symptômes), un taux d'aspartate amino-transférase élevé, et des troubles de la conscience. A La Réunion, Paganin *et al.* [106] ont montré que les facteurs significativement reliés à la sévérité des signes cliniques chez les patients présentant une atteinte pulmonaire sévère étaient (dans l'ordre des odds ratios décroissants) : la défaillance respiratoire, l'état de choc, une créatininémie supérieure à 200 $\mu\text{mol/l}^5$, et un âge supérieur à 46 ans. Par ailleurs, Marotto *et al.* [107, 108] ont démontré que chez les cas hospitalisés de leptospirose, cinq facteurs permettaient de prédire l'apparition d'un syndrome de détresse respiratoire et étaient liés à la probabilité de décès : une kaliémie élevée (> 4,0 mmol/l), une créatininémie élevée (> 265,2 $\mu\text{mol/l}$), une fréquence respiratoire faible, un état de choc à la présentation à l'hôpital, et un score faible sur l'échelle de Glasgow⁶.

1.4. Symptômes oculaires

L'uvéite a été pour la première fois rapportée par Weil en 1886, dans l'article original décrivant la maladie. L'incidence des uvéites dues à la leptospirose est peu connue chez l'homme (3% à 92%) [109], mais cette forme est l'expression clinique la plus fréquente chez les chevaux [110]. L'uvéite due à la leptospirose est commune en zone tropicale. Après 4 à 7 jours de bactériémie, les leptospores sont rapidement éliminés par le système immunitaire de tous les tissus de l'hôte, sauf des localisations privilégiées, telles que le cerveau et les yeux. Il

⁵ Valeurs usuelles de la créatininémie chez l'homme : 80 à 110 $\mu\text{mol/l}$; chez la femme : 60 à 95 $\mu\text{mol/l}$.

⁶ L'échelle de Glasgow, ou score de Glasgow (Glasgow coma scale, GCS), est un indicateur de l'état de conscience. Ce score est étroitement corrélé à la gravité des comas. C'est une échelle allant de 3 (coma profond) à 15 (personne parfaitement consciente) et qui s'évalue sur trois critères : ouverture des yeux, réponse verbale, réponse motrice.

en résulte des désordres immunologiques [111], tels que des uvéites auto-immunes qui se manifestent 2 jours à 4 ans après l'infection systémique. Habituellement, les uvéites commencent dans les 3-6 mois après la maladie clinique initiale [109].

L'uvéite leptospirosique est, en effet, le résultat d'un mécanisme auto-immun. Verma *et al.* [111] ont montré que les lipoprotéines LruA et LruB de *Leptospira* sont exprimées au niveau des yeux des patients (ou chevaux) atteints de leptospirose. Les anticorps dirigés contre LruA réagissent aussi avec la protéine α -crystallin B et la vimentine du cristallin, tandis que les anticorps dirigés contre LruB croisent avec la protéine rétinienne β -crystallin B2.

1.5. Complications

L'origine de la thrombocytopénie observée dans la leptospirose est très controversée. En effet, l'intervention d'un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est discutée [112], certains auteurs montrent que le phénomène de CIVD n'intervient pas dans l'apparition de la thrombocytopénie et des hémorragies dans le cadre d'une leptospirose [103, 113-115], alors que d'autres affirment que la CIVD est à l'origine même du syndrome hémorragique [101, 116, 117]. Enfin, la thrombocytopénie peut aussi avoir pour origine un phénomène auto-immun avec intervention d'anticorps anti-plaquettaires [118].

La leptospirose est aussi une cause de mortinatalité ou d'avortement chez la femme enceinte [119-122]. Carles *et al.* [123] rapportent 11 cas de Guyane Française, parmi lesquels 50% de morts fœtales ont été observées. Baytur *et al.* [124] rapportent une grossesse compliquée d'un syndrome de Weil avec accouchement prématuré et mort fœtale (la mère s'est rétablie après un traitement adapté). Shaked *et al.* [125] ont décrit 15 cas de leptospirose chez des femmes enceintes, ayant abouti à huit avortements, deux naissances de bébés sains, et quatre naissances de bébés atteints de leptospirose clinique (dans un cas le statut du fœtus était inconnu). Il semble donc que lorsqu'une leptospirose se déclare dans les premiers mois de grossesse, l'issue la plus probable est l'avortement spontané [125], une forme clinique très répandue chez certains mammifères de rente (porcins, bovins). Néanmoins, Chedraui et San Miguel [126] décrivent un cas de leptospirose à 28 semaines de grossesse qui a été traité avec succès avec de la pénicilline G permettant la naissance à terme d'un enfant en bonne santé.

Des complications neurologiques sévères telles que le coma, une méningo-encéphalite, une hémiplégie, ou un syndrome de Guillain-Barré ont été décrites même si elles sont très rares [82-84].

Le **Tableau 4** résume le polymorphisme des manifestations de la leptospirose chez l'Homme :

Tableau 4 : Synthèse des signes cliniques de la leptospirose (d'après [85]).

Hyperthermie non spécifique	Non-ictérique, céphalée, frissons, douleur abdominale, suffusion conjonctivale, myalgies.
Méningite	Liquide cérébro-spinal normal. La maladie peut s'auto-limiter ou progresser vers l'une des formes décrites ci-dessous. Peut être facilement confondue avec la dengue, la fièvre jaune, le paludisme, ou d'autres syndromes fébriles.
Syndrome de Weil	Peut suivre la forme décrite ci-dessus ou apparaître seule. Liquide cérebrospinal avec pléocytose, Bénigne, aseptique, s'auto-limite.
Forme pulmonaire sévère	Ictère flamboyant même si la défaillance hépatique est faible. Insuffisance rénale sévère, souvent manifestations hémorragiques mineures. La dialyse est la thérapie standard de soutien. Forte mortalité (> 10%).
	Pneumonie hémorragique. Peut apparaître en l'absence d'ictère ou comme un élément complétant le syndrome de Weil. Syndrome de détresse respiratoire et hémorragies pulmonaires soudaines et massives induisant une forte mortalité (>50%) même si les traitements optimums sont administrés. Doit être distinguée d'une pneumonie atypique et d'un syndrome pulmonaire lié à une infection par un hantavirus.

1.6. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel varie en fonction de la forme clinique de la maladie. Le syndrome grippal anictérique doit être différencié de la dengue ou d'un accès palustre à *Plasmodium vivax* [127-129], de la grippe ou d'une infection par le virus du Chikungunya. Pour la forme sévère de leptospirose, le diagnostic différentiel doit être fait avec une hépatite virale, la fièvre jaune, un accès palustre à *Plasmodium falciparum*, la dengue, une infection par les hantavirus [130] ou d'autres fièvres hémorragiques [98], le typhus et autres rickettsioses [94, 128], la typhoïde [129], une endocardite et une maladie auto-immune [73].

La "phase immune" de la leptospirose prend souvent la forme d'un syndrome de méningite aseptique, et doit donc être différenciée des autres causes étiologiques de méningites (virales notamment) [73]. La forme pulmonaire de leptospirose doit être distinguée d'une pneumonie atypique, d'une bronchopneumonie, de la tuberculose [96, 98, 131], de l'histoplasmosse [96], ou d'un syndrome pulmonaire d'infection par un hantavirus [130].

2. Diagnostic biologique

Pendant la phase d'incubation (qui dure 2 à 20 jours [13]), les leptospires peuvent être retrouvés dans le sang et le liquide cérébro-spinal. Les leptospires peuvent être présents dans les urines à partir de 5-7 jours après le début des symptômes. Les IgM apparaissent vers la fin de la première semaine de la maladie, tandis que les IgG apparaissent environ 8-12 jours après le début des symptômes (**Figure 7**).

Observation bactériologique directe : les leptospires peuvent être observés dans le sang, ou le liquide cérebrospinal au cours de la première semaine de la maladie, dans les urines à partir du dixième jour de la maladie. L'examen des liquides biologiques peut être effectué directement avec un microscope à fond noir. Pour des examens histologiques, on observe généralement après coloration argentique [132], ou par immunofluorescence [9, 13, 73, 86]. Le diagnostic par observation directe manque de sensibilité et de spécificité [13] et nécessite un observateur entraîné [127, 133].

Culture : Les leptospires peuvent être isolés à partir du sang et parfois du liquide cérebrospinal dans la première semaine de la maladie, et à partir des urines lors des deux semaines suivantes ("phase leptospirurique") [73]. Le milieu de culture le plus utilisé est le milieu EMJH (Ellinghausen - McCullough modifié par Johnson et Harris), qui est commercialisé. La culture doit se faire dans des conditions stériles (prélèvement et ensemencement), elle doit être faite dans les quatre heures suivant le prélèvement et ne peut se faire sur échantillons congelés. Ce test est très peu sensible, lourd à mettre en œuvre et prend plusieurs semaines [73, 87, 127], c'est pourquoi, même s'il reste le "gold standard", il tend à être moins utilisé pour le diagnostic de routine.

Sérologie : Test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test*, **MAT**). Le MAT (ancienne réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit), est actuellement le test sérologique de référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose [134]. Il s'agit d'un test complexe à mettre en œuvre et à interpréter [13]. Il nécessite l'entretien au laboratoire d'un panel de souches en culture [134]. Le MAT permet de mettre en évidence les anticorps agglutinants (IgM et IgG) dans le sérum d'un patient en mettant en contact différentes dilutions de sérum avec des leptospires vivants. Les anticorps anti-leptospires présents dans le sérum vont agglutiner les leptospires, cette réaction peut être observée au

microscope à fond noir. Le MAT permet le plus souvent de déterminer, avec une certitude raisonnable, le sérotype infectant [13]. Le titre agglutinant d'un sérum est la plus forte dilution de sérum pour laquelle 50% des leptospires sont agglutinés [13]. Les patients produisent généralement des anticorps contre le sérotype infectant, cependant il existe des réactions croisées avec d'autres sérotypes (coagglutinines), en particulier au début de l'infection, qui peuvent parfois être plus fortes que la réaction avec le sérotype infectant (on parle de réaction paradoxale) [13, 135, 136].

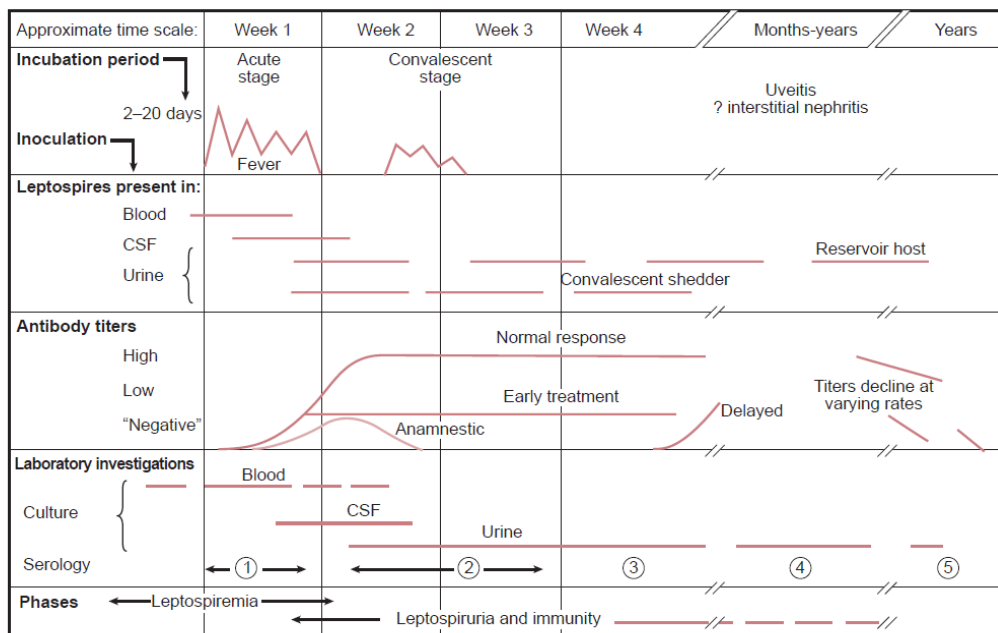
Le MAT permet un diagnostic assez tardif puisque les anticorps n'apparaissent que vers le 7-10^{ème} jour de la maladie [128]. Le seuil de positivité d'infection aigüe chez l'homme, fixé par le Centre National de Référence des Leptospiroses (Institut Pasteur de Paris), est de 1:100 en France métropolitaine, 1:400 dans les régions ultrapériphériques intertropicales (La Réunion, Mayotte, Nouvelle-Calédonie...) qui sont des zones d'endémie.

Chez les animaux, les seuils de positivité considérés sont très variables en fonction des études, des espèces et de la localisation géographique, allant de 1:10 à 1:1600 [127, 137-141].

La gamme d'antigènes à tester pour le MAT doit inclure des sérotypes représentatifs de tous les sérotypes, ainsi que des sérotypes circulant localement. Pour un sérum positif, le titre de la réaction d'agglutination envers une souche isolée localement est souvent plus élevé que les titres envers les souches de référence pour les sérotypes du même sérotype. Par ailleurs, il est commun d'inclure une souche non pathogène de *L. biflexa* dans le panel d'antigènes car cette souche présente des agglutinations croisées avec la plupart des souches pathogènes et permet de mettre en évidence des infections par des souches appartenant à des sérotypes non testés [9, 13].

Autres tests sérologiques : il existe de nombreux autres tests sérologiques pour le diagnostic de la leptospirose (test de fixation du complément, test de lyse des érythrocytes sensibilisés, test d'agglutination macroscopique, immunofluorescence, hémagglutination indirecte, dot-ELISA, IgM dipstick, agglutination sur latex...) [13], mais le plus utilisé est le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM. Il existe des kits commercialisés, mais l'ELISA peut aussi être fait avec une mixture d'antigènes "maison". Des antigènes recombinants tels que LipL32 [142-144], Loa22 [143], OmpL1 [47], LipL41 [47], LipL36 [47] ou Hsp58 (heat shock protein) [47] ont récemment été utilisés.

Amplification génique : la technique de polymérase chain reaction (PCR) est aujourd'hui une technique de routine pour le diagnostic précoce de la maladie. La PCR peut être "conventionnelle", c'est-à-dire suivie d'une migration sur gel d'agarose, ou en temps réel. Différents gènes peuvent être ciblés : *rrs* (ADNr 16S) [145, 146], *IS1533* [147], *lipL32/hap1* [145, 148-150], *secY* [151], ADNr 23S [152], *lfb1* [153], etc.



CSF: cerebrospinal fluid (liquide céphalo-rachidien)

Figure 7 : Nature biphasique de la leptospirose et investigations cliniques pertinentes aux différents stades de la maladie (d'après [13]).

3. Facteurs de risque de leptospirose

3.1. Facteurs de risque liés au climat

Le caractère saisonnier de la leptospirose a été décrit dans la plupart des régions du monde, avec une incidence significativement plus élevée lors des mois pluvieux, notamment lors de la saison des pluies en zones tropicales [154-161].

Les fortes pluies et les inondations augmentent le risque de leptospirose en amenant les bactéries et leurs hôtes animaux en étroite contact avec les hommes [162]. De nombreux épisodes de leptospirose ont été rapportés dans différentes régions du monde, suite à des périodes de fortes pluies, notamment en Inde [163-165], au Laos [166], en Indonésie [167], en Italie [168], au Brésil [169], au Nicaragua [93], à Puerto Rico [170], aux Etats-Unis [171], en

Nouvelle-Calédonie [172], en France métropolitaine [173], au Brésil [174], à Trinidad et Tobago [154], en Polynésie française [175], en Guadeloupe [176], en Argentine [177], et à La Réunion [156] par exemple.

En Argentine, les inondations apparaissent comme le facteur de risque majeur de leptospirose, devant l'activité professionnelle. A Bombay, en Inde, une augmentation d'un facteur huit du nombre de cas a été rapporté après une forte inondation en 2005 [164]. A Manille, aux Philippines, une épidémie importante de leptospirose a été observée après une tempête tropicale et des inondations en octobre 2009, avec un taux de mortalité s'élevant à 8,6% [178].



Article 1 : Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, Michault, A. 2011. Seasonality of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. PLoS ONE, 6(5): e20377.

Seasonality of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and Its Association with Meteorological Data

Amélie Desvars^{1,2,5*}, Sylvaine Jégo³, Frédéric Chiroleu³, Pascale Bourhy⁴, Eric Cardinale^{1,2}, Alain Michault⁵

1 Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMR CMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte-Clotilde, La Réunion, France, **2** Centre Régional de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, La Réunion, France, **3** UMR Peuplement Végétal et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion, France, **4** Institut Pasteur, Centre National de Référence des Leptospiroses, Unité Postulante de Biologie des Spirochètes, Paris, France, **5** Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier de La Réunion (CHR), Saint-Pierre, La Réunion, France

Abstract

Background: Leptospirosis is a disease which occurs worldwide but particularly affects tropical areas. Transmission of the disease is dependent on its excretion by reservoir animals and the presence of moist environment which allows the survival of the bacteria.

Methods and Findings: A retrospective study was undertaken to describe seasonal patterns of human leptospirosis cases reported by the Centre National de Références des Leptospiroses (CNRL, Pasteur Institute, Paris) between 1998 and 2008, to determine if there was an association between the occurrence of diagnosed cases and rainfall, temperature and global solar radiation (GSR). Meteorological data were recorded in the town of Saint-Benoît (Météo France "Beaufonds-Miria" station), located on the windward (East) coast. Time-series analysis was used to identify the variables that best described and predicted the occurrence of cases of leptospirosis on the island. Six hundred and thirteen cases were reported during the 11-year study period, and 359 cases (58.56%) were diagnosed between February and May. A significant correlation was identified between the number of cases in a given month and the associated cumulated rainfall as well as the mean monthly temperature recorded 2 months prior to diagnosis ($r=0.28$ and $r=0.23$ respectively). The predictive model includes the number of cases of leptospirosis recorded 1 month prior to diagnosis ($b=0.193$), the cumulated monthly rainfall recorded 2 months prior to diagnosis ($b=0.145$), the average monthly temperature recorded 0 month prior to diagnosis ($b=3.836$), and the average monthly GSR recorded 0 month prior to diagnosis ($b=-1.293$).

Conclusions: Leptospirosis has a seasonal distribution in Reunion Island. Meteorological data can be used to predict the occurrence of the disease and our statistical model can help to implement seasonal prevention measures.

Citation: Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, et al. (2011) Seasonality of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and Its Association with Meteorological Data. PLoS ONE 6(5): e20377. doi:10.1371/journal.pone.0020377

Editor: David M. Ojcius, University of California Merced, United States of America

Received: January 25, 2011; **Accepted:** April 30, 2011; **Published:** May 31, 2011

Copyright: © 2011 Desvars et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amelie.desvars@cirad.fr

Introduction

With more than 500,000 cases per year, leptospirosis is one of the most widespread diseases in the world [1]. *Leptospira* spp. (phylum Spirochaetes) are bacteria composed of both saprophytic and pathogenic members, such as *Leptospira biflexa* sensu lato and *Leptospira interrogans* sensu lato, respectively [2]. Leptospires are motile, aerobic and slow-growing bacteria that have an optimal growth temperature of 30°C and are able to survive in soil and water for long periods [2]. Although asymptomatic infections are common in humans, the disease can also be lethal [3]. The incidence is significantly higher in tropical countries than in temperate regions, mainly because of the longer survival period of leptospires in a warm, humid environment [4]. Infection in humans is either via direct contact with the urine of an infected

animal or indirectly via the contaminated environment [4]. The latter is the major source of leptospirosis infections in tropical areas [5]. Rodents are the most efficient epidemiological reservoirs for pathogenic leptospires [6,7] but dogs are also a significant reservoir responsible for human infection in tropical countries [8,9]. Many sporadic cases of leptospirosis in tropical regions occur following exposure during simple day-to-day activities [10,11]. Many infections result from walking barefoot in damp conditions or gardening with bare hands [12]. Moreover, recent outbreaks such as the 1998 Lake Springfield Triathlon [13] and the 2000 Borneo Eco-Challenge [14] outbreaks revealed the risk of exposure to infection to leisure activities.

As the growth of *Leptospira* is very slow, the culture of blood or urine samples in a specific medium is rarely conducted for clinical diagnosis. The microscopic agglutination test (MAT), is the

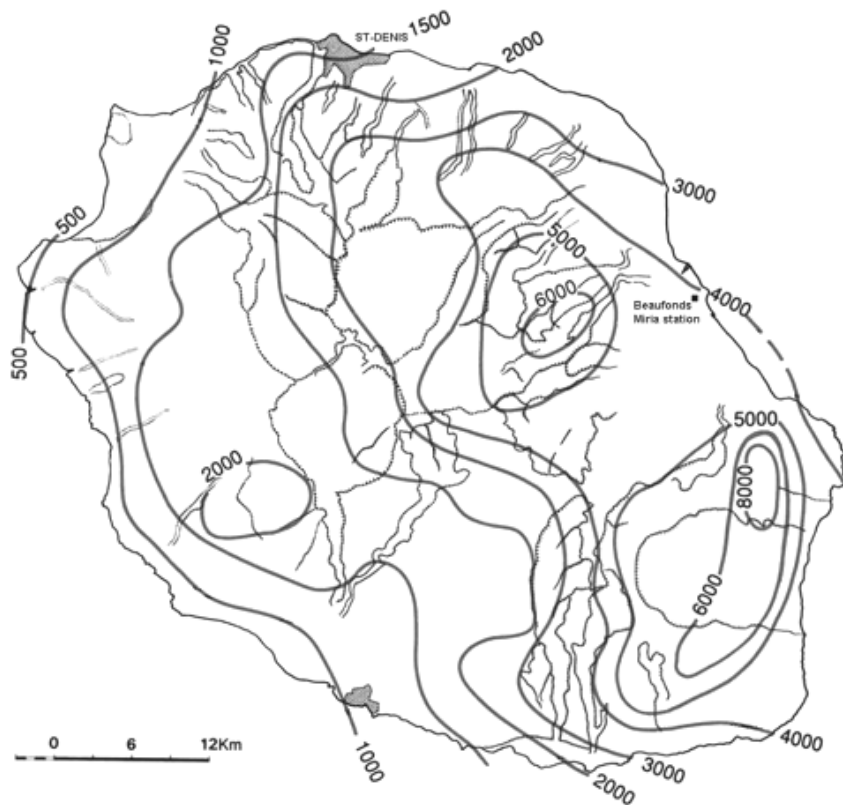


Figure 1. Annual rainfall in Reunion Island (from [21]). Isohyetal lines and location of the Météo France meteorological Beaufonds-Mira station.

doi:10.1371/journal.pone.0020377.g001

serological standard reference test for diagnosing leptospirosis. A positivity threshold of 1/100 is used in metropolitan France but, since 1999, the threshold of 1/400 has been used in high-risk French overseas territories such as Reunion Island [15]. Since 1997, DNA amplification has also been used in Reunion Island as a standard method of diagnosis [16]. Polymerase-chain reaction (PCR) with specific *Leptospira* primers allows the bacteria in patients' serum to be detected from the onset of symptoms to the appearance of antibodies, thus increasing the rate of early diagnosis in the island.

Diagnosis of leptospirosis is a reliable, standard procedure. Nevertheless, there is a need for a leptospirosis early warning system to predict when and where leptospirosis epidemics may occur. Unusual meteorological conditions, such as high rainfall, flooding or El Niño effects are often cited retrospectively as the precipitating factors for epidemics [17,18,19,20] and might be useful in predicting the number of cases of leptospirosis.

In this study, we present leptospirosis cases in Reunion Island from 1998 to 2008. The objectives of this study were to describe seasonal patterns of leptospirosis reported in Reunion Island, and to determine if cases were associated with rainfall, temperature and global solar radiation (GSR). Results are discussed according to geographical, meteorological and socio-economical aspects. Our model showed that data on rainfall, temperatures and GSR could be successfully used to predict the number of cases in a given month. Consequently, if risk periods can be predicted, early steps

can be taken to prevent infections, thus reducing the monthly number of cases.

Materials and Methods

Presentation of Reunion Island

The island is situated in the south-west Indian Ocean at 55°30' East and 21°05' South. It is 800 km East of Madagascar. The island is part of the Mascareignes archipelago and covers 2,510 km² [21]. According to the 2006 census [22], Reunion Island has 781,962 inhabitants, with a population density of 312.3 people per km². The population is concentrated in coastal towns, while the south-eastern area containing the Piton de la Fournaise volcano is sparsely populated [22]. The climate is tropical and temperatures are the highest from January to March, with a cool season between July and September. The eastern coast (or "windward" coast), has rainfall of around 2,000 mm per year, whereas the western coast (or "leeward" coast), has an annual rainfall of less than 2,000 mm (Figure 1) [21].

Data collection

Human cases. Leptospirosis has been a notifiable disease in France since 1986, but data about the disease are centralized and diffused by the Centre National de Références des Leptospiroses (CNRL) of the Pasteur Institute (Paris). The monthly number of cases was found in the annual reports of the CNRL (<http://www>.

pasteur.fr/recherche/Leptospira/LeptospiraF.html), which reports cases confirmed by at least one positive biological test (patients with a MAT titer $\geq 1/400$, or with a positive PCR result, or with a positive blood culture). Based on voluntary participation, data from local hospitals are transmitted yearly to the CNRL. At the time of our analysis, serological data for Reunion Island were available for the period 1998–2009.

Climatic data. Meteorological data was obtained from the station of “Beaufonds-Miria” (run by Météo France, 21.0466°S.; 55.7266°E.) in Saint-Benoît, a town located on the eastern coast (altitude 7 m). We chose this station because the eastern coast presents the highest seroprevalence of the disease [23]. We collected the following data: minimum, maximum and average temperature in degrees Celsius; cumulated, average, minimum and maximum rainfall in millimetres and GSR (the incident radiation of short wavelength an horizontal area receives [21]) in Joules per square centimetre.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted with the TSA package of the statistical software R (<http://www.stat.uiowa.edu/~kehan/TSA.htm>) [24]. Time-series analysis [25] was used to identify temporal patterns in the series of cases of leptospirosis, and the relationship between rainfall, temperature or GSR, and the diagnosis of leptospirosis in Reunion Island between 1998 and 2008. Time-series analysis is a method that allows inferences to be drawn from data consisting of serial observations which are correlated over time, by incorporating correlated error terms into the model that is used [25]. To stabilize the variance, a log transformation of each observation was made for further analysis. Autocorrelation (ACF) and partial autocorrelation (PACF) functions were calculated to represent seasonal and cyclical trends in time-series of cases of leptospirosis. After removing the seasonality of each series, the stationarity of each one was tested using ACF and PACF, and using the augmented Dickey-Fuller test. An Auto-Regressive Integrated Moving-Average with cXogeneous variables model, ARIMAX (p, d, q), was fitted to the time-series of cases of leptospirosis, with p the number of autoregressive parameters, d the number of differencing passes, and q the number of moving average parameters. The study

of cross-correlation functions between the time-series of cases of leptospirosis and each meteorological time-series allowed the potential lags to be identified in the different models tested [25]. The best-fitting model was selected based on the goodness-of-fit criterion, Akaike’s Information Criterion (AIC), and coefficients were tested using Student’s test.

Results

The 11-year data set consists of human cases of leptospirosis reported each month to the CNRL by hospitals in Reunion Island, and meteorological data from a station in Saint-Benoît collected between 1st January 1998 and 31st December 2008.

Meteorological data

Annual and monthly meteorological data for the 11-year study period are summarized in **Tables 1** and **2** respectively. Cumulated rainfall, mean rainfall and maximum rainfall were highly correlated with minimum temperature, mean temperature and maximum temperature, >0.80 and >0.95 respectively (*data not shown*). Consequently, we chose to keep only the cumulated rainfall and mean temperature variables for further analysis.

The minimum monthly cumulated rainfall over the period from 1998 to 2008 was 17.6 mm (September 2001) and the maximum was 1,520.4 mm (February 1998). On average (\pm S.E.), the monthly mean temperature between 1998 and 2008 was $23.16 \pm 0.19^\circ\text{C}$ and the average monthly global radiation was $1,806.11 \pm 30.63 \text{ J/cm}^2$. December, January, February, and March were the wettest and warmest months, while October, August, and June were the driest months over the study period. July and August were the coolest months and the GSR was the highest ($>2000 \text{ J/cm}^2$) from October to January.

Human cases of leptospirosis in Reunion Island between 1998 and 2008

There were 613 cases reported in Reunion Island between 1998 and 2008 (**Table 3**). The year with the highest number of cases was 2004, with 91 reported cases, while 1999 had the lowest number, 25 reported cases. The annual mean number of cases for

Table 1. Summary of the annual meteorological data in Reunion Island.

Year	Cumulated annual rainfall, in mm	Maximum monthly rainfall, in mm (month)	Minimum monthly rainfall, in mm (month)	Average monthly rainfall, in mm	Mean monthly minimum temperature, in °C (\pm S.E.)	Average annual temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean monthly maximum temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean annual solar global radiation, in Joules/cm ² (\pm S.E.)
1998	3412	1520.4 (Feb)	62.6 (Mar)	11.47 (± 5.07)	19.52 (± 0.67)	23.02 (± 0.64)	27.23 (± 0.60)	1811.68 (± 128.00)
1999	3039.8	916.6 (Mar)	27 (Oct)	8.41 (± 2.36)	18.86 (± 0.57)	22.67 (± 0.55)	27.07 (± 0.53)	1895.97 (± 107.77)
2000	2714.8	594 (Feb)	41.4 (Sep)	7.51 (± 1.64)	19.1 (± 0.63)	23.73 (± 0.62)	26.99 (± 0.57)	1831.12 (± 100.60)
2001	2145	480.6 (Jan)	17.6 (Sep)	6.7 (± 1.76)	19.38 (± 0.61)	23.07 (± 0.62)	27.4 (± 0.64)	1830.57 (± 87.86)
2002	2780.8	410.6 (Mar)	72.6 (Oct)	8.22 (± 1.17)	19.41 (± 0.59)	23.05 (± 0.61)	27.18 (± 0.58)	1808.35 (± 106.88)
2003	2752	643.2 (Apr)	59.2 (Oct)	8.71 (± 1.77)	19.76 (± 0.69)	23.43 (± 0.64)	27.95 (± 0.62)	1777.88 (± 114.39)
2004	4465.2	966.2 (Dec)	86.6 (Oct)	12.4 (± 2.29)	19.72 (± 0.67)	23.25 (± 0.66)	28.01 (± 0.66)	1685.18 (± 90.20)
2005	3679.2	826.2 (Feb)	76 (Jul)	10.45 (± 2.46)	19.58 (± 0.72)	23.3 (± 0.70)	28.24 (± 0.68)	1760.97 (± 102.22)
2006	2795.2	629.8 (Feb)	78.4 (Oct)	8.08 (± 1.72)	20.05 (± 0.61)	23.44 (± 0.62)	27.77 (± 0.65)	1819.22 (± 105.34)
2007	2981.8	782 (Jan)	37.4 (Nov)	8.27 (± 2.31)	19.87 (± 0.67)	23.44 (± 0.64)	28.22 (± 0.58)	1788.03 (± 99.20)
2008	3434.4	632.2 (Jan)	82.2 (Apr)	9.68 (± 1.63)	19.57 (± 0.66)	23.38 (± 0.66)	28.51 (± 0.63)	1858.21 (± 101.36)

Presentation of the yearly data on cumulated and maximum rainfall, minimum, maximum, and mean temperature, and mean global solar radiation, from 1 January 1998 to 31 December 2008 (Beaufonds-Miria station, Saint-Benoît). doi:10.1371/journal.pone.0020377.t001

Table 2. Summary of monthly meteorological data.

Month	Mean of monthly cumulated rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean of maximum rainfall, in mm (\pm S.E.)	Mean of minimum temperature, in °C (\pm S.E.)	Average monthly temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean of maximum temperature, in °C (\pm S.E.)	Mean of monthly global radiation in Joules/cm ² (\pm S.E.)
January	439.40 (\pm 51.48)	14.66 (\pm 1.60)	120.75 (\pm 22.47)	22.15 (\pm 0.21)	25.79 (\pm 0.15)	30.10 (\pm 0.20)	2091.78 (\pm 61.03)
February	603.04 (\pm 107.37)	23.35 (\pm 4.69)	163.73 (\pm 27.39)	22.49 (\pm 0.22)	25.98 (\pm 0.15)	30.30 (\pm 0.23)	1905.64 (\pm 78.57)
March	366.56 (\pm 71.05)	12.88 (\pm 2.20)	74.33 (\pm 14.66)	21.95 (\pm 0.18)	25.51 (\pm 0.16)	30.00 (\pm 0.24)	1892.59 (\pm 36.62)
April	290.29 (\pm 47.84)	10.48 (\pm 1.82)	86.27 (\pm 19.71)	20.81 (\pm 0.23)	24.52 (\pm 0.16)	29.24 (\pm 0.24)	1711.15 (\pm 48.98)
May	172.55 (\pm 34.00)	6.06 (\pm 1.22)	39.29 (\pm 10.28)	19.36 (\pm 0.26)	22.91 (\pm 0.16)	27.55 (\pm 0.17)	1391.38 (\pm 46.34)
June	153.15 (\pm 27.50)	5.20 (\pm 0.93)	47.05 (\pm 11.90)	17.27 (\pm 0.17)	21.04 (\pm 0.15)	25.90 (\pm 0.19)	1336.56 (\pm 11.34)
July	209.73 (\pm 28.96)	7.05 (\pm 0.92)	58.60 (\pm 9.94)	16.71 (\pm 0.19)	20.25 (\pm 0.12)	24.79 (\pm 0.16)	1346.75 (\pm 27.95)
August	148.15 (\pm 18.95)	4.94 (\pm 0.59)	38.00 (\pm 8.20)	16.85 (\pm 0.15)	20.41 (\pm 0.09)	25.00 (\pm 0.22)	1572.64 (\pm 23.44)
September	164.35 (\pm 29.48)	5.62 (\pm 1.01)	44.80 (\pm 7.06)	17.47 (\pm 0.17)	21.20 (\pm 0.13)	25.77 (\pm 0.21)	1910.19 (\pm 42.99)
October	96.84 (\pm 14.41)	3.20 (\pm 0.45)	27.85 (\pm 4.22)	18.29 (\pm 0.15)	22.04 (\pm 0.14)	26.52 (\pm 0.20)	2114.38 (\pm 43.97)
November	160.07 (\pm 31.24)	5.37 (\pm 1.04)	52.16 (\pm 13.55)	19.71 (\pm 0.16)	23.43 (\pm 0.20)	27.78 (\pm 0.32)	2196.36 (\pm 51.76)
December	305.00 (\pm 73.18)	10.15 (\pm 2.33)	85.55 (\pm 18.27)	21.25 (\pm 0.13)	24.88 (\pm 0.20)	29.32 (\pm 0.28)	2203.86 (\pm 74.20)

Presentation of monthly data on cumulated and mean rainfall, minimum, maximum, and average temperature, and global solar radiation, 1 January 1998 to 31 December 2008 (Beaufonds-Miria station, Saint-Benoit).
doi:10.1371/journal.pone.0020377.t002

this 11-year period was 55.73 ± 6.61 , and 359 cases (58.56%) were diagnosed between February and May (Figure 2). On average, the number of cases per month between 1998 and 2008 was 4.64 ± 0.83 . This number varied greatly over the period studied, from 0 to 27. The annual incidence of leptospirosis in Reunion Island ranged from 4.85 to 11.95 cases per 100,000 people between 1998 and 2008 (Table 3). The highest incidence was observed between 2003 and 2005, and then decreased by more than 50% to the end of the period.

The time-series of cases and the corresponding cumulated monthly rainfall are shown in Figure 3, while Figures S1 and S2 represent the time-series of cases and the corresponding average monthly temperature and GSR respectively.

Plots of ACF and PACF indicated a seasonal (annual) and cyclical pattern of diagnosis of cases of leptospirosis with an autoregressive order of less than 12 months. The time-series of cases appeared stationary after elimination of the calendar effects and removing of the seasonality (p -values of the augmented Dickey-Fuller tests were <0.05 for all corrected series).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and monthly cumulated rainfall lagged by 0 and 2 months, and the strongest correlation ($r = 0.28$, $p < 0.01$) was found with the average monthly rainfall recorded 2 months previously (Table 4).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and average monthly temperature lagged by 0 and 2 months, and the strongest correlation ($r = 0.23$, $p < 0.01$) was found with the average temperature recorded 2 months previously (Table 4).

Significant positive cross-correlations were detected between monthly cases of leptospirosis and monthly minimum temperature recorded 0, 1, 2, 3, and 4 months previously, while significant positive cross-correlations were detected between cases of leptospirosis and monthly maximum temperature recorded 0, 1, and 2 months previously (Table 4). Significant negative cross-correlations were detected between the number of cases of leptospirosis and average monthly GSR measured 9 and 10 months previously (Table 4). Nevertheless, correlations between GSR and the number

of cases with a lag of 9 and 10 months are not biologically relevant, and consequently were not considered in the model. However, GSR measured 0 months prior to diagnosis was tested in the model to determine its relevance in the predictive model.

The best fitting ARIMAX model of cases of leptospirosis ($p = 1$, $d = 0$, $q = 0$; AIC = 208.29, estimated variance = 0.26, d.f. = 129) included the cases diagnosed in the previous month. Both the cumulated monthly rainfall and average monthly temperature recorded 0, 1, 2, and 3 months prior to diagnosis, as well as the average monthly GSR recorded 0 month prior to diagnosis were associated the model. Only the cumulated rainfall at a 2 months lag and the average temperature and GSR both at a 0 month lag were used in the model (Table 5). ACF and PACF of the residuals of the model appeared stationary (*not shown*) and the augmented Dickey-Fuller test confirmed the stationarity ($p = 0.02$). Between 1998 and 2008, the correlation coefficient of our predictive model with the observed data is 0.677 ($p < 10^{-4}$) (Figure 4). With meteorological data from 2009, the ARIMAX model could make a prevision of the monthly number of leptospirosis cases with 95% confidence interval (Figure 4, Table 6).

Discussion

As in many developed countries, the incidence of leptospirosis in Reunion Island is decreasing; this is probably correlated to individual and collective prevention measures, a general increase in hygiene standards and the development of the tertiary sector. In contrast, recreational leptospirosis will probably become more common as water sports and nature activities increase in popularity. Efforts should be made to inform tourists about the disease. Rural leptospirosis may be an intractable problem given the complex ecological interactions involving domestic and wild reservoirs and environmental transmission sources. Results of the present study demonstrate that a combination of three meteorological parameters (rainfall, average temperature and GSR) could affect the number of human cases of leptospirosis. Our findings are largely consistent with hypotheses about the interactions of climatic factors in determining the strength and lag of weather effects on the incidence of leptospirosis. Certainly, our study shows

Table 3. Annual and monthly cases of leptospirosis in Reunion Island.

	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total	Mean of the monthly number of cases (\pm S.E.)
January	8	2	1	5	1	3	9	6	2	4	2	43	3.91 (\pm 0.84)
February	11	3	6	4	6	4	18	3	2	5	1	63	5.73 (\pm 1.47)
March	8	5	9	5	5	9	20	27	6	6	5	105	9.55 (\pm 2.18)
April	3	5	6	9	7	18	14	20	12	8	4	106	9.64 (\pm 1.71)
May	2	2	7	6	7	19	10	6	12	4	10	85	7.73 (\pm 1.48)
June	9	4	2	2	3	8	4	8	5	4	3	52	4.73 (\pm 0.75)
July	1	1	4	0	6	6	4	4	3	3	1	33	3.00 (\pm 0.62)
August	2	0	1	2	4	8	2	4	4	0	3	30	2.73 (\pm 0.69)
September	5	3	0	2	2	5	5	3	3	2	3	33	3.00 (\pm 0.47)
October	2	0	0	2	5	3	0	0	3	3	0	18	1.64 (\pm 0.53)
November	0	0	2	2	2	0	4	3	2	2	4	21	1.91 (\pm 0.44)
December	1	0	3	4	3	1	1	2	5	2	2	24	2.18 (\pm 0.44)
Total number of cases	52	25	41	43	51	84	91	86	59	43	38	613	55.73 (\pm 6.61)
Mean of the monthly number of cases (\pm S.E.)	4.33 (\pm 1.08)	2.08 (\pm 0.56)	3.42 (\pm 0.86)	3.58 (\pm 0.70)	4.25 (\pm 0.59)	7.0 (\pm 1.75)	7.58 (\pm 1.92)	7.17 (\pm 2.32)	4.92 (\pm 1.03)	3.58 (\pm 0.61)	3.17 (\pm 0.75)	/	/
Incidence (cases/100,000 inhab./year)	7.51	3.55	5.72	5.90	6.89	11.19	11.95	11.12	7.55	5.44	4.85		

In bold: monthly cases \geq 10.

Presentation of the total number of cases of leptospirosis per month and per year in Reunion Island, mean monthly cases, and annual incidence (1 January 1998 to 31 December 2008).
doi:10.1371/journal.pone.0020377.t003

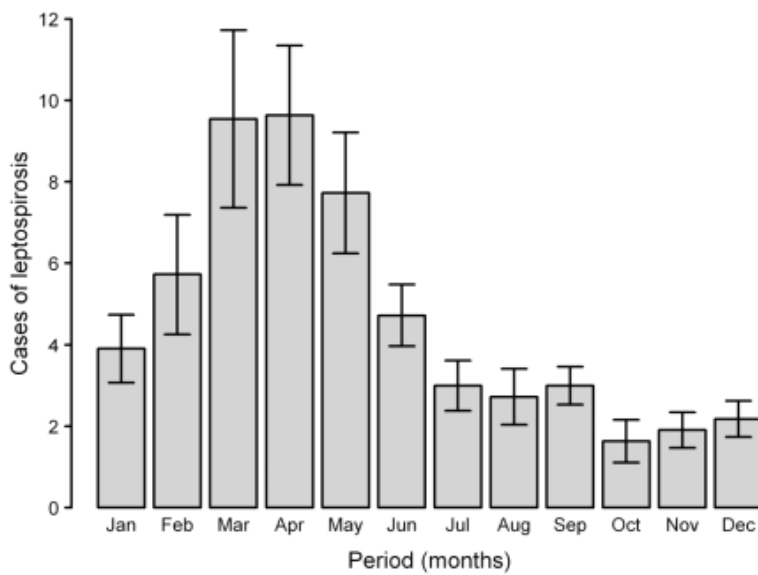


Figure 2. Monthly data on leptospirosis in Reunion Island. Mean number and standard error of monthly cases of leptospirosis in Reunion Island, 1 January 1998 to 31 December 2008. doi:10.1371/journal.pone.0020377.g002

that there is a link between monthly cases of leptospirosis in Reunion Island and both the cumulated rainfall recorded 2 months previously and average temperature and GSR, both recorded during the month considered. These three variables can

be incorporated in a predictive model which can warn of future outbreaks of human leptospirosis in Reunion Island.

Only diagnosed forms (most of the time with hospitalization of the patient) are voluntarily reported to the CNRL (patients with a

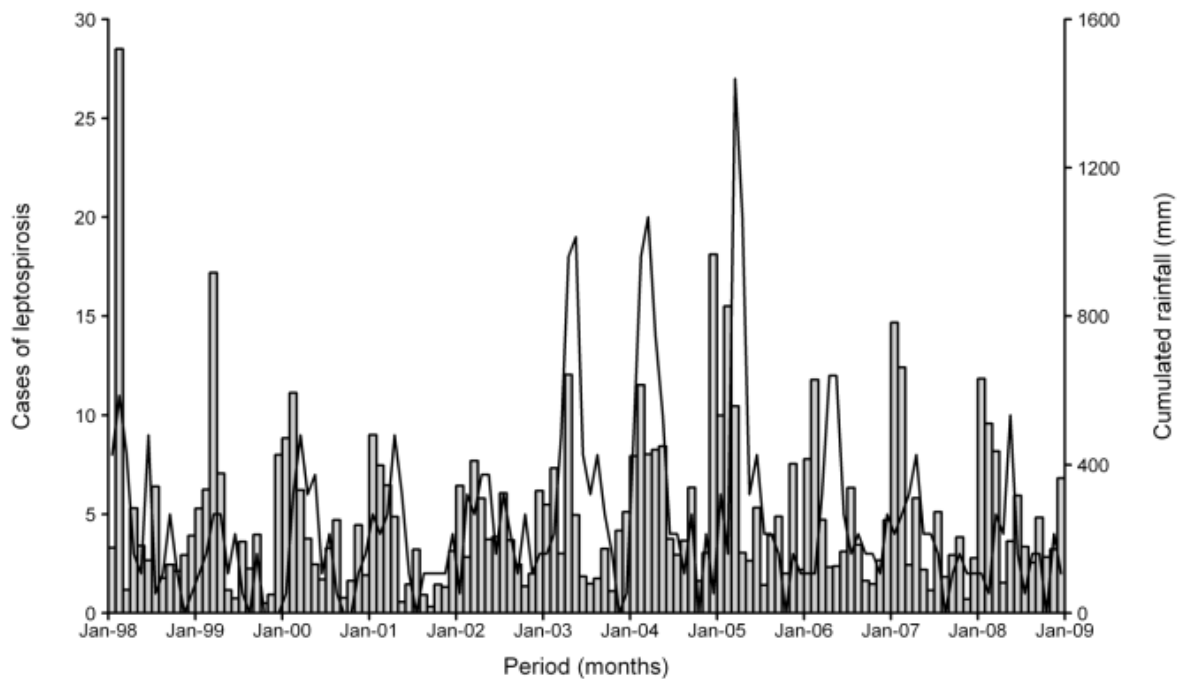


Figure 3. Leptospirosis and rainfall in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (continuous line) and cumulated rainfall (bar chart), Beaufonds-Miria station, Saint-Benoit, 1 January 1998 to 31 December 2008. doi:10.1371/journal.pone.0020377.g003

Table 4. Cross-correlation between cases of leptospirosis and five meteorological parameters in Reunion Island.

	Lag (months)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cumulated rainfall	Correlation	0.2019*	0.1525	0.2825*	0.1637	0.1076	0.0073	-0.0219	-0.1075	-0.0992	-0.1193	0.0499	0.1305	0.0954
	P-value	0.0202	0.0821	0.0011	0.0638	0.2265	0.9351	0.8078	0.2329	0.2732	0.1887	0.3852	0.1538	0.2998
Mean average temperature	Correlation	0.1881*	0.1668	0.2267*	0.1540	0.1661	0.0547	-0.0394	-0.0727	-0.1510	-0.1617	-0.0798	-0.019	0.1197
	P-value	0.0308	0.0569	0.0095	0.0815	0.0609	0.5415	0.6613	0.4201	0.0942	0.0740	0.3825	0.836	0.1927
Mean minimum temperature	Correlation	0.2113*	0.1865	0.2629*	0.1886	0.1913	0.0700	-0.0392	-0.0832	-0.1443	-0.1749	-0.0847	-0.0119	0.1166
	P-value	0.0150	0.0329	0.0025	0.0323	0.0305	0.4343	0.6630	0.3565	0.1100	0.0531	0.3536	0.8972	0.2049
Mean maximum temperature	Correlation	0.1911*	0.1680	0.2080*	0.1326	0.1277	0.0192	-0.0426	-0.0499	-0.1424	-0.1355	-0.0616	-0.0101	0.1305
	P-value	0.0281	0.0551	0.0175	0.1341	0.1509	0.8303	0.6361	0.5804	0.1146	0.1350	0.5005	0.9126	0.1553
Mean global solar radiation	Correlation	-0.0569	-0.0429	0.0822	0.0593	0.0916	0.1032	0.0163	-0.0016	-0.1532	-0.2234*	-0.2153*	-0.1704	0.0097
	P-value	0.5167	0.6265	0.3523	0.5041	0.3040	0.2482	0.8560	0.9855	0.0893	0.0130	0.0172	0.0616	0.9158

*Maximum of correlation between the monthly number of cases of leptospirosis and the meteorological factor considered. Cross-correlation between 613 cases of leptospirosis reported in Reunion Island from 1 January 1998 to 31 December 2008, and cumulated monthly rainfall, mean monthly average temperature, mean monthly minimum temperature, mean monthly maximum temperature, and mean monthly solar global radiation, recorded in Saint-Benoit, lagged by 0-12 months. doi:10.1371/journal.pone.0020377.t004

MAT titer $\geq 1/400$, or with a positive PCR result, or with a positive blood culture). Consequently, the number of reported cases is significantly lower than the number of present cases of leptospirosis in Reunion Island [23]. A small number of cases could also be the result of poor epidemiological surveillance of the disease, leading to a decrease in the number of reported cases, and thus impacting on the validity of the data.

There are no comparable studies on Reunion Island providing an analysis over such a long time period as presented in this paper. Cases of leptospirosis were reported all year round, but epidemics showed seasonality since they mainly occurred during the rainy season, between February and May. Our results confirmed prior observations showing that the prevalence of the disease in Reunion Island is affected by rainfall [23,26]. Therefore, despite the popular belief, the peak incidence of leptospirosis in Reunion Island was not during the sugar cane harvest (July to December) and other factors of contamination should be proposed. The prevalence on the west coast (annual rainfall inferior to 2,000 mm) was 0.712%. In areas with intermediate annual rainfall (2,000 to 4,000 mm), the prevalence was 1.444%, and in south-eastern areas (total annual rainfall superior to 4,000 mm), the prevalence was 3.093% [23]. Leptospirosis seasonality is also observed in French Polynesia where the monthly number of leptospirosis cases decreases during the dry season (July to October) [27] as well as in Martinique, where more than 35% of the annual cases occur during the rainy season (September to November).

The link between leptospirosis and rainfall is supported by previous observations made in Martinique, where a correlation was established between the occurrence of the disease and rainfall in the previous month [28] and in Guadeloupe, where the cycle of transmission begins about one month after the onset of heavy rain [29]. In Rio de Janeiro (Brazil), cluster case events between 1997 and 2002 were associated with heavy rainfall (OR 3.71; 95% CI 1.83-7.51) occurring 3-20 days before the onset of illness [30]. In Trinidad and Tobago, Mohan *et al.* [31] showed also a lag of 1-2 months between the onset of the rainy season (heavy rainfall) and the peak number of cases, and found a weak positive association between number of cases and amount of rainfall recorded each month ($r=0.56$). The lag period of 1-2 months between heavy rainfall and cases is consistent with the probable effect of flooded land and water-soaked soils on leptospiral organism survival (1 to 2 months) and an average incubation period for leptospirosis of 1 to 3 weeks. In many parts of the world heavy rainfall and flooding can lead to outbreaks of leptospirosis, especially in tropical countries [19,20] since transmission is often indirect in these areas.

During the rainy season the soil remains moist and can lead to the formation of pools of water which helps leptospires surviving for a longer period of time, and ultimately can lead to an increase in human and animal exposure to the bacteria. The model of Barcellos and Sabroza [32] shows that during dry periods, high leptospira concentrations in the soil are limited to a few metres around waste accumulation sources. During floods, the infectious bacteria can reach distant areas under the impact of water which increases the possibility of contact with all the population. In Reunion Island, as well as in many tropical countries, the frequency of flooding episodes may increase in the future due to changes in demographic patterns, destruction of ecologically sensitive areas such as wet lands, deforestation, reduction of the rural areas and climate change. Therefore the incidence of leptospirosis might increase in the future without the implementation of appropriate prevention strategies.

In our model, temperature was positively correlated with the case incidence at a lag of 0 months ($b=3,836$). Variations of

Table 5. Best-fitting regression model of cases of leptospirosis in Reunion Island.

Variable	Lag (months)	<i>b</i>	S.E.	95% C.I.	Student's <i>t</i> test	<i>p</i> -value
Constant	-	3.397	2.984	[-2.452-9.246]	1.138	0.255
Cases of leptospirosis	1	0.193	0.088	[0.02-0.366]	2.189	0.0286
Cumulated rainfall	0	-0.007	0.079	[-0.162-0.148]	0.084	0.9327
Cumulated rainfall	1	0.027	0.069	[-0.108-0.163]	0.397	0.6913
Cumulated rainfall	2	0.145	0.069	[0.011-0.28]	2.116	0.0343
Cumulated rainfall	3	0.056	0.069	[-0.079-0.192]	0.813	0.4161
Average temperature	0	3.836	1.445	[1.004-6.668]	2.655	0.0079
Average temperature	1	-0.469	0.606	[-1.658-0.719]	0.774	0.4388
Average temperature	2	-0.482	0.625	[-1.706-0.742]	0.772	0.4401
Average temperature	3	-0.82	0.655	[-2.103-0.464]	1.252	0.2107
Average global solar radiation	0	-1.293	0.494	[-2.26--0.325]	2.618	0.0088

b: coefficient value ; S.E.: standard error ; 95% C.I.: 95% confidence interval.

Parameters included in the best-fitting regression model of cases of leptospirosis (reported by the CNRL) in Reunion Island, 1 January 1998 to 31 December 2008 (AIC = 208.29, variance = 0.26, d.f. = 129).

doi:10.1371/journal.pone.0020377.t005

temperature are seasonal in Reunion Island, with high temperatures occurring during the rainy season and medium to cold temperatures occurring during the austral winter. Surface water temperatures follow the evolution of the air temperature, and in Reunion Island are highly dependent on geographical location and altitude. Thus survival of leptospires in water and soil may depend on the month, the nature of the water and location (east *vs* west, coast *vs* mountain).

Moreover, our results showed a negative correlation between the monthly cases and GSR recorded during the same month ($b = -1.293$). GSR is directly linked to the amount of UV radiation received at ground level and it is already known that UV exposure of more than two hours is lethal for leptospires [2]. GSR thus has an effect on the number of leptospirosis cases reported. Consequently, the dry season is clearly not favourable for

leptospirosis transmission, since due to the low level of rainfall and high GSR (Figures 3 and S2).

Our model, based on three meteorological parameters, estimates 67.7% of the variation of the monthly number of leptospirosis cases. Nevertheless, the peak incidence observed in February 2009 (13 cases) was not predicted by our model (number of cases predicted = 4), but the model gave a good prediction of the number of cases observed in March and April 2009 (observations were 9 and 10 cases respectively, while predictions were 8 and 11 respectively) (Table 6). Moreover, our model was not able to explain the major variations in the incidence of the disease observed in April and May 2003 (18 and 19 observed cases versus 10 and 13 predicted), March 2004 (20 observed cases versus 8 predicted), and March 2005 (27 observed cases versus 10 predicted). Thus, factors other than climatic must be taken into

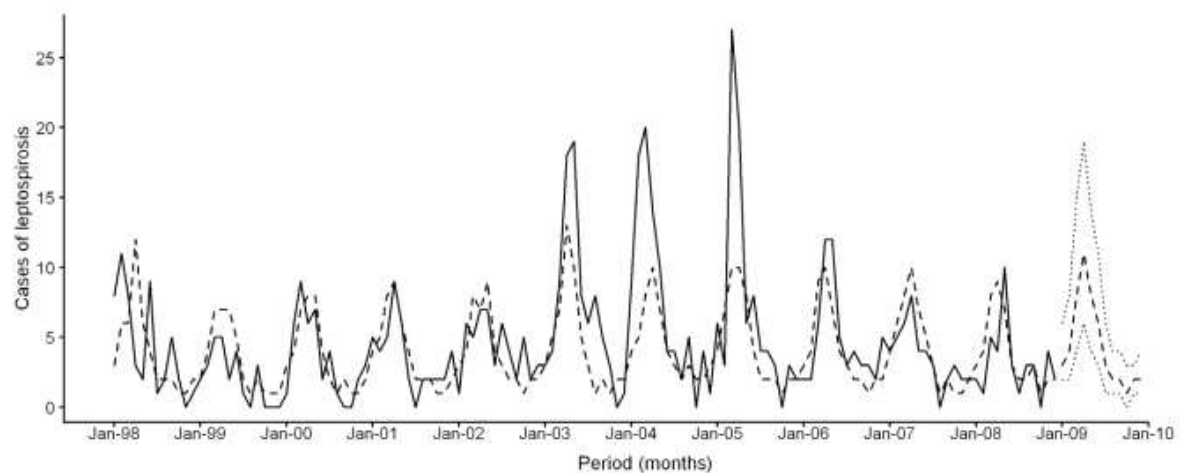


Figure 4. Observation and prediction of the monthly number of cases of leptospirosis in Reunion Island. Monthly number of cases reported by the CNRL from 1 January 1998 to 31 December 2008 (continuous line), number of cases predicted by the model from 1 January 1998 to 31 December 2009 (dotted line), and 95% confidence interval of the prediction for 2009 (dot-dashed line).

doi:10.1371/journal.pone.0020377.g004

Table 6. Predicted cases of leptospirosis in 2009, by month.

	Observed data	Prediction	95% C.I.
January 2009	5	3	2-6
February 2009	13	4	2-8
March 2009	9	8	4-15
April 2009	10	11	6-19
May 2009	6	8	4-14
June 2009	5	6	3-11
July 2009	4	3	1-6
August 2009	3	2	1-4
September 2009	5	2	1-4
October 2009	2	1	[0-3]
November 2009	3	2	1-3
December 2009	6	2	1-4
Total number of cases	71	52	

Presentation of the values predicted by the model for 2009 and 95% confidence interval (95% C.I.), compared to the data reported by the CNRL (the "observed data") for the same year.

doi:10.1371/journal.pone.0020377.t006

account to explain the highest monthly incidences of leptospirosis in Reunion Island.

In addition, the correlation between leptospirosis cases and the three meteorological parameters is weak ($b = 0.145$, $b = 3.836$, $b = -1.293$, for cumulated rainfall, mean temperature and solar global radiation respectively). In consequence, we can suppose that the model is not powerful enough to explain all the fluctuations in monthly cases, in particular when the number of cases is abnormally high. Our model can show the tendency of the incidence variations and, if it is undoubtedly a good predictor of monthly cases, it can not predict extreme values. Other parameters may greatly influence the survival of leptospires in the environment such as concentrations of oxygen and iron in water [2] or soil and water pH [33].

We did not include tropical cyclone data in our model because the difference between a depression, a tropical storm and a cyclone is mainly based on the wind speed which has a smaller impact than rainfall on the epidemiology of leptospirosis. Indeed, after cyclones, outbreaks of leptospirosis are mainly linked with flooding [34,35].

Knowledge of the association between leptospirosis and three meteorological factors allows people to be alerted, particularly before

the rainy season, of the risks present in the environment. This measure should achieve a reduction in exposure to leptospires during the high-risk period. Furthermore, as vaccinal immunity only lasts few months, our study shows that a seasonal vaccination based on the analysis of climatic data could be carried out on domestic animals. Individual measures of protection must be recommended particularly during the high-risk period, such as wearing gloves and boots when gardening, disinfecting the wound immediately in the case of a skin injury or avoiding drinking and submersion in flood or freshwater. Several serogroups are circulating in Reunion Island but the one mostly found in human cases is *Icterohaemorrhagiae* [23] followed by *Canicola* [23,36]. Thus, rats and dogs are suspected to be the main carriers of leptospires on the island. They transmit the bacteria via infected urine, and the rainy season greatly favours the survival of the bacteria in the environment. Therefore, active rat control measures should be undertaken before and during the rainy season as well as the control of the stray dog populations and the cleaning of illegal dump sites.

Supporting Information

Figure S1 Leptospirosis and temperature in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (black curve) and average temperature (dotted curve). Beaufonds-Miria station, Saint-Benoît. 1 January 1998 to 31 December 2008. (TIFF)

Figure S2 Leptospirosis and global solar radiation in Reunion Island. Monthly cases of leptospirosis (black curve) and global solar radiation (dotted curve). Beaufonds-Miria station, Saint-Benoît. 1 January 1998 to 31 December 2008. (TIFF)

Acknowledgments

We are very grateful to Guy Baranton for his help with the research of historic data on leptospirosis diagnosis in Reunion Island, Vincent Michault, Andrew Hobson, and Guy Lempréière for comments on the manuscript, and Renaud Lancelot for his advices in statistics.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AD. Performed the experiments: AD SJ. Analyzed the data: SJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: FC PB. Wrote the paper: AD SJ AM. Provided data: AM PB. Helped in the epidemiological interpretation of data: AM EC. Helped with the statistical analysis: FC.

References

- World Health Organization (1999) Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec* 74: 267-242.
- Faine S, Adler B, Bolin G, Pérolat P (1999) *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci, 296 p.
- Katz AR, Ansell VE, Effer PV, Middleton CR, Sasaki DM (2001) Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clin Infect Dis* 33: 1834-1841.
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326.
- Monahan AM, Miller IS, Nally JE (2009) Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol* 107: 707-716.
- Priya CG, Hoogendijk KT, Berg MDV, Rathinam SR, Ahmed A, et al. (2007) Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. *J Postgrad Med* 53: 236-240.
- Tacunduva de Faria M, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, et al. (2008) Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop* 108: 1-5.
- Brod CS, Aleixo JAG, Jouglaard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, et al. (2005) Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 294-300.
- Wecker CC, Everard COR, Levett PN (1997) Seroprevalence of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Vet Microbiol* 57: 215-222.
- Everard CO, Bennett S, Edwards CN, Nicholson GD, Hassel TA, et al. (1992) An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. *J Trop Med Hyg* 95: 13-32.
- Pérocheau A, Pérolat P (1997) Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur J Epidemiol* 13: 161-167.
- Douglas CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN (1997) Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 3: 79-80.
- Morgan J, Bornstein Shari L, Karpati Adam M, Bruce M, Bolin CA, et al. (2002) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 34: 1593-1599.
- Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Beninger J, Bajani M, et al. (2003) Leptospirosis in "eco-challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 9: 702-707.

15. Picardeau M, Cornet M, Morel V, Sertour N, Chaumet D, et al. (2008) Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 37: 329–331.
16. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berbioz-Athaud A, et al. (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249: 139–147.
17. Herrmann Storck C, Postic D, Lamaury I, Perez JM (2008) Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiol Infect* 136: 1407–1415.
18. Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, et al. (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.
19. Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, et al. (2007) Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of a university campus. *Am J Trop Med Hyg* 76: 882–886.
20. Pappachan MJ, Sheela M, Aravindan KP (2004) Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. *J Epidemiol Community Health* 58: 1054–1055.
21. Raunet M (1991) Physical environment and soils of Reunion. Consequences for effective agricultural and use [in French]; CIRAD-IRAT, editor. Montpellier, France: CIRADParis. 438 p.
22. INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques) (2010) *Tableau Economique de La Réunion (TER) Edition 2010*. Paris, France. 237 p.
23. Duval G, Michault A, Baranton G, Law-Koume JD, Folio G, et al. (1991) Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island [in French]. *Rev Epidemiol Santé Publique* 39: 135–141.
24. Cryer JD, Kung-Sik C (2008) *Time series analysis: With applications in R*. Second edition; Casella G, Fienberg S, Olkin I, eds. New York, USA: Springer. 491 p.
25. Shumway RH, Stoffer DS (2006) *Time series analysis and its applications: With R examples* (Springer texts in statistics). Englewood Cliffs New Jersey: Springer. 575 p.
26. Mailloux M, Debarbat F, Mollaret IHH (1983) Leptospiroses in the island of Reunion. I. Human leptospiroses [in French]. *Bull Soc Pathol Exot* 76: 729–735.
27. Hirschauer C, Daudens E, Coudert C, Frogier E, Melix G, et al. (2009) Epidemiology of leptospirosis in French Polynesia from 2006 to 2008 [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 48-49-50: 508–511.
28. Lhomme V, Grolier-Bois L, Jouannelle J, Elisabeth L (1996) Leptospirosis in Martinique from 1987 to 1992: results of an epidemiological, clinical and biological study. *Med Mal Infect* 26: 94–98.
29. Herrmann-Storck C, Brioude A, Quirin R, Deloumeaux J, Lamaury I, et al. (2005) Retrospective review of leptospirosis in Guadeloupe, French West Indies 1994–2001. *West Indian Med J* 54: 42–46.
30. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, et al. (2008) Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int Health* 13: 503–512.
31. Mohan ARM, Cumberbatch A, Adesiyun AA, Chadde DD (2009) Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996–2007: A retrospective study. *Acta Trop* 112: 260–265.
32. Barcellos C, Sabroza PC (2001) The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a food-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica* 17(supplemento).
33. Gordon Smith CE, Turner LH (1961) The effect of pH on the survival of leptospires in water. *Bull OMS* 24: 35–43.
34. Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P (2002) Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *Nat Med J India* 15: 22–23.
35. McCurry J (2009) Philippines struggles to recover from typhoons. *Lancet* 374: 1489.
36. Agésilas F, Gey F, Monbrunt A, Combes JC, Llanas B, et al. (2005) Acute leptospirosis in children in Reunion Island: a retrospective review of 16 cases [in French]. *Arch Pediatr* 12: 1344–1348.

Cet article montre clairement l'existence d'une association significative entre les cas de leptospirose à La Réunion et la saison des pluies. Il est très intéressant de noter que le pic du nombre mensuel de cas intervient entre février et mai (observations sur onze années) et non pendant la coupe de la canne à sucre qui s'étend traditionnellement de juillet à septembre, ce qui soulève la question suivante : Les coupeurs de canne sont-ils une population plus à risque à La Réunion ?

Les inondations provoquent un lessivage des sols contaminés vers les sources d'eau plus vastes, utilisées par les hommes et/ou les animaux, ce qui augmente le risque d'interactions entre la bactérie et les hôtes potentiels.

Néanmoins, les données épidémiologiques suggèrent que le modèle de transmission liée à l'eau est incomplet : 1/ de nombreux cas de leptospirose apparaissent quelques mois après le début des fortes pluies [179]; 2/ les cas de leptospirose ne sont pas toujours groupés les mois ou les années au cours desquels la pluviométrie est supérieure à la moyenne [158, 179]; 3/ on note l'absence de cas de leptospirose après de fortes pluies ou des inondations dans des endroits où la maladie est endémique [158]; 4/ lorsqu'on établit un modèle statistique des cas en fonction des données météorologiques, celles-ci ne suffisent pas à expliquer toutes les variations du nombre de cas (notamment le modèle ne permet pas de prédire les nombres extrêmes) [156]. Ces observations suggèrent que la capacité des leptospires pathogènes à survivre dans un environnement aqueux est un facteur important dans la transmission d'un hôte à un autre [180].

3.2. Facteurs de risque socio-économiques

Les facteurs de risque de contamination par *Leptospira* sont nombreux, souvent dépendants de facteurs environnementaux, mais les facteurs socio-économiques ne sont cependant pas à négliger.

Certaines études montrent que les zones rurales sont plus touchées par la maladie que les zones urbaines [177, 181, 182], mais cela n'est pas vérifié partout. Dans les zones urbaines défavorisées, telles que les bidonvilles [183], ou dans les populations résidant à proximité d'une décharge à ciel ouvert [91, 183-185] l'incidence de la maladie est plus importante que dans les zones socialement plus riches [3, 136]. Une étude dans un bidonville à Salvador, au

Brésil, a montré qu'avoir un salaire bas et être de race noire étaient des facteurs de risque d'infection par *Leptospira* et qu'une augmentation du revenu de 1\$US par habitant et par jour était associé à une diminution de 11% (IC 95% [5%-18%]) du risque d'infection [184].

Marcher pieds-nus, habitude très fréquente dans les régions pauvres, mais aussi dans les zones tropicales plus développées comme La Réunion ou Mayotte, est un facteur de risque de contamination [185, 186].

Il est communément admis que les agriculteurs sont les personnes les plus exposées à la leptospirose. Les égoutiers, les forestiers, les personnes en contact avec les animaux (dresseurs, personnels d'abattoirs, bouchers, fermiers, vétérinaires...), ainsi que les mineurs sont aussi des professionnels très exposés [187-190]. Tous les métiers nécessitant un contact prolongé avec de l'eau sont des professions à risque [191].

Les personnes travaillant dans les rizières sont extrêmement exposées à la maladie, en effet, les rizières sont des zones très humides, l'utilisation de bœufs ou de buffles aux champs, et la présence de rongeurs, notamment en saison de récolte, lorsque le riz est mûre, favorise la survie et permet la transmission des leptospires dans ces zones [187]. Une étude rapporte que, dans le sud de l'Inde, 68,3% (225/329) des personnes travaillant en rizière ont des anticorps dirigés contre *Leptospira* [191]. Aux îles Andaman, en Inde, la séroprévalence de la leptospirose dans la population considérée comme "à risque" est de 52,7% [187]. Des études conduites sur les populations très exposées au Chili, à Trinidad et à la Barbade ont montré des séroprévalences de 22%, 49%, et 39% respectivement [192, 193].

3.3. Autres facteurs de risque

3.3.1. Le sexe et l'âge du patient

Dans le monde, la maladie clinique est généralement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes [90, 154, 166, 168, 176, 177, 194-199]. Cependant, à Salvador, au Brésil, Dias *et al.* [181] ont montré que la séroprévalence de la leptospirose n'était pas différente chez les hommes et chez les femmes, observation également faite dans d'autres études, au Bangladesh [200] et à Rio de Janeiro (Brésil) [201].

En fonction de la zone géographique, la catégorie d'âge la plus exposée peut varier. En effet, la maladie est plus fréquente chez les 20-29 ans à Hawaï [194], chez les 20-29 et les

> 50 ans en Nouvelle-Calédonie [195], chez les plus de 30 ans en Argentine [177], chez les 30-59 ans en Croatie [199], en Polynésie française, 50% des cas sont âgés de 10 à 29 ans [196], en Australie, dans le Queensland, la catégorie d'âge la plus atteinte est 21-40 ans [197], ce sont les 25-54 ans au Portugal [198], les hommes de 26-35 ans à La Réunion [202], etc. Ces exemples montrent qu'en fonction du pays, des activités et des habitudes quotidiennes, la catégorie d'âge la plus touchée dans une population est variable.

Généralement, au niveau mondial, on relève trois caractéristiques majeures: d'abord, c'est une maladie qui touche significativement plus les hommes que les femmes, ensuite, chez les personnes ayant une activité professionnelle à risque, la séroprévalence de cette maladie augmente avec l'âge [90, 181, 195, 201], enfin, la leptospirose est peu diagnostiquée chez les enfants [91, 168, 194].

3.3.2. L'exposition par les loisirs

Des activités courantes et simples, telles que le jardinage ou la pêche en eau douce sont des activités qui exposent les pratiquants aux leptospires [179, 203]. En Italie, avec l'amélioration des conditions d'hygiène, des équipements de protection, et la fermeture en masse des mines dans l'ouest du pays, la part des leptospiroses due à l'exposition professionnelle diminue alors que celle associée aux activités de loisir est en augmentation [168].

L'exposition à la leptospirose par les loisirs est relativement récente. Le développement du tourisme, des activités nautiques et autres sports pratiqués dans des zones humides, en zones tempérées [204-206] et tropicales [207-209], ont permis l'apparition de nombreux cas liés à ces activités de détente ou de loisirs. Suite à l'Eco-Challenge-Sabah, une course d'endurance multisports, qui a eu lieu du 21 août au 1^{er} septembre 2000 à Bornéo en Malaisie, une vingtaine de cas de leptospirose ont été identifiés [209, 210]. Une épidémie a aussi été rapportée suite à un triathlon à Springfield, dans l'Illinois, en 1998, avec trois athlètes hospitalisés pour leptospirose [206]. Un cas sévère de la maladie a été rapporté chez un homme allemand, de retour dans son pays douze jours après avoir participé à un championnat "Iron man" aux Philippines [211]. La maladie a aussi été diagnostiquée chez des coureurs après la course "Tchimbe-Raid" en forêt tropicale en Martinique en 2009 [212], ainsi que suite à la course d'endurance "USARA National Championship" qui a eu lieu en Floride en 2005 [213].

D'autres cas de leptospirose ont été liés à différentes pratiques sportives, notamment le rafting [207, 214] ou le canoë-kayak [215]. Un spéléologue américain a contracté la maladie suite à une expédition en Malaisie ; la maladie s'est déclarée dix jours après sa dernière exploration spéléologique, malgré un traitement préventif à base de doxycycline (100 mg par jour) [216].

La leptospirose est endémique dans de nombreux pays tropicaux, ce qui implique que les voyageurs qui s'y rendent sont aussi une population à risque, au même titre que les autochtones [217, 218]. Ainsi, avec l'augmentation de la pratique de loisirs de pleine nature par les touristes visitant les pays tropicaux, la leptospirose pourrait devenir une maladie fréquente des services de médecine tropicale des pays riches tempérés.



**CHAPITRE III : LA LEPTOSPIROSE, UNE MALADIE (RE-)
EMERGENTE ?**



D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, une maladie émergente est une maladie qui apparaît dans une population pour la première fois, ou qui a existé précédemment, mais dont l'incidence et/ou la répartition géographique a rapidement augmenté (http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/). Cette définition purement épidémiologique, inclut indifféremment la mise en évidence de "nouvelles" maladies avec de "nouveaux" agents pathogènes, et la réapparition ou la résistance au traitement de maladies déjà connues. Il est nécessaire de différencier "l'émergence" effective d'une maladie d'une augmentation du nombre de cas due à un meilleur diagnostic ou liée à une épidémie ponctuelle [64, 219].

De multiples facteurs contribuent à l'émergence des zoonoses, certains sont d'origine naturelle, mais dans leur grande majorité, ces facteurs sont, directement ou indirectement, d'origine anthropique :

- Migrations et transports (d'animaux et de marchandises),
- Densité de population et comportements caractéristiques des hôtes,
- Aménagement du territoire (voirie, gestion des déchets, gestion des eaux usées...),
- Influence de l'environnement (écologie et climat),
- Facteurs iatrogènes,
- Évolution naturelle des agents pathogènes par phénomène de mutation ou de sélection naturelle,
- Immunité naturelle des hôtes.

La leptospirose est considérée par de nombreux auteurs comme une maladie (ré)émergente chez l'Homme [220-226]. Elle est aussi considérée comme une maladie émergente chez le chien [3, 227]. Nous aborderons dans ce chapitre quelques facteurs d'émergence/ré-émergence de cette maladie.

1. Emergence du syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS, Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome)

L'émergence de formes cliniques graves telles que le syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS) est décrit dans diverses zones [103]. Gouveia *et al.* [104]

décrivent l'émergence du SPHS à Salvador, au Brésil où cette forme clinique grave de la leptospirose n'était pas décrite avant 2003, alors que 47 cas ont été décrits entre 2003 et 2005. L'augmentation du nombre de cas de SPHS dans une région peut être due à un meilleur diagnostic de la maladie ou à l'émergence effective de ce syndrome [104].

A Buenos Aires, en Argentine, 276 cas de leptospirose ont été diagnostiqués entre 1900 et 1999. Aucun syndrome pulmonaire hémorragique n'a été décrit chez ces patients. En 2000 et 2001, 93 cas de leptospirose ont été rapportés dans cette même région, dont une épidémie de 47 cas en mars 2001. Quatre patients sont morts, chez trois d'entre eux, le diagnostic de leptospirose a été confirmé biologiquement. Deux de ces patients sont morts suite à des hémorragies pulmonaires sévères, constituant les premiers cas documentés de cette forme clinique dans la région de Buenos Aires [228].

L'"émergence" d'une forme clinique peut avoir pour origine l'introduction ou la découverte d'un nouveau sérovar dans une région (comme la souche *L. borgpetersenii* groupe B décrite à Mayotte en 2011 [229]), la dominance d'un clone/variant pathogène, écologiquement plus adapté au milieu, et dont la virulence est supérieure aux génotypes habituellement rencontrés dans la région [64, 229], ou encore une meilleure détection/reconnaissance de cette forme clinique en relation avec un pathogène connu.

2. Emergence liée aux nouvelles activités de loisirs et à la mondialisation des échanges

Historiquement, les travailleurs ayant des contacts directs avec les réservoirs animaux, en particuliers les éleveurs de bovins et de cochons, les travailleurs en abattoirs, les vétérinaires, les éleveurs laitiers et les populations rurales étaient considérés comme les plus exposés à la contamination par des leptospires. Cette épidémiologie est toujours observée dans les pays en voie de développement [182, 187, 230-232] alors que l'exposition liée à des activités de loisirs amenant au contact des eaux douces [9, 233], est aujourd'hui la cause la plus fréquente d'infection par *Leptospira* dans les pays développés (bien que l'exposition liée aux activités rurales soit toujours la cause d'un nombre non négligeable de cas [226]).

L'augmentation des échanges internationaux et le développement d'activités en zones tropicales induit l'introduction de cas de leptospirose dans des pays occidentaux à partir de pays tropicaux, et l'émergence de la leptospirose en tant que maladie de loisir [217, 222].

En effet, les pays tropicaux bénéficient d'une popularité grandissante en tant que destinations de vacances, souvent en lien avec des activités à fort risque de contamination, telles que le rafting, le trekking dans la jungle ou la forêt tropicale, la spéléologie [217, 222]. Les athlètes sont de plus en plus friands de challenges extrêmes, tels que les ultratrails, ultramarathons, triatlons, événements multisports...dans des endroits de plus en plus lointains (forêts, montagnes, déserts...) qui augmentent le risque d'infection par des agents pathogènes tels que *Leptospira* [234].

En Australie, l'observation des cas entre 1998 et 2004 révèle un changement dans l'épidémiologie de la maladie, avec un risque accru d'infection lors d'activités de loisir plutôt que lors d'exposition professionnelle, cette dernière comptant seulement pour 18% de la totalité des cas sur cette période [197]. Cette tendance s'est confirmée ensuite en 2008, avec environ 35% des cas rapportés au centre national de surveillance australien qui étaient liés à des voyages à l'étranger et/ou à des activités de loisirs, notamment, 19% de ces infections étaient acquises en-dehors du pays. Des observations similaires ont été faites dans d'autres pays développés, comme à Hawaii où l'incidence locale, très élevée, est attribuée pour 0% à des activités de loisir dans les années 1970, alors que cette proportion s'élève à 50% dans les années 1990 [189].

La leptospirose est aussi considérée comme une infection ré-émergente en Californie avec une augmentation croissante du nombre de cas apparaissant suite à une exposition lors d'activités aquatiques. En effet, 59% des infections rapportées entre 1982 et 2001 étaient liées aux loisirs, tandis que la proportion monte à 85% entre 1997 et 2001, avec de surcroît une augmentation du pourcentage de cas liés à des voyages dans des destinations tropicales [225].

Le passage de la leptospirose d'une maladie d'origine professionnelle à une maladie de loisirs et de voyage est observé aux Pays-Bas, en Italie, au Portugal, en Bulgarie, mais aussi en France [168, 173, 198, 235, 236]. Par ailleurs, plus de la moitié des infections leptospirosiques au Royaume-Uni sont aujourd'hui acquises à l'étranger, principalement dans des pays tropicaux ou subtropicaux [237]. En Israël, 42% de la totalité des cas de leptospirose entre 2002 et 2008 ont été diagnostiqués chez des voyageurs, la plupart d'entre eux ayant été infectés en Asie du sud-est, et la majorité ayant participé à des activités aquatiques [238]. En Allemagne, les voyages internationaux sont aujourd'hui le facteur de risque le plus important d'exposition à la leptospirose, comptant pour 16% des cas [239]. En Suède, on observe aussi un nombre non négligeable de cas de leptospirose chez des voyageurs revenant de zones tropicales [240].

3. Emergence liée au changement climatique

La survie des *Leptospira* pathogènes en-dehors de l'hôte dépend largement des conditions d'humidité et de chaleur [156, 157]. La survie dans le milieu extérieur contribue au maintien du cycle d'infection chez les réservoirs animaux, et à une augmentation du risque d'infection chez les hôtes sensibles, dont l'Homme.

Le réchauffement climatique, l'augmentation des précipitations au niveau mondial et l'augmentation de fréquence des événements climatiques extrêmes contribuent à l'augmentation globale de l'incidence de la leptospirose [222, 241], voire à son émergence dans certaines régions. Le phénomène de changement climatique mondial laisse supposer que beaucoup de régions sont susceptibles de souffrir de pluies et d'inondations plus fortes et plus fréquentes dans les prochaines décennies [242, 243]. Or, les zones inondables sont des zones à risque accru d'infection par la leptospirose [169, 171, 177] et les cyclones contribuent largement à ce phénomène [170, 244]. Aussi bien dans les pays développés qu'en voie de développement, les inondations et autres désastres naturels peuvent aussi augmenter le risque d'infection par *Leptospira* sp. en perturbant les services et les infrastructures de santé publique, en provoquant des dommages sur les réseaux d'eaux et les réseaux sanitaires, par déplacement des populations, en causant des dommages sur les habitations et en augmentant l'exposition environnementale à la bactérie [245]. Notons que les infections liées à l'alimentation ou à l'eau sont fréquentes après une inondation, et certaines peuvent être difficiles à différencier cliniquement de la leptospirose. Par exemple, les hépatites A et E sont communément observées dans des pays en voie de développement, pouvant occasionner des syndromes d'hyperthermie et d'ictère, fréquemment retrouvés chez des patients atteints de leptospirose [245].

Par conséquent, il est aujourd'hui admis que l'incidence de la leptospirose risque d'augmenter sous l'effet de l'actuel changement climatique global [246, 247].

4. Urbanisation, exode rural et pauvreté

Depuis la fin du XX^e siècle, des épidémies importantes, rurales et urbaines, de leptospirose ont été observées sur tous les continents. Des milliers de cas et des centaines de décès ont été recensés, et les zones défavorisées telles que les bidonvilles en périphérie des

grandes agglomérations ont été les plus touchés. Il est très probable que l'augmentation de la population (estimée à environ 70 millions de personnes par an [248]) et de l'urbanisation mondiale au cours du XXI^e siècle favorisera l'augmentation de ce phénomène [222].

Aux Philippines, les patients atteints de leptospirose sont le plus souvent résidents de zones urbaines ou péri-urbaines inondables, telles que la métropole de Manille. Dans cet archipel, la leptospirose est associée principalement aux fortes précipitations, notamment sous l'influence de la mousson ou de cyclones, à l'urbanisation rapide (due à l'augmentation dramatique de la population), à la déforestation, à l'augmentation du nombre de secteurs propices aux inondations, mais aussi à la pauvreté des infrastructures [249]. Depuis les années 1960, la surface boisée des Philippines a diminué de 40%. Or, les arbres ont un rôle important dans l'absorption de l'eau, en particulier en saison des pluies, et constituent un moyen de lutte naturel limitant les inondations. A cause de cette déforestation, une grande partie des Philippines est désormais constituée de zones continuellement inondées en saison des pluies, en particulier la région de Manille [249].

A Rio de Janeiro, les plus fortes incidences de la leptospirose ont été identifiées dans les zones sensibles aux inondations, et qui connaissent les plus mauvaises conditions sanitaires et de pauvreté [169]. De plus, les zones pauvres sont aussi celles où sont présentes des décharges à ciel ouvert et des dépôts d'ordures, qui constituent une source de nourriture et un habitat pour les populations de rats, principaux vecteurs de la maladie [184].

McBride *et al.* [128] estiment que la leptospirose est un problème de santé publique majeur dans les pays en voie de développement, notamment en Asie et en Amérique Latine, à cause de la pauvreté, en particulier des mauvaises conditions sanitaires [128]. Par conséquent, dans les communautés vivant dans des bidonvilles, avec un très fort taux d'extrême pauvreté, les différences socio-économiques relatives contribuent à un taux d'incidence inégal vis-à-vis de la leptospirose [169, 184].

5. Perte de biodiversité mammalienne

L'équilibre des écosystèmes joue un rôle essentiel dans la régulation des maladies, et par conséquent, cet équilibre doit être conservé afin de maintenir la santé des populations humaines. La rupture de l'équilibre des écosystèmes, et en particulier la perte de biodiversité [250], augmente le risque de transmission de nombreuses maladies, dont les hantavirus [251],

le virus West Nile [252], la maladie de Lyme [253], le virus Ross River [254], le paludisme [255] mais aussi probablement de la leptospirose [256].

Derne *et al.* [256] ont montré que, pour une unité écologique donnée (une île), l'incidence de la leptospirose chez l'Homme était négativement corrélée au nombre d'espèces de mammifères terrestres. Par ailleurs, si la richesse en espèces mammaliennes augmente, la diminution de l'incidence de la leptospirose devient de plus en plus faible à chaque nouvelle espèce supplémentaire [256].

Le rat est une espèce envahissante, généraliste et prolifique, qui se développe dans des environnements aussi bien anthropisés que naturels [257]. Par ailleurs, les rats sont souvent la source des cas humains de leptospirose, car réservoirs principaux du sérotype Icterohaemorrhagiae, le plus fréquemment retrouvé dans les cas humains [176, 184, 258, 259]. On peut émettre l'hypothèse que la diversité mammalienne diminue l'incidence de la leptospirose par un phénomène de dilution, qui réduit les interactions hôte-hôte par la présence d'autres espèces, réduisant ainsi les opportunités de transmission d'un pathogène, et/ou par un phénomène de biorégulation des populations de rats, donc de la transmission de la bactérie, par des interactions compétitives ou de prédation avec les autres mammifères [256]. L'absence d'association significative entre la richesse spécifique totale et l'incidence de la leptospirose (alors que l'association avec la richesse spécifique en mammifères terrestres est significative) suggère que la biodiversité générale est moins importante que la biodiversité mammalienne pour résister à l'invasion par les rats [256].

Ainsi, globalement, la préservation des écosystèmes et de la biodiversité endémique induit généralement une diminution de la prévalence des maladies infectieuses [250, 260, 261].
--

La **Figure 8** résume les facteurs d'émergence d'une maladie infectieuse.

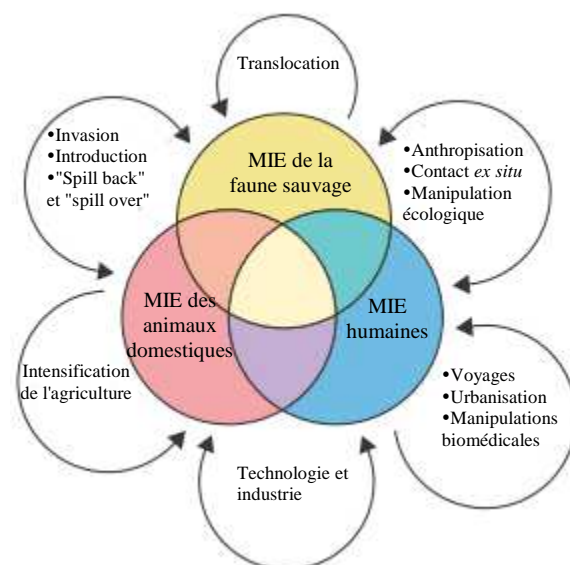


Figure 8 : Le continuum hôte-pathogène.

La plupart des maladies infectieuses émergentes (MIE) existent à l'intérieur d'un continuum entre la faune sauvage, la faune domestique, et les populations humaines. Peu de maladies n'affectent qu'un seul groupe, et les relations complexes entre les populations d'hôtes mettent en scène l'émergence de maladies. Les flèches montrent quelques facteurs clé conduisant à l'émergence d'une maladie (d'après [262]).

- "Spill over" : processus par lequel des pathogènes se transmettent d'une population hôte réservoir (souvent des espèces domestiques) fortement infectée à une population hôte sauvage sympatrique non réservoir [262].
- "Spill back" : processus par lequel des espèces sauvages deviennent réservoir de pathogènes circulant localement chez les espèces domestiques et les retransmettent à ces dernières [262].

6. La leptospirose : une maladie émergente chez les chiens ?

La leptospirose canine a été décrite comme une "maladie ré-émergente" en Amérique du Nord dans le milieu des années 1990 ; le changement dans les sérovars infectants les chiens, lié à un changement d'épidémiologie de la maladie, a été jugé responsable de cette ré-émergence. Historiquement, les sérovars *Canicola* et *Icterohaemorrhagiae* étaient prépondérants chez les chiens, mais l'introduction d'un vaccin canin efficace au début des années 1970 dans différentes régions telles que l'Europe, l'Afrique du Sud, l'Australie et l'Amérique du Nord [263, 264] a permis un déclin du nombre de chiens infectés par ces deux sérovars entre les années 1970 et le milieu des années 1990 [224]. Depuis le milieu des années 1990 cependant, les observations montrent une apparente ré-émergence de la leptospirose canine associée à d'autres sérovars infectants [224]. Les sérovars les plus souvent

retrouvés depuis cette "ré-émergence" sont les sérovars Grippotyphosa et Pomona [265, 266]. Il semble que cette "ré-émergence" et les changements dans l'épidémiologie des sérovars infectants soient dus au peuplement (dans les années 1980 et 1990) de zones anciennement rurales, qui a induit une plus grande fréquence des contacts entre les animaux domestiques et le réservoir sauvage [265, 266], mais aussi entre les chiens et les animaux de rentre et les effluents d'élevage [224, 267]. Aux Etats-Unis, les réservoirs connus du sérovar Bratislava sont les porcs, et probablement les chevaux et les bovins ; les réservoirs connus du sérovar Pomona sont les moufettes (putois) et les opossums ; et les réservoirs connus du sérovar Grippotyphosa sont les rats laveurs, les moufettes les opossums [268]. Enfin, les carnivores errants sont aussi exposés à *Leptospira* par la consommation de proies telles que des rongeurs [269], permettant ainsi le transfert d'un cycle sauvage à un cycle urbain et l'introduction de certains sérovars en zone urbaine.

Les études sur la résurgence de la leptospirose canine en Amérique du Nord révèlent aussi une saisonnalité des cas et identifient des facteurs de risque environnementaux tels que l'augmentation des précipitations et des températures plus élevées [264, 268, 270-272].

Dans la région rurale de Berlin, la population de sangliers sauvages est en dramatique augmentation et une étude a montré que ces animaux sont des réservoirs importants pour différents sérovars de *Leptospira* [273]. Ainsi, entre 2006 et 2010, une augmentation du nombre de chiens suspects de leptospirose a été observée à la clinique des petits animaux (Freie Universität) de Berlin [274].

En conclusion, concernant "l'émergence" de la leptospirose canine, il est nécessaire de s'interroger : cette "émergence" n'est-elle pas plutôt liée à une recherche plus systématique et plus approfondie de la maladie chez les chiens et à une augmentation du nombre d'études ? De nouveaux sérovars "émergent" dans la population canine, mais 1/ ces sérovars existaient auparavant dans la faune sauvage et 2/ on les recherche depuis peu chez les chiens. Circulaient-ils à bas bruit chez les canidés avant qu'on ne les recherche ?

La notion d' "émergence" est-elle utilisée à juste titre quand on parle de leptospirose canine ?

Si des sérovars "émergent", il est clair que la leptospirose à proprement parlé n'est pas une maladie émergente chez le chien.



CHAPITRE IV : LA LEPTOSPIROSE ANIMALE



1. Rôle des animaux dans l'épidémiologie de la leptospirose : la notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible

1.1. Notion d'hôte

Un "réservoir" est un système écologique (biotope et biocénose) dans lequel un agent (zoonotique) survit indéfiniment [275]. Il comprend donc l'ensemble des populations hôtes ainsi que les hôtes intermédiaires ou vecteurs (le plus souvent invertébrés) et leur biotope [276].

Un "hôte" est un être vivant qui héberge et entretient dans des conditions naturelles un agent pathogène [276].

Un "hôte accidentel" est infecté à partir du réservoir, mais n'est pas nécessaire au maintien de la population d'agents (zoonotiques) [275].

Un "hôte réservoir" concourt à la survie de l'agent (zoonotique) [275].

Bien que cette notion soit discutable, on distingue généralement deux catégories d'hôtes animaux (Homme y compris) dans l'épidémiologie de la leptospirose :

- Les hôtes accidentels, sensibles, avec des signes cliniques allant de bénins à mortels ;
- Les hôtes réservoirs, que l'on peut qualifier de "tolérants" car la bactérie a un impact mineur sur eux. Chez ces hôtes asymptomatiques, il s'établit un "équilibre" biologique avec *Leptospira* [277].

La plupart des mammifères peuvent être infectés par des leptospires pathogènes [24]. Différents sérovars de *Leptospira* sont "associés" à un ou plusieurs "hôtes de maintien" (**Tableau 5**), dont les populations servent de réservoirs sur le long terme [73]. De plus, une même espèce peut être réservoir de différents sérovars/sérogroupe selon la région géographique. Ainsi, la petite mangouste indienne, *Herpestes javanicus*, est l'hôte de maintenance des sérogroupe Canicola, Sejroe et Icterohaemorrhagiae à Hawaii [278-280], du sérogroupe Sejroe sur l'île d'Oahu [281], des sérovars Icterohaemorrhagiae et Djatzi à Puerto Rico [282], des sérogroupe Icterohaemorrhagiae, Sejroe et Australis en Guadeloupe [283, 284], du sérogroupe Canicola à Trinidad (Antilles) [285, 286] et des sérovars Atchafalaya,

Copenhageni et Brasiliensis à Grenade (Antilles) [285, 286]. D'autres espèces de mangoustes peuvent aussi être réservoir, telle que *Herpestes urva* à Taïwan [287].

Tableau 5 : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de *Leptospira* (d'après [73, 288]).

Hôte réservoir	Sérovar(s)
Porc	Pomona, Tarassovi
Bovin	Hardjo, Pomona
Cheval	Bratislava
Chien	Canicola
Mouton	Hardjo
Cerfs	Hardjo
Raton laveur	Grippotyphosa
Rat	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Souris	Ballum, Arborea, Bim
Marsupial	Grippotyphosa
Chauve-souris	Cynopteri, Wolfii

La relation entre un hôte de maintien et le sérovar est caractérisée par une transmission efficace, une forte séroprévalence (supérieure à 50%), et un portage rénal asymptomatique et chronique [288].

Des travaux récents suggèrent que des interactions moléculaires spécifiques entre la bactérie et l'hôte entrent en jeu permettant l'appariement spécifique mammifère-sérovar [289].

Rattus sp. est le réservoir le plus connu et le plus répandu de *Leptospira* [64, 176, 184, 258, 259, 290-294]. Néanmoins, diverses études ont montré que différents rongeurs pouvaient héberger des leptospires et étaient susceptibles de contaminer l'environnement.

La diversité des réservoirs possibles de *Leptospira* en fonction de la région géographique et du milieu écologique laisse entrevoir les grandes possibilités dans les modes de transmission et dans l'épidémiologie de cet agent pathogène.

Nous ne listerons pas ici de manière exhaustive les différents réservoirs animaux prouvés ou suspectés, mais nous rappellerons notamment le rôle, trop souvent négligé, de la souris domestique, *Mus musculus* [292, 295-299] dans le cycle de transmission de la leptospirose, ainsi que quelques espèces de rongeurs chez lesquelles *Leptospira* a été isolé : le ragondin, *Myocastor coypus* [300-304], le rongeur africain ("*multimammate mouse*"), *Mastomys natalensis* [155, 298], la souris de plage ("*oldfield mouse*"), *Peromyscus*

polionotus, et le rat du coton ("*cotton rat*"), *Sigmodon hispidus* aux Etats-Unis [296], le mulot des champs, *Apodemus agrarius*, le mulot à collier roux *Apodemus flavicolis*, tous deux présents en Europe [297], le rat musqué, *Ondatra zibethicus* [303], etc.

Leptospira a aussi été isolé à partir de mammifères insectivores tels que les musaraignes des genres *Suncus* [305, 306] ou *Crocidura* sp. [298].

De nombreuses études montrent le rôle du chien comme réservoir zoonotique de *Leptospira*, en Europe, aux Etats-Unis, au Brésil, en Colombie, au Nicaragua, au Japon, etc. [93, 141, 264, 307-318]. Autrefois considéré comme hôte sensible, on sait aujourd'hui que le chien peut être excréteur durable de *Leptospira*, parfois même malgré la mise en œuvre d'un traitement antibiotique adapté [319]. Il semble que lorsqu'il est infecté par *L. interrogans* séro-groupe Icterohaemorrhagiae le chien soit un hôte sensible et que l'infection induise des signes cliniques, par contre, lorsqu'il est infecté par *L. interrogans* séro-groupe Canicola, le chien est un hôte "tolérant", réservoir asymptomatique de la bactérie.

En tant qu'hôte réservoir, pouvant être excréteur et asymptomatique, le chien constitue par conséquent une source potentielle de contamination pour l'Homme : une épidémie de leptospirose a été rapportée chez les chiens entre 2004 et 2006 dans l'ouest de l'état de Washington, et trois cas d'infection locale chez des hommes ont été signalés sur la même période [304].

La vaccination des chiens domestiques n'empêche pas la contamination par *Leptospira* et l'excrétion urinaire de l'agent pathogène, alors même que l'animal reste asymptomatique [309]. Juvet *et al.* [319] ont décrit le cas d'une chienne de 5 ans, vaccinée contre la leptospirose dans les 6 mois précédents, et référée à l'Université Vétérinaire de Dublin pour hyperthermie, ictère, anorexie et vomissements depuis 5 jours. Une concentration importante de spirochètes a été retrouvée dans les urines de l'animal (par observation au microscope à fond noir) le jour de la consultation. Après 13 jours d'une antibiothérapie adaptée, la chienne ne présentait plus de symptômes cliniques, mais l'excrétion urinaire de spirochètes était toujours observable. Ce n'est qu'après trois jours supplémentaires de traitement antibiotique que l'excrétion urinaire n'était plus détectable [319]. Cet article souligne l'intérêt de prolonger le traitement après l'arrêt des symptômes cliniques [319].

Ces résultats montrent l'importance globale de la leptospirose canine et son fort potentiel zoonotique. De plus, malgré un traitement antibiotique adapté, un chien domestique présentant une atteinte aigüe de leptospirose, peut être une source de contamination [319].

L'exemple des canidés, hôtes "sensibles" et "réservoirs" de leptospires (des sérogroupes *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* respectivement) montre l'ambiguïté de la distinction épidémiologique entre "hôtes sensibles" et "hôtes réservoirs", puisque la sensibilité d'une espèce animale peut varier en fonction de la souche/du séro groupe.

1.2. Comment définir une "espèce réservoir" par les résultats d'analyses de laboratoire ?

Les notions suivantes visent à aider le lecteur dans notre interprétation des résultats de sérologie et de qPCR.

La détection d'anticorps sériques chez un animal signifie qu'il a été en contact avec *Leptospira*, néanmoins la sérologie ne permet pas de dater l'infection car le taux d'anticorps ne lui est pas corrélé [13, 227, 320] et il existe des variations individuelles dans la cinétique des anticorps.

L'examen sérologique seul ne permet pas de déterminer qu'un animal est un hôte "réservoir" de la leptospirose.

L'existence de réactions paradoxales (en phase aigüe) et croisées ne permet pas de déterminer avec certitude le séro groupe infectant à partir d'un prélèvement sérologique unique d'un individu (voir **Chapitre II, section 2**) [320, 321].

Si la seconde infection est due à un séro groupe différent de la primo-infection, le test sérologique (MAT) peut refléter trois types de réponses immunitaires :

- Seul le titre en anticorps dirigés contre le séro groupe infectant augmente ;
- Les réactions croisées induisent l'augmentation des titres en anticorps pour plusieurs sérogroupes ;
- Le titre en anticorps dirigés contre le séro groupe infectant augmente mais le/les taux d'anticorps dirigés contre le/d'autres séro groupe(s) impliqué(s) dans les infections précédentes augmente(nt) aussi (réponse anamnestic) [13] (**Figure 9**).

S'il s'agit d'un animal préalablement vacciné contre *Leptospira*, les réponses sérologiques possibles lors d'une primo-infection et lors des contacts suivants seront celles décrites pour une infection secondaire.

Si après une première réponse immunitaire (synthèse d'anticorps) l'hôte n'est jamais recontaminé, son taux d'anticorps baisse et il peut redevenir séronégatif [51, 294, 322], alors même que ses reins peuvent être colonisés par des leptospires et qu'il peut être excréteur urinaire [323]. Lors d'une infection ultérieure due au même sérovar que celui impliqué dans la primo-infection, le taux d'anticorps vis-à-vis de ce sérovar augmente plus rapidement que lors de la primo-infection par ce sérovar (mémoire immunitaire) [324].

Lorsqu'il est infecté, un animal synthétise des anticorps qui lui permettent généralement d'éliminer la bactérie des principaux organes et du système circulatoire ("clairance") excepté les reins, où la bactérie peut se loger durablement [277, 325]. L'animal peut alors devenir porteur rénal de leptospires. S'il devient un porteur chronique ("animal réservoir"), il peut ensuite excréter la bactérie : de façon continue ou discontinue, toute sa vie ou transitoirement puis l'éliminer [325] (**Figure 9**).

Montrer qu'un animal est porteur rénal de leptospires est une indication que cet animal peut être un réservoir de la bactérie. Néanmoins, le statut de "porteur rénal" ne signifie pas que cet animal est infecté de manière chronique (un hôte accidentel, animal ou humain, peut être transitoirement porteur de leptospires dans ses reins et excréteur [275]) ou qu'il contamine l'environnement puisque l'excrétion urinaire est transitoire et discontinue [326].

Les leptospires ne colonisent pas de façon chronique les reins des animaux non réservoirs [9, 327], au sein d'une espèce non réservoir, on s'attend donc à ce que la prévalence du portage rénal soit faible (~ 1%) [328]. Par conséquent, lorsqu'à l'échelle d'une population (ou d'un échantillon), la prévalence du portage rénal est > 10%, nous considérons que la probabilité que cette espèce soit réservoir est forte.

Lors du second contact avec *Leptospira* et lors des contacts suivants, la bactérie peut s'installer au niveau rénal, comme lors de la primo-infection. La possibilité de portage rénal simultané de plusieurs sérovares semble possible mais n'est que peu rapportée [294].

PRIMO-INFECTION

Leptospire du
séro groupe **A**



↗ IgM antiA
↗ IgG antiA

Leptospire du
séro groupe **B**



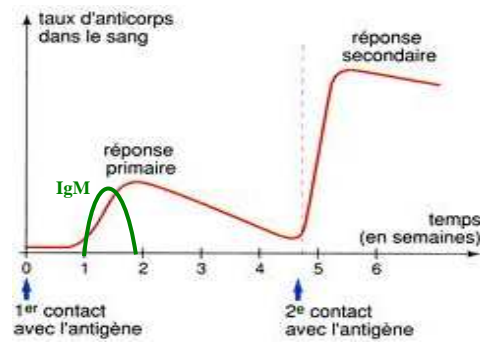
↗ IgM antiB
↗ IgG antiB



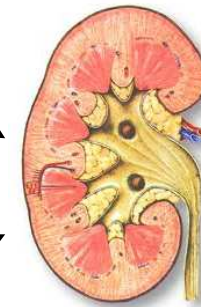
↗ IgM antiB
↗ IgG antiB

+ Stimulation de la réponse mémoire
↗ IgG antiA

MÊME ANIMAL, 2^{NDE} INFECTION
(souche différente de la primo-infection)



Colonisation rénale et
excrétion urinaire



Elimination

Transitoire

Portage
chronique

"Animal réservoir"

Figure 9 : Représentation simplifiée des réponses immunitaires possibles chez un animal infecté par *Leptospira*.

2. Signes cliniques chez quelques espèces domestiques

2.1. Chien

L'infection par *Leptospira* chez le chien est probablement inapparente dans la majorité des cas [329]. Lorsqu'elle s'exprime, la maladie est de sévérité variable, dépendante de la souche infectante (elle-même liée à la localisation géographique) et de la réponse immunitaire de l'hôte. Certains chiens montrent des signes mineurs ou moyens de l'infection, alors que d'autres développent une maladie sévère pouvant conduire à la mort. La leptospirose aiguë est caractérisée chez le chien par une hyperthermie, une anorexie, des douleurs abdominales, des vomissements, une insuffisance rénale et hépatique avec ictère. On peut aussi observer une tachycardie, des hémorragies pulmonaires (**Figure 10**) ou digestives. Dans les cas chroniques (rares), on peut observer une uvéite ou des troubles de la reproduction comme des avortements par exemple [227, 309, 330-333]. Les anomalies pulmonaires sont très fréquentes (dyspnée, radiographie pulmonaire anormale) [332] et la clinique ressemble à celle retrouvée chez l'homme [274]. La maladie est souvent fatale lorsqu'elle n'est pas traitée rapidement.

La maladie chez les chiens est généralement causée par *L. interrogans* et *L. kirschneri* [334]. *L. wolffi* a été identifié chez des chiens en Iran, mais son rôle en tant que pathogène chez le chien demande encore à être confirmé [335]. *L. noguchii* a été isolé chez un chien malade au Brésil [336]. Les sérovars les plus communément retrouvés chez le chien avant l'introduction de la vaccination il y a 40 ans étaient Icterohaemorrhagiae (responsable de formes graves) et Canicola (fréquemment en portage chronique), mais aujourd'hui d'autres sérovars deviennent fréquents dans l'espèce canine, dont Grippytyphosa, Pomona, Bratislava, Pyrogenes, Sejroe et Autumnalis [272, 304, 333, 334, 337-339]. Par ailleurs, Grippytyphosa est le sérotype responsable de la majorité des leptospiroses canines en Allemagne [340], République Tchèque [341], Slovaquie, Pologne, Croatie, Suisse [333] et Italie [342].

La vaccination protège l'animal vis-à-vis des symptômes aigus, mais ne prévient pas toujours de l'infection si l'animal est exposé à une forte concentration de bactéries ou si la souche est très invasive [343]. Des vaccins bivalents contenant les valences Icterohaemorrhagiae et Canicola sont commercialisés depuis le début des années 1970 [224], mais des vaccins contenant les valences Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippytyphosa, et Pomona sont maintenant disponibles en Amérique du Nord [227, 268, 333, 344].

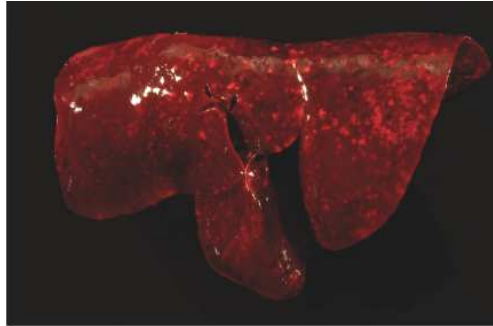


Figure 10 : Poumon de chien atteint d'hémorragie pulmonaire aiguë diffuse sévère.

Photographie prise lors de l'autopsie d'un chien atteint de forme clinique sévère de leptospirose, Berlin, étude conduite entre 2006 et 2010 [274].

La durée de vie des anticorps vaccinaux est peu connue pour l'espèce canine. Hartman *et al.* [345] ont montré que, chez des chiens, la durée de vie des IgG après deux vaccinations avec un vaccin commercial était de 3 mois. Tronel *et al.* [346] rapportent chez le chien une durée de protection vaccinale de 10 mois envers une infection par le sérovar Canicola (mais la durée de l'immunité contre une infection due au sérovar Icterohaemorrhagiae n'a pas été démontrée dans cette étude). Au contraire, d'autres auteurs montrent chez le chien une durée de protection vaccinale d'au moins un an après deux vaccinations avec un vaccin du commerce, avec un fort degré d'immunité contre l'infection rénale due au sérovar Canicola, et, par conséquent, une protection contre l'excrétion urinaire de la bactérie [343, 347, 348].

Comme chez l'Homme, la durée de l'immunité chez les animaux reste peu connue et sujette à des variations individuelles importantes.

2.2. Chat

Des résultats sérologiques montrent que les chats sont exposés à *Leptospira*, mais la maladie clinique est rarement décrite [349, 350]. Les sérovares Canicola, Grippotyphosa et Pomona ont été isolés chez des chats [227, 349, 351], mais ces résultats portent à discussion. Les infections expérimentales de chats montrent une leptospirémie et une leptospirurie mais la maladie n'est pas sévère [352]. Les chats peuvent être exposés à la bactérie dans l'environnement, ou par contact direct avec les rongeurs.

Agunloye *et al.* [353] ont montré une séroprévalence de la maladie de 9,2% sur une population de 87 chats de la région de Glasgow (Ecosse) [353]. Une étude sérologique menée

sur 111 chats en Iran [350] a montré une séroprévalence de 27% parmi les chats domestiques et errants (seuil de positivité pour le MAT 1:100). La séropositivité est retrouvée pour *L. interrogans* sérovar Canicola, *L. interrogans* sérovar Pomona, *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo, *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae, *L. interrogans* sérovar Grippytyphosa [350].

Néanmoins, d'autres enquêtes épidémiologiques n'ont pas réussi à mettre en évidence une infection leptospirosique chez cette espèce [351, 354]. Il semble donc que le chat puisse être un hôte de *Leptospira*, et dans certains cas, pourrait être un réservoir contribuant à la contamination de l'environnement [350]. Néanmoins, le statut épidémiologique du chat envers la leptospirose reste peu étudié, donc très incertain et controversé. Il existe probablement des variabilités géographiques et/ou de souches qui expliqueraient les résultats contradictoires.

2.3. Cheval

L'infection des chevaux est souvent asymptomatique, mais des anticorps sont fréquemment mis en évidence chez des animaux sains [355]. Les principaux sérovares en cause lors d'infection chez les chevaux sont Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Autumnalis, Canicola, et Bratislava [355-360].

Lorsque l'infection est cliniquement exprimée, elle se traduit par des avortements [357, 359, 361-364], la naissance de prématurés [362, 365], des atteintes rénales [366, 367], des atteintes hépatiques ou par des atteintes générales chez le poulain. Toutefois, la forme clinique la plus fréquente est une uvéite qui, expérimentalement, intervient 12 à 24 mois après une inoculation de leptospires [368]. Cette uvéite qualifiée de "uvéite isolée du cheval" ne présente pas de caractères particuliers mais, si elle persiste ou si elle récidive (alors nommée "fluxion périodique"), elle est à l'origine de troubles de la vision et de lésions oculaires (atrophie de l'iris, opacification de la cornée et/ou du cristallin, blépharospasme, larmoiement, œdème de la cornée, hypopion, détachement rétinien, voire cécité) [369-371]. Différentes études ont permis d'isoler des leptospires à partir de prélèvements de corps hyalins de chevaux souffrant d'uvéite récurrente [109, 371-374]. Toutefois, des études ont montré que la pathogénie de cette affection résulte d'une réaction immunitaire due à la présence de communautés antigéniques entre *Leptospira* spp. et les tissus oculaires (notamment cristallin et cornée, voir **Chapitre I**) [111, 375, 376].

En France, l'uvéite isolée du cheval, quelle que soit son étiologie (la leptospirose n'est qu'une des étiologies possibles), est un vice rédhibitoire.

2.4. Bovin

Il semble que dans le monde, les bovins soient principalement infectés par *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo, type Hardjobovis, pour lequel ils sont un hôte réservoir [73, 288]. Néanmoins, en fonction de la région géographique et des spécificités épidémiologiques locales, les bovins peuvent être infectés par une grande variété d'autres sérovars [9]. Les sérovars Hardjo et Bratislava, Grippytyphosa et Pomona sont les plus fréquents chez les bovins [73, 377-385]. Cependant, des leptospires des sérogroupes Hebdomadis et Pyrogenes ont été isolées au Zimbabwe chez des bovins à l'abattoir [386, 387], les sérovars Canicola et Copenhageni ont été isolés à partir d'urines de bovins au Brésil [379], et les sérogroupes Hebdomadis, Autumnalis, Grippytyphosa et Canicola ont été isolés chez des bovins en Inde [388]. A Trinidad (Antilles), la sérologie montre que le séro groupe Icterohaemorrhagiae est le principal séro groupe circulant dans le cheptel bovin de cette île [389].

Chez les ruminants, l'infection conduit généralement à un avortement au cours du dernier trimestre de gestation [390]. Le rôle des leptospires dans les avortements des bovins est estimé à 6% et 10% respectivement au Canada et aux Etats-Unis [391]. D'expression encore plus insidieuse, les conséquences de l'infection ne sont perceptibles qu'au niveau du cheptel. Des signes d'infertilité conduisent à des inséminations répétées, des intervalles sevrage-saillie fécondante allongés [392], etc.

Dans certains cas d'infection aiguë les animaux présentent une anémie, un ictère, une hémoglobinurie, des signes de pneumonie et parfois des symptômes méningés. Deux à quatre mois plus tard, il est possible de noter des cas d'avortement et de mortinatalité. Une néphrite interstitielle peut être observée à l'abattoir [393]. Les sérovars Pomona et Hardjo sont à l'origine d'un syndrome fébrile, d'une anorexie et, chez les vaches laitières, de mammites, d'une chute importante voire totale de la sécrétion lactée durant une période de 2 à 10 jours [9, 394]. Le lait est de couleur jaune, il renferme des grumeaux et souvent du sang. Les répercussions sur la production de lait sont parfois les seuls signes observés. Cette forme clinique, appelée le "milk-drop syndrome", est souvent due au sérovar Hardjo [395, 396].

De plus, la colonisation du foie peut perturber le métabolisme hépatique comme la synthèse des porphyrines qui provoque parfois chez certaines races à peau non pigmentée

comme la Charolaise, des signes spectaculaires de photosensibilisation avec perte de lambeaux entiers d'épiderme [392].

Enfin, *Leptospira* a été détecté dans le sperme de taureau, par conséquent, une transmission vénérienne de la maladie par monte naturelle ou par insémination artificielle (si la semence n'est pas traitée) est possible [397-399] et le taureau utilisé pour la saillie peut être l'élément épidémiologique clé d'un troupeau réservoir de la maladie.

2.5. Ovin et caprin

Chez le mouton, les formes frustrées voire asymptomatiques sont les plus fréquentes [400]. Lors de leptospirose aiguë (rare), on note de l'anorexie, un état d'abattement, une hémoglobinurie, un ictère, une anémie et une mortalité importante chez les agneaux. Dans la forme chronique, des néphrites ont été observées mais les signes cliniques les plus fréquents sont des troubles de la reproduction (mortalité et surtout avortements). Les principaux sérovars retrouvés chez les petits ruminants sont les sérovars Grippotyphosa, Sejroe, Icterohaemorrhagiae et Tarassovi [9, 389].

Chez la chèvre, l'infection conduit à un ictère, à une hémoglobinurie, à une infécondité, à des avortements et à un taux de mortalité important chez les jeunes. Les sérovars les plus fréquents sont Grippotyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae et Canicola.

Comme chez les bovins, une transmission vénérienne de la bactérie semble possible chez les petits ruminants [401].

2.6. Porcin

Chez le porc, les sérovars Pomona, Autumnalis, Tarassovi, Bratislava, Muenchen (séro groupe Australis), et dans une moindre mesure Sejroe semblent les plus fréquents [402-404]. Les sérogroupes Pomona et Australis sont bien adaptés au porc [405]. Les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola peuvent aussi être retrouvés chez cette espèce [137, 389].

Chez le porc, les leptospiroses s'expriment sous des formes très diverses [406] : formes inapparentes, formes subcliniques (néphrites interstitielles chroniques conduisant à la saisie des reins à l'abattoir), formes modérées (fièvre, anorexie, retards de croissance), formes sévères (fièvre, ictère, hémorragie, mort) [9]. Mais, les signes cliniques les plus fréquents et ayant le plus fort impact économique [406] consistent en des troubles de la reproduction

(infertilité, avortements le plus souvent tardifs, contamination des porcelets par voie transplacentaire, mortinatalité) [137, 402]. Les porcs peuvent être infectés de façon chronique et être des réservoirs de leptospires [406].

Une transmission vénérienne de la bactérie, par contamination de la semence par les urines de l'animal infecté est décrite chez le porc [399, 407].



Chez les animaux, les signes cliniques sont variables en fonction de l'espèce et du sérovar infectant. La maladie circule plutôt à bas bruit dans les élevages de ruminants et de porcs, causant des problèmes de reproduction souvent non diagnostiqués et à l'origine de pertes économiques pouvant être importantes.

Il n'existe actuellement pas de vaccin contre les leptospiroses des bovins, petits ruminants et porcs possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France. Mais de nombreux pays, comme les Etats-Unis [408], utilisent la vaccination à grande échelle des bovins et des porcs. Aux Etats-Unis, des vaccins contenant cinq valences (sérovars Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, and Hardjo) sont utilisés chez les bovins. Ces valences vaccinales sont aussi disponibles en combinaison avec d'autres vaccins anti-bactériens ou anti-viraux. Cependant, ces vaccins, s'ils préviennent l'expression des signes cliniques, n'empêchent pas l'infection ni l'excrétion urinaire de la bactérie [53, 408]. De plus, ces vaccins ne sont que partiellement efficaces puisque restreints à un nombre limité de sérovars [53].

Quelle que soit l'espèce, la vaccination ne prévient ni l'infection, ni l'excrétion urinaire ou l'acquisition d'un statut de réservoir [309, 319, 347].

3. La leptospirose animale dans les zones insulaires tropicales

Article 2 : Desvars A, Cardinale E, Michault A. 2011. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiology and Infection*, 139(2): 167-188.

REVIEW ARTICLE

Animal leptospirosis in small tropical areas

A. DESVARS¹*, E. CARDINALE¹ AND A. MICHAULT²

¹ Centre Régional de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, La Réunion

² Service de Bactériologie Parasitologie Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Saint Pierre, La Réunion

(Accepted 10 August 2010; first published online 28 September 2010)

SUMMARY

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world. Humans become infected through contact with the urine of carrier animals, directly or via contaminated environments. This review reports available data on animal leptospirosis in ten tropical islands: Barbados, Martinique, Guadeloupe, Grenada, Trinidad, New Caledonia, Hawaii, French Polynesia, La Réunion and Mayotte. Leptospirosis is endemic in these insular wild and domestic fauna. Each island presents a specific panel of circulating serovars, closely linked with animal and environmental biodiversity, making it epidemiologically different from the mainland. Rats, mongooses and mice are proven major renal carriers of leptospires in these areas but dogs also constitute a significant potential reservoir. In some islands seroprevalence of leptospirosis in animals evolves with time, inducing changes in the epidemiology of the human disease. Consequently more investigations on animal leptospirosis in these ecosystems and use of molecular tools are essential for prevention and control of the human disease.

Key words: Animal, epidemiology, island, leptospirosis, serovar, tropical.

INTRODUCTION

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world but incidence of this disease is higher in tropical areas than in temperate countries [1]. Leptospire bacteria belonging to the family Leptospiraceae, order Spirochaetales. These spirochetes are about 0.1 µm in diameter and 6–20 µm in length [2]. The genus *Leptospira* includes saprophytic (*L. biflexa sensu lato*) and pathogenic (*L. interrogans sensu lato*) bacteria [3] and the serological classification allows discrimination between more than 260 serovars of

L. interrogans. Serovars that are antigenically related are grouped into serogroups but this classification is now challenged by a taxonomically more relevant genomic classification which distinguishes 13 pathogenic genomospecies [4]. Human infection most often occurs when mucous membranes or abraded skin are exposed to infected animal urine, contaminated water or soil, or infected animal tissue [2]. Many wild and domestic animals species have been identified as hosts of infecting leptospiral organisms and are able to maintain the leptospires in their kidneys and become chronic carriers, shedding the organisms in their urine [5]. Therefore, although the organism has been recovered from rats, swine, dogs, cattle, and numerous wild animals [6], micromammals (particularly rats)

* Author for correspondence: Miss A. Desvars, CIRAD Pôle Elevage, Station Ligne Paradis, 7 chemin Irat, 97410 Saint-Pierre, La Réunion.
(Email: amelic.desvars@cirad.fr)

remain the main chronic renal carriers of leptospires [7–9].

We choose to present a limited number of tropical insular areas, selected according to three criteria: (i) island located in the tropics, (ii) land surface of <20 000 km² and (iii) availability of published data on animal leptospirosis. Thus, this review deals with the following islands: Barbados, Martinique, Guadeloupe, Grenada and Trinidad in the Caribbean Sea; New Caledonia, Hawaii and French Polynesia in the Pacific Ocean; and La Réunion and Mayotte in the Indian Ocean (Table 1) [10–13]. This review presents data on leptospirosis by island and by animal species chronologically (Tables 2 and 3) [14–24]. This data-gathering can be considered as a tool for those who work on leptospirosis in tropical islands. Knowledge on the animal reservoirs of *Leptospira* allows a better understanding of the epidemiology of the disease in these areas and also facilitates finding practical applications for control of the disease in humans.

All the areas described are tropical islands with a land surface area <20 000 km². In these regions the climate has two contrasting seasons: a cool and dry season and a hot rainy season. Rainfall on the islands is principally orographic (mountain caused), with the resulting annual rainfall distribution closely following the topographic contours: amounts are greatest over the upper slopes and least on the leeward coast. Geologically, except for Barbados, all these islands are totally or partially of volcanic origin. Because of their small surface area and their isolation, for a given biogeographical area, islands have less species richness per surface unit than the mainland [25]. Moreover, animal populations are often small because of the limited surface area which reduces the capacity of housing. Each tropical island has its own fauna, but all are characterized by a high density of invasive rodents of the family Muridae [26, 27], rats (*Rattus* sp.) or mice (*Mus musculus*) [22, 23, 28]. Several hunting or wild species have also been introduced by humans [20, 22, 29] and domestic animals (dogs, cats) and livestock (cattle, goats, pigs, sheep, horses) are present in all the islands [22]. Except for Trinidad, which has a huge animal biodiversity, bats (order Chiroptera) represent generally the only endemic or indigenous terrestrial mammalian species of these ecosystems. On each island only a small part of the fauna has been studied for leptospirosis (Table 2) [15, 16, 18–23, 30–32]. In this review, we use the species taxonomic level in its Linnean designation. In consequence, domestic animals or wild animals born of

domestic forms, have the same Latin name as the wild ancestral species [33].

Two methods are commonly used to investigate leptospirosis in animals: the microscopic agglutination test (MAT) and the culture in a specific medium. The MAT is the gold standard test and is the one most utilized for the serological diagnosis of leptospirosis [34]. It is based on the use of agglutinating specific antisera and cross-absorption with homologous antigens. Authors can give the results of the MAT at the serogroup or at the serovar level. Serogroups corresponding to the serovars cited in this paper are given in Table 4 [2]. One limitation is that serological results depend on the number of serovars included in the panel [34], but another limitation of the MAT is the difficulty in setting a threshold of positivity which can range from 1:10 to 1:800, according to the authors and the location of the study [35–39]. In contrast, *in vitro* culture of *Leptospira* from kidney, blood or urine allows the serotyping of the isolated strains with certainty [40] but this method is lengthy, of low sensitivity and notably limited by contaminants outgrowth.

BARBADOS

Micromammals and mongooses

A study conducted during 1964–1965 [41] on *Rattus* sp. in Barbados showed that 33% (32/98) of *R. rattus* and 35% (48/138) of *R. norvegicus* were seropositive for leptospirosis by MAT. In 1986–1987 and 1994–1995, Levett *et al.* [42] isolated leptospires by culture of kidneys, urine or blood from 19% (12/63) and 16% (16/100) of rats, respectively. In these studies, the prevalence of renal infection was higher in *R. norvegicus* than in *R. rattus* [41, 42], with 27% (37/138) and 15% (15/98) testing positive, respectively [41]. Isolates identified in *Rattus* were serovars copenhageni (serogroup Icterohaemorrhagiae), arborea (Ballum) and bim (Autumnalis). *R. norvegicus* carried mostly leptospires from serogroup Icterohaemorrhagiae, whereas serogroup Autumnalis was mainly found in *R. rattus* [41].

In 2002, Matthias & Levett [21] showed that 28.2% (24/85) of mice (*Mus musculus*) and 40.7% (48/118) of mongooses (*Herpestes auro-punctatus*) in Barbados had antibodies against *Leptospira* sp. In mice, the prevailing serovars assessed by serology (MAT) were arborea (Ballum) and bim (Autumnalis), whereas in mongooses the dominant serogroup was Autumnalis.

Table 1. *Presentation of the islands*

Island (country)	Location	Number of islands of the archipelago (number inhabited)	Main town, latitude, longitude (highest point)	Total terrestrial surface	Number of inhabitants (year of the census)	Density (inhab./km ²)	Incidence of human leptospirosis (number of cases per year per 100 000 inhabitants)*
Barbados (Barbados)	Caribbean Sea	1 (1)	Bridgetown, 13° 5'N, 59° 37'W (336 m)	430 km ²	281 968 (2008)	642	13.3 [11]
New Caledonia (France)	Southern Pacific Ocean	21 (7)	Nouméa, 22° 16'S, 166° 27'E (1629 m)	18 575 km ²	244 410 (2008)	13.16	22-85 [10]
Hawaii (USA)	Northern Pacific Ocean	122 (8 main islands)	Honolulu, 21° 19'N, 157° 50'W (4205 m)	16 760 km ²	1 211 537 (2000)	42.75	7.9 in Kauai [12] 5.9 in Hawaii [12] 0.3 in Oahu [12] 0.2 in Maui [12] 22.69 [10]
French Polynesia (France)	Southern Pacific Ocean	118 (shared out in 5 atolls)	Papeete, 17° 32'S, 149° 34'W (2241 m)	4167 km ²	259 706 (2007)	65	
La Réunion (France)	Indian Ocean	1 (1)	Saint-Denis, 20° 52'S, 55° 26'E (3071 m)	2512 km ²	810 000 (2009)	313	5.48 [10]
Mayotte (France)	Indian Ocean (Mozambique Channel)	4 (2)	Mamoudzou, 12° 46'S, 45° 13'E (660 m)	376 km ²	186 452 (2006)	499	11.44 [10]
Martinique (France)	Caribbean Sea	1 (1)	Fort-de-France, 14° 36'N, 61° 05'W (1397 m)	1128 km ²	397 732 (2006)	352.59	13.5 (Martinique + Guadeloupe) [10]
Guadeloupe (France)	Caribbean Sea	5 (5)	Basse-Terre, 16° 00'N, 61° 44'W (1467 m)	1434 km ²	400 736 (2006)	246	
Grenada (Grenada)	Caribbean Sea	10 (3)	St-George's, 12° 03'N, 61° 45'W (840 m)	344 km ²	110 000 (2005)	319.8	Not found
Trinidad and Tobago	Caribbean Sea	20 (2)	San Fernando, 10° 17'N, 61° 28'W (940 m)	6768 km ²	1 262 366 (2000)	246	0.08 [13]

* Registered cases only.

Table 2. Insular repartition of the animal cited (class, order, family, Latin name and common name) and existence of studies on leptospirosis by species and island

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
CLASS MAMMALIA										
ORDER RODENTIA										
Family Muridae										
<i>Rattus rattus</i> (ship rat)	• *	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22] *
<i>R. norvegicus</i> (Norway rat)	• *	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19] *	• [18] *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22] *
<i>R. exulans</i> (Pacific rat)						• [21, 22] *	• [23] *	• [22]	• [22]	
<i>Mus musculus</i> (domestic mouse)	• *	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [19]	• [18]	• [21, 22]	• [23] *	• [22]	• [22]	• [22]
Family Cricetidae										
<i>Oryzomys capito</i> (rice rat)					• *					
<i>Rhipidomys couesi</i> (Coues's climbing mouse)					• *					
<i>Nectomys squamipes</i> (South American water rat)					• *					
<i>Necromys urichi</i> (northern akkodont)					• *					
<i>Zygodontomys brevicauda</i> (short-tailed cane mouse)					• *					
Family Heteromyidae										
<i>Heteromys anomalus</i> (Trinidad spiny pocket mouse)					• *					
ORDER LIPOTYPHILA										
Family Tenrecidae										
<i>Tenrec ecaudatus</i> (tailless tenrec)								• [22] *	• [22] *	• [22] *
ORDER DIDELPHIMORPHIA										
Family Didelphidae										
<i>Marmosa mitis</i> (= <i>robinsoni</i>) (mouse opossum)				• [30]	• [30] *					
<i>Marmosa fuscata</i> (dusky mouse opossum)				• [31]	• *					
<i>Didelphis marsupialis</i> (common opossum)		• [20, 22]		• [31]	• [18] *					
Family Caluromyidae										
<i>Caluromys philander</i> (bare-tailed woolly opossum)					• *					
ORDER CARNIVORA										
Family Canidae										
<i>Canis lupus</i> (dog)	• *	• *	• [22] *	• *	• *	• [21, 22] *	• [23]	• [22]	• [22] *	• [22] *
Family Felidae										
<i>Felis sylvestrus</i> (cat)	• *	• *	• [22]	• *	• *	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22]
Family Herpestidae										
<i>Herpestes auropunctatus</i> (small Indian mongoose)	• *	• [20, 22]	• [20, 22] *	• [16] *	• [18] *	• [23] *				
Family Viverridae										
<i>Viverricula indica</i> (small Indian civet)										• [22] *

Table 2 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
Family Phocidae							• *			
<i>Monachus schauinslandi</i> (Hawaiian monk seal)										
ORDER ARTIODACTYLA										
Family Bovidae										
<i>Bos primigenius</i> (cattle)	•	• [22] *	• [22] *	• *	• *	• [21, 22] *	• [23] *	• [22] *	• [22] *	• [22] *
<i>Bubalus bubalis</i> (water buffalo)					• *					
<i>Capra aegagrus</i> (goat)	• *	• [22]	• [22] *	• *	•	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22] *
<i>Ovis orientalis</i> (sheep)	• *	• [22]	• [22]	•	•	• [21, 22]	• [23]	• [22]	• [22]	• [22]
Family Suidae										
<i>Sus scrofa</i> (pig)	•	• [22] *	• [22] *	• *	• *	• [21, 22] *	• [23]	• [22] *	• [22] *	• [22]
Family Cervidae										
<i>Cervus timorensis</i> (rusa deer)						• [21, 22] *			• [22]	
ORDER PERISSODACTYLA										
Family Equidae										
<i>Equus ferus</i> (horse)	•	• [22]	• [22] *	•	• *	• [21, 22] *	• [23]	• [22] *	• [22] *	• [22]
<i>Equus asinus</i> (ass)	•				• *	• *			• [22]	
ORDER CHIROPTERA										
Family Phyllostomidae										
<i>Anoura geoffroyi</i> (Geoffroy's tailless bat)				• *						
<i>Glossophaga longirostris</i> (Miller's long-tongued bat)				• *						
<i>Carollia perspicillata</i> (Seba's short-tailed bat)				•	• *					
<i>Phyllostomus hastatus</i> (greater spear-nosed bat)					• *					
Family Molossidae										
<i>Molossus major</i>					• *					
Family Mormoopidae										
<i>Pteronotus davyi</i> (Davy's naked-backed bat)		•	• [15]		• *					• *
Family Pteropodidae										
<i>Pteropus seychellensis</i> (Seychelles flying fox)										
ORDER PRIMATES										
Family Cercopitheciidae										
<i>Cercopithecus aethiops</i> (vervet monkey)	• *									
Family Cebidae										
<i>Cebus albifrons</i> (Trinidad white-fronted capuchin)					• [18] *					

Table 2 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
ORDER CINGULATA										
Family Dasipodidae										
<i>Dasylops novemchictus</i> (nine-banded armadillo)				● [19]						
CLASS AMPHIBIA										
ORDER ANURA										
Family Bufonidae										
<i>Bufo marinus</i>	● [16] *	● [16]	● [16]	● [16] *	● [16] *		● [16]			
Family Leptodactylidae										
<i>Eleutherodactylus</i> sp.	● *	● [16]	● [16]	● [16]			● [16]			
Family Hylidae										
<i>Hyla minuta</i> (lesser tree frog)					● *					
CLASS REPTILIA										
ORDER SQUAMATA										
Family Teiidae										
<i>Tupinambis nigropunctatus</i> (gold tegu)					● *					
<i>Ameiva ameiva</i> (giant ameiva)				● [32]	● *					
Family Iguanidae										
<i>Iguana iguana</i> (common green iguana)			● [31]	● [31]	● *					
CLASS AVES										
ORDER GALLIFORMES										
Family Phasianidae										
<i>Gallus gallus</i> (fowl)	●	●	●	● *	● *	●	●	●	●	●
ORDER FALCONIFORMES										
Family Cathartidae										
<i>Coragyps astratus</i> (black vulture)					● *					

● Presence of the species on the island.

* Presence of data on leptospirosis for this species in the island concerned.

Primates

A survey conducted on a wild population of vervet monkeys *Chlorocebus (Cercopithecus) aethiops* revealed a seroprevalence to *Leptospira* of 29.9% (150/501). Serogroups identified were Ballum (61%), Icterohaemorrhagiae (16%), Autumnalis (15%), Pyrogenes, Panama, Pomona and Canicola (8% combined) [43].

Amphibians

Everard & Gravekamp [44–46] showed that amphibians were carriers of leptospires and two pathogenic strains were grown from kidneys of toads *Bufo marinus* (family Bufonidae) and frogs *Eleutherodactylus johnstonei* (family Leptodactylidae). The most prevalent strain in amphibians was *L. noguchii* serovar bajan (Australis) [45, 46], followed by serovar bim (Autumnalis) [44–46].

Domestic carnivores

A serological survey showed that 62% (48/78) of asymptomatic (stray or domestic) dogs had a positive MAT titre, with the dominant serogroup being Autumnalis (45%), followed by serogroups Icterohaemorrhagiae and Australis (16% each), then Pomona (13%). However, in dogs presenting clinical signs of leptospirosis, the prevailing serogroup was Icterohaemorrhagiae [47]. In this study, *Leptospira* grown from dogs' kidneys were principally serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and bim (Autumnalis) [47, 48].

Livestock

Levett *et al.* [49] showed that 4.3% of sheep (1/23) and 9.3% of goats (4/43) were seropositive for leptospirosis and antibodies against serogroup Cynopteri were identified in both species [49].

MARTINIQUE**Domestic carnivores**

A serosurvey conducted in Martinique on dogs showed that the seroprevalence against leptospires was 76% (219/288) [50].

Livestock

Levett *et al.* [49] showed that 25.7% (45/175) of cattle were seropositive for leptospirosis and that Sejroe was

the most prevalent serogroup (44.4% of the positives), followed by Icterohaemorrhagiae (24.4%) and Autumnalis (17.7%) [49]. In pigs, the seroprevalence was 39% (110/282), with a predominance of serogroups Icterohaemorrhagiae and Sejroe, followed by Australis and Cynopteri [50].

GADELOUPE**Micromammals and wild carnivores (mongooses and racoons)**

Michel [51] observed the renal carriage of the bacteria *Leptospira* in 16.6% (2/12), 36.8% (14/38) and 57.1% (8/14) of *R. norvegicus*, *R. rattus* and mice, respectively. MAT tests showed that seroprevalences in the racoon and the mongoose were similar with 48% (354/737) and 47% (8/17) positive, respectively [51, 52]. The serovar arborea (Ballum) was predominantly found in kidneys of mice [51], while serogroup Icterohaemorrhagiae was isolated from *R. rattus*, and serogroups Icterohaemorrhagiae, Sejroe and Australis were isolated from mongooses [51, 52].

Domestic carnivores

A recent MAT survey showed that 78.3% (83/106) of the Guadelupian dogs were seropositive against *Leptospira* [50].

Livestock

In 1973–1974, the dominant serogroup in cattle in Guadeloupe was Ballum (prevalence not shown) and the other serogroups found in cattle were Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Australis, Pomona, and Sejroe [53]. A serosurvey in 2002–2003 showed that 14% (29/205) of cattle were serologically positive against *Leptospira* [50].

Levett *et al.* [49] showed that 6.4% (13/203) of goats were seropositive for leptospirosis and Autumnalis, Cynopteri and Sejroe were identified as the infecting serogroups [49].

A serological study in 27 pig farms in the 1990s in Guadeloupe showed that 93% of swine were positive [54] but this seroprevalence fell to 35% (141/403) in 2002–2003 [50].

Equines

In 2002–2003, 61% (74/121) of horses were serologically positive against *Leptospira* [50].

Table 3. Main animal species studied for leptospirosis in the considered islands and results

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Rattus rattus</i>										
Seropositive	33 % (32/98)	ND	36.8 % (14/38)	ND	16 % (5/32)	ND	19.7 % (72/366)	ND	ND	0 % (0/19)
Main serogroups found by MAT	ND	ND	ND	ND	Ictero. Autumnalis Hebdomadi Javanica	ND				/
Renal carriers	15 % (15/98)	ND	ND	ND	ND	61.1 % (11/18) <i>(R. rattus, R. norvegicus, R. exulans)</i>	43.7 % (160/366)			ND
Serogroups isolated from kidney	Ictero. Ballum Autumnalis		Ictero.	Ictero. Ballum	Ictero. Ballum Louisiana		Ictero. Ballum			ND
<i>Rattus norvegicus</i>										
Seropositive	35 % (48/138)	ND	16.6 % (2/12)	ND	43 % (3/7)	See <i>R. rattus</i>	32.4 % (165/510)	ND	ND	Absent
Main serogroups found by MAT	ND		ND	ND	Ictero. Autumnalis Hebdomadi Javanica					
Renal carriers	27 % (37/138)		ND	ND	ND		60.2 % (307/510)			
Serogroups isolated from kidney	Ictero. Ballum Autumnalis		ND	Ictero.	Ictero.		Ictero. Ballum Australis			
<i>Mus musculus</i>										
Seropositive	28.2 % (24/85)	ND	57.1 % (8/14)	ND	29 % (2/7)	ND	66.7 % (26/39)	ND	ND	ND
Main serogroups found by MAT	Ballum Autumnalis		ND		Ictero.					
Renal carriers	ND		ND	ND	ND		79.5 % (31/39)			
Serogroups isolated from kidney	ND		Ballum		ND		Ictero. Ballum			

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Herpestes auropunctatus</i>										
Seropositive	40.7% (48/118)	ND	47% (8/17)	35-36% (152/432-71/200)	48% (17/37)	Absent	28.6% (36/126)	Absent	Absent	Absent
Main serogroups found by MAT	Autumnalis		ND	Ictero. (37.5%) Pomona (21.1%) Canicola (6.6%)	Canicola Ictero. Pomona					
Renal carriers	ND		ND	5.3% (10/190)	4.7% (5/106)		14.3% (18/126)			
Serogroups isolated from kidney	ND		Ictero. Sejroe Australis	Ictero. Bataviae Tarassovi	Canicola		Ictero. Canicola Sejroe			
<i>Bos primigenius</i>										
Seropositive	ND	25.7% (45/175)	14% (29/205)	25% (80/324)	92% (24/26)	58.3% (204/350)	ND	15.5% (23/148) (dairy cattle)	29-32% (452/1582-337/1063)	85% (34/40)
Main serogroups found by MAT		Sejroe (44.4%) Ictero. (24.4%) Autumnalis (17.7%)	Ballum Ictero. Bataviae Australis Pomona Sejroe	Ictero. (28%) Autumnalis (24%) Hebdomadis/ Sejroe/Mini (12%)	Hebdomadis	Sejroe (59.3%) Tarassovi (19.6%) Pomona (7.8%)	Sejroe Bataviae	Sejroe (43%) Tarassovi (14%) Sejroe (10%)	Hebdomadis (25%) Sejroe (25%) Ictero. (12-13%) Pomona (11.7%), Autumnalis (12%) Autumnalis (8.8%) Ballum (5%) Australis (4.5%) Bataviae (4.5%)	Sejroe (29.3%) Canicola (23.5%) Grippytyphosa (23.5%) Ballum (11.7%), Pyrogenes (12%) Autumnalis (8.8%) Australis (2.9%)
Renal carriers	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Capra aegagrus</i>										
Seropositive	9.3% (4/43)	ND	6.4% (13/203)	25% (11/44)	ND	ND	ND	ND	ND	70% (7/10)
Main serogroups found by MAT	Cynopteri		Autumnalis Cynopteri Sejroe	Pyrogenes						Ictero. (28.6%) Sejroe (28.6%) Canicola (14.3%) Ballum (14.3%) Grippotyphosa (14.3%) ND ND
Renal carriers	ND		ND	ND						
Serogroups isolated from kidney	ND		ND	ND						
<i>Sus scrofa</i>										
Seropositive	ND	39% (110/282)	35% (141/403)	35% (45/130)	52% (64/122)	58.3% (21/36)	ND	32-39% (37/115-140/360)	5% (3/57)	ND
Main serogroups found by MAT		Ictero. Sejroe Australis Cynopteri	ND	Autumnalis (35%) Ictero. (32%)	Ictero. (56%) Autumnalis (29%)	Pomona Ictero.		Ictero. (22.6%) Pomona (18%) Australis (16.7%) Canicola (10.8%) Cynopteri (9.9%) Autumnalis (7.1%)	Hebdomadis Autumnalis	
Renal carriers	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND
Serogroups isolated from kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND

Table 3 (cont.)

	Barbados	Martinique	Guadeloupe	Grenada	Trinidad	New Caledonia	Hawaii	French Polynesia	La Réunion	Mayotte
<i>Equus ferus</i>										
Seropositive	ND	ND	61% (74/121)	ND	76% (66/87) (horses and donkeys)	94.4% (17/18)	ND	100% (5/5)	69-71% (100/145-121/171)	ND
Main serogroups found by MAT			ND		Panama (23%) Ictero. (15%) Canicola (9%) Hebdomadis (9%)	Ictero. Pyrogenes Hurtsbridge		Pomona Australis Ictero.	Autumnalis (30-34%) Ictero. (14-18%) Australis Ballum	
Renal carriers Serogroups isolated from kidney			ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Canis lupus</i>										
Seropositive	62% (48/78)	76% (219/288)	78.3% (83/106)	ND	55% (stray dogs)	59.25% (48/81)	ND	ND	40% (58/142-60/150) (stray dogs)	ND
Main serogroups found by MAT	Autumnalis (45%) Ictero. (16%) Australis (16%) Pomona (13%)	ND	ND		Canicola Ictero. Hebdomadis	Ictero. Canicola			Canicola (69%) Ictero. (16-26%)	Ictero.
Renal carriers Serogroups isolated from kidney		ND	ND		20% (10/50) Canicola Ictero. Hebdomadis	ND			ND	ND

ND, No data.
Absent, Species not present on this island.

Table 4. Relation between serovars cited in the text and serogroups (from [2])

Serovars	Serogroups
arborea, ballum	Ballum
autumnalis, bim, bragg	Autumnalis
icterohaemorrhagiae, copenhageni, mankarso, RGA	Icterohaemorrhagiae
australis, bajan, bangkok, bratislava, peruviana	Australis
sejroe, hardjo, wolffi	Sejroe
bataviae	Bataviae
pomona	Pomona
tarassovi, atchafalaya, navet	Tarassovi
canicola, portlandvere	Canicola
cynopteri	Cynopteri
georgia	Hebdomadis
lanka	Louisiana
brasiliensis	Bataviae
grippytyphosa	Grippytyphosa

GRENADA

Micromammals and mongooses

Utilizing kidney culture, Everard *et al.* [19] showed the renal carriage of serovar copenhageni (Icterohaemorrhagiae) in *R. norvegicus*, while serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and ballum (Ballum) were cultured from kidneys of *R. rattus*.

In 1971–1972 and in 1983, two serosurveys showed that 35% (152/432) [13] to 36% (71/200) [19] of the Grenadian mongooses were seropositive by MAT and three serogroups were identified: Icterohaemorrhagiae was the dominant serogroup [13, 19] representing 37.5% (57/152) of the positives, then Pomona in 21.1% (32/152) of the positives and Canicola in 6.6% (10/152) of the positives [13]. Leptospire were isolated from kidneys in 5.3% (10/190) of the mongooses and serovars copenhageni (Icterohaemorrhagiae), brasiliensis (Bataviae) and atchafalaya (Tarassovi) were identified [19].

Bats

In bats of the family Phyllostomidae, 8% (4/52) of *Glossophaga* sp. were found positive for leptospirosis, while 21% (13/61) of positives were found in *Anoura* sp. (13/61) [19]. Of the 121 cultures of bat kidneys none gave a positive result [19].

Amphibians

Everard *et al.* [19] reported 15% (10/66) seropositive in the toad *B. marinus*. Serovars navet (Tarassovi) and peruviana (Australis) were cultured from kidneys in two of these animals.

Livestock

Everard *et al.* [55] found 25% (80/324) of cattle to be seropositive for leptospirosis and Icterohaemorrhagiae was the dominant serogroup (28%), followed by Autumnalis (24%) and Hebdomadis and related serogroups Sejroe and Mini (12%) [55]. They also reported that 35% (45/130) of Grenadian pigs tested were seropositive, of which 35% were against serogroup Autumnalis and 32% against Icterohaemorrhagiae [55]. In sheep, 17% (18/108) were seropositive and Autumnalis was the predominant serogroup (33% of the positive sera). In goats, seroprevalence of leptospirosis was of 25% (11/44) and the dominating serogroup was Pyrogenes [55].

Chickens

Everard *et al.* [55] reported that 11% (19/175) of chickens were seropositive by MAT and antibodies found were mainly against serogroups Hebdomadis (42% of the positives) and Shermani (32%).

TRINIDAD

Micromammals and mongooses

Everard *et al.* [19] showed that 16% (5/32) of *R. rattus* were seropositive by MAT, while 43% (3/7) of *R. norvegicus* and 29% (2/7) of mice were seropositive. In *Rattus* sp. antibodies detected were directed against serogroups Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hebdomadis and Javanica, while in mice, these authors found antibodies against Icterohaemorrhagiae only. Serovar copenhageni (Icterohaemorrhagiae) was isolated from the kidney of *R. norvegicus* and *R. rattus*, whereas serovars ballum (Ballum) and lanka (Louisiana) were isolated from kidneys of *R. rattus* only [19]. Everard *et al.* also showed that in the family Muridae, 24% (4/17) of the scaly-footed water rat *Nectomys squamipes* and 29% (2/7) of the rice rat *Oryzomys capito* were serologically positive. Twenty-five per cent (1/4) of the Trinidad spiny pocket mice *Heteromys anomalus* (family Heteromyidae) tested were positive. No antibodies

against leptospires were found in Coues's climbing mouse *Rhipidomys couesi* (family Cricetidae) (0/2), nor the northern grass mouse *Necomys urichi* (family Cricetidae) (0/1) or the cane mouse *Zygodontomys brevicauda* (family Muridae) (0/1) [19].

In 1976, the proportion of seropositive Trinidadian mongooses ranged between 33.3% and 51.1% [13], whereas in 1983, 48% (17/37) of the mongooses sampled were seropositive [19]. In both studies, MAT results showed that serogroup Canicola predominated in this species [13, 19], but Icterohaemorrhagiae and Pomona were also encountered [13]. Canicola strains were isolated from the kidneys of mongooses [13, 19], with an infectivity rate of 4.7% (5/106) [13].

Bats

On the eight species of bats caught by Everard *et al.* [19], four presented a seropositive result with the MAT method: *Carollia perspicillata* (family Phyllostomidae), with 11% (2/19) seropositive; *Phyllostomus hastatus* (family Phyllostomidae), with 27% (13/48) seropositive; *Pteronotus davyi* (family Mormoopidae), with 13% (2/15) seropositive and *Molossus major* (family Molossidae) with 25% (5/20) seropositive. Serogroups identified in bats were: Autumnalis, Hebdomadis, Javanica, Panama, Pyrogenes, Tarassovi, and Cynopteri [19].

Didelphimorphia

Everard *et al.* [19] showed that in the order Didelphimorphia, 5% (1/22) of the black-eared opossums *Didelphis marsupialis* (family Didelphidae) and 4% (5/73) of the murine opossums *Marmosa mitis* (= *M. robinsoni*, family Didelphidae) were found seropositive. Seven per cent (1/14) of the white-eared opossums *Caluromys philander* (family Caluromyiidae) were seropositive. Serovars lanka (Louisiana) and ballum (Ballum) were cultured from kidneys of *M. mitis* and serovar ballum (Ballum) was isolated from *C. philander*. Serological research of leptospiral antibodies was negative in *Marmosa fuscata* (*fuscatus*) but renal cultures revealed the presence of serovar lanka (Louisiana) in this species [19].

Primates

Leptospiral antibodies were researched in *Cebus* sp. (family Cebidae) but revealed as negative [19].

Squamates and amphibians

Forty-two per cent (5/12) of the gold tegu *Tupinambis nigropunctatus* (order Squamata, family Teiidae) sampled were found positive by MAT, while all the lizards *Ameiva ameiva* (family Teiidae) (4/4) and all the iguanas *Iguana iguana* (family Iguanidae) (1/1) caught were seropositive [19]. Everard *et al.* [19] showed that 25% (20/80) of the marine toads *B. marinus* were seropositive but none (0/2) of the lesser tree frogs *Hyla minuta* (order Anura, family Hylidae) tested positive. Serovar autumnalis (Autumnalis) was isolated from the marine toad [19].

Domestic carnivores

In 1979, serological data reported that at least 55% of the stray dogs had been exposed to leptospires as opposed to only 12.5% of the cats. Agglutinins against serogroups Canicola, Icterohaemorrhagiae and Hebdomadis were found most frequently in these species [56]. Twenty per cent (10/50) of the sampled dogs carried leptospires in their kidneys [56]. Serovars isolated in dogs were portlandvere (Canicola), canicola (Canicola), copenhageni (Icterohaemorrhagiae) and georgia (Hebdomadis), whereas serovar canicola was isolated from one cat. A seroepidemiological survey was conducted in 2005 in different populations of Trinidadian dogs [57]: among house dogs 7.7% (5/65) of the non-vaccinated animals were seropositive. The prevalence was the highest among hunting dogs with 25.5% (12/47) positive, while 20.4% (10/49) and 4.4% (5/113) of the farm and stray dogs, respectively, were seropositive. In the population of dogs suspected of leptospirosis, 48% (24/50) were seropositive. Nine serovars of *L. interrogans* were identified in this species. The most prevalent serovar was mankarso (Icterohaemorrhagiae), in 47.5% of the seropositive dogs (29/61). The other serovars were icterohaemorrhagiae RGA (Icterohaemorrhagiae 32.8%, 20/61), autumnalis (Autumnalis 41%, 25/61), copenhageni (Icterohaemorrhagiae 16.4%, 10/61), bratislava (Australis 13.1%, 8/61), georgia (Hebdomadis), ballum (Ballum) and wolffi (Sejroe) (1.6% each, 1/61) [57].

Livestock

In 1985, MAT results reported that 92% (24/26) of cattle were seropositive with serogroup Hebdomadis predominating [55]. All of the ten 'bufflypsy' (water buffaloes, *Bubalus bubalis*) tested were positive and

the prevailing serogroup in these animals was Grippotyphosa [55]. In 2009, a larger study reported that 14.6% (33/226) of the water buffaloes were seropositive [58].

Among swine, it was shown that 52% (64/122) of the sampled animals were serologically positive with 56% and 29% of those seropositive having antibodies against serogroups Icterohaemorrhagiae and Autumnalis, respectively [55].

Equines

MAT results showed that 76% (66/87) of horses and donkeys were seropositive [55]. Panama was the most frequently reported serogroup (23% of positive animals), followed by Icterohaemorrhagiae (15%), Canicola and Hebdomadis (9% each) [55].

Poultry and wild birds

Everard *et al.* [55] showed that 11% (16/144) of the chickens tested had a positive serological reaction against *Leptospira*. Fifty per cent of the reactions were against serogroup Shermani, while 25% were against serogroup Hebdomadis. Eight ducks and geese were also tested but were negative. No leptospiral antibodies were found in the American black vulture *Coragyps atratus* [55].

NEW CALEDONIA

Micromammals

In 1985–1986, a study based on culture showed that 61.1% (11/18) of rats (*R. rattus*, *R. norvegicus*, *R. exulans*) excreted leptospire in their urine [59]. A complementary study identified the leptospire shed in urine of rats as belonging to serogroups Icterohaemorrhagiae and Canicola [60].

Domestic carnivores

In 1985–1986, Brethes *et al.* [60] reported that 59.25% (48/81) of canids in New Caledonia were seropositive, of which 39.6% (19/48) had antibodies against serogroup Icterohaemorrhagiae. In the particular area of Bourail (a 'hot-spot' of human leptospirosis in New Caledonia), 63% (29/46) of dogs were seropositive, of which 55% (16/29) were against Icterohaemorrhagiae. Predominance of serogroup Icterohaemorrhagiae in canids was confirmed in 1999 by the Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire (LTDV) whose results reported serological evidence

of a high circulation of serogroup Canicola in dogs [61].

Livestock

All cattle sampled (15 animals) in the area of Bourail in 1985–1986 were positive by MAT [60]. A subsequent survey in 1990 on the entire New Caledonian cattle assessed the seroprevalence at 58.3% (204/350), with 74.6% (85/114) of the surveyed herds having at least one positive animal [62]. Serogroups Sejroe, Tarassovi and Pomona were circulating in New Caledonian cattle [60, 62], with a prevalence of 59.3%, 19.6% and 7.8% among the positive animals, respectively [62]. In 2007, the annual report of the LTDV confirmed the predominance of serovars hardjo (Sejroe) and sejroe (Sejroe) in cattle [10].

In 1985–1986, 58.3% (21/36) of pigs were found to be seropositive for leptospirosis. By MAT, sera reacted principally against serogroup Pomona and secondly against Icterohaemorrhagiae [59].

Antibodies against serovar hardjo (Sejroe) were found in the Rusa deer [60].

Equines

In 1983, MAT results showed that the dominant serogroups in horses in New Caledonia were Canicola and Pomona [63]. In 1986, the dominant serogroup was Icterohaemorrhagiae: 17/18 of the horses sampled in the area of Bourail were seropositive, of which nine were against Icterohaemorrhagiae [60]. Icterohaemorrhagiae was still prevailing in horses in 1996 [64]. However, since 1996, inclusion of serogroups Pyrogenes and Hurtsbridge in the MAT panel of strains demonstrated the high circulation of these serogroups in positive horses, with a frequency of 29.3% and 18.8%, respectively, in 1996 [64]; 18.7% and 43.2%, respectively, in 1998 [65]; and 52.3% and 32.1%, respectively, in 1999 [61].

A serological survey conducted on the donkeys of Maré (Loyalty Islands) in 1999 proved that 97% (38/39) of the sampled animals had antibodies against *Leptospira*. The dominant serogroups were Hurtsbridge and Pyrogenes [61].

HAWAII

Micromammals and mongooses

In the 1950s and 1960s, the study of Wallace *et al.* [66] on Hawaiian rats *R. norvegicus*, *R. rattus*, *R. hawaiiensis* (= *R. exulans*), mice and mongooses

reported that 45% (558/1238) of these mammals had antibodies against *Leptospira*. A survey conducted between 1959 and 1961 on 1281 mammals (same species as cited above) [67] showed that mice and *R. norvegicus* populations were highly infected, with respectively 66.7% (26/39) and 32.4% (165/510) seropositive by MAT and 79.5% (31/39) and 60.2% (307/510) renal carriers. They were followed by the mongoose with 28.6% (36/126) seropositive, and 14.3% (18/126) renal carriers. The serological prevalence in *R. rattus* was lower with 19.7% (72/366) seropositive contrasting with the high rate of renal carriage (43.7%, 160/366) in this species [67]. Cultures of kidney tissues proved the renal carriage of serovar icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) in all the species [66, 67]. Serovar ballum (Ballum) was only recovered in *R. rattus* [66]. One isolate of the serogroup Australis was obtained in *R. norvegicus*, while serogroups Canicola and Sejroe were isolated from the mongoose only [67]. Another survey was conducted in Hawaii between 1969 and 1973 on 2982 animals of the same species [68] and the following seroprevalences were found: 34.0% (419/1234) positive in *R. rattus*, 61.4% (137/223) in *R. norvegicus*, 17.8% (166/932) in *R. exulans*, 43.2% (41/95) in *M. musculus* and 28.8% (136/473) in *H. auropunctatus* [68]. Cultures of kidneys showed that serogroup Icterohaemorrhagiae was predominant in *R. norvegicus* (91.4% of positives, 85/93), while 58.7% (24/41) of the identified cultures recovered from mice were from serogroup Ballum and 59.7% (43/72) of those recovered from mongooses were from serogroup Sejroe. Serogroups Icterohaemorrhagiae and Ballum were isolated from all rat species and mice, but not from mongooses, while Sejroe was isolated only from mongooses [68].

Marine mammals

A serological study on the endemic monk seals of Hawaii *Monachus schauinslandi* (order Carnivora, family Phocidae) showed that leptospirosis was circulating in this population and that monk seals had positive titres against serovars bratislava (Australis), hardjo (Sejroe), icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) and pomona (Pomona) [69].

Livestock

Serovars hardjo (Sejroe) and bataviae (Bataviae) were identified by MAT in cattle on Kauai island in 1987 [70].

FRENCH POLYNESIA

Livestock

In 1988, Raust [71] published the results of a serological survey showing that 15.5% (23/148) of dairy cattle were seropositive and that the dominant serovar was hardjo (Sejroe) in 43% of those positive, followed by serovar tarassovi (Tarassovi) in 14% and serovar sejroe (Sejroe) in 10%. A health control conducted in 1997 in cattle confirmed the results of 1988 [72].

In 1988, 32% (37/115) [71] to 39% (140/360) [65] of pigs were seropositive by MAT. Both studies reported icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) as the most prevalent serovar in this species (22.6% of positive pigs for the former, 96% for the latter). The first study also identified pomona (Pomona, 18%), bratislava (Australis, 16.7%), canicola (Canicola, 10.8%), cynopteri (Cynopteri, 9.9%) and autumnalis (Autumnalis, 7.1%) as circulating serovars in pigs [71].

Equines

Only five horses were tested during the survey of Raust in 1988 [71], and all were seropositive. Serovars pomona (Pomona), australis (Australis) and icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) were identified in this species.

LA RÉUNION

Micromammals

In 2007, a serological survey on tenrecs *Tenrec ecaudatus* (order Lipotyphla, family Tenrecidae) showed a seroprevalence of 92% (34/37) in this species with all sera predominantly reacting against serogroup Icterohaemorrhagiae [73].

Domestic carnivores

Two serosurveys conducted in a dog pound in 1977–1979 [74] and 1978–1983 [75] showed that 40% (58/142 and 60/150, respectively) of the stray dogs were seropositive by MAT. In the former study, serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae were found in 69% (40/58) and 26% (15/58), respectively, of the seropositive dogs [74] while in the latter study 16% of those seropositive had antibodies against Icterohaemorrhagiae [75].

Livestock

In 1978–1979, two simultaneous serological studies showed similar results with 29% (452/1582) [76] and 32% (337/1063) [74] of cattle having a positive serological titre. Serogroups Hebdomadis and Sejroe each represented 25% of the seropositive reactions [74, 76], serogroup Icterohaemorrhagiae accounted for 12–13% [75, 77], Pomona 12% [76], Autumnalis 10–12% [74, 76], Ballum 5% [76], Australis, Bataviae and Grippytyphosa 4.5% each, and Canicola 0.5% [76]. In La Réunion, serogroups Sejroe and Hebdomadis were recognized as a major cause of abortion in dairy cattle [77].

A sampling conducted in 1979 at a slaughter-house revealed a limited circulation of leptospires in swine, with 5% (3/57) of pigs seropositive and circulation of serogroups Autumnalis and Hebdomadis [74]. Currently, field data indicate a high seroprevalence rate in reproduction swine: a serological follow-up of 13 pig farms between 2001 and 2008 showed that each year 6–29% of the tested sera were positive (Dr P. André, personal communication).

Equines

At the end of the 1970s, there were four riding schools in La Réunion, accounting for about 150 horses. In this equine population, 10–20 cases of leptospirosis occurred throughout the year [77]. In 1979, two serological surveys [74, 76] revealed that 69% (100/145) to 71% (121/171) of the horses were seropositive. Eleven different serogroups were serologically identified in horses and the predominant serogroup was Autumnalis (30–34% of positive reactions), while Icterohaemorrhagiae was found in 14–18% of positive animals [74, 76]. In 1983, Mollaret *et al.* [75] confirmed that 12% of horses were serologically reactive against serogroup Icterohaemorrhagiae. Moutou [74] pointed out that the prevailing serogroup differed among the riding school of origin: Icterohaemorrhagiae in the riding school of St-Denis, Australis in the riding schools of St-Gilles and Tampon, Ballum in horses of Bras Panon. Nevertheless, in 1990, following a clinical outbreak of leptospirosis in the riding school of Tampon, 22 horses were tested. All were seropositive for Icterohaemorrhagiae (Dr A. Michault, personal communication). Thus if leptospirosis is highly prevalent in horses in La Réunion without systematic clinical expression of the disease, serogroup Icterohaemorrhagiae could be responsible for clinical outbreaks.

MAYOTTE

Micromammals and wild fauna

The 19 rats sampled in 1991 were all seronegative by MAT [78].

In the same year, the circulation of serovar hardjo (Sejroe) was shown in two out of ten tenrecs *T. ecaudatus* and in the only fruit bat *Pteropus seychellensis* (order Chiroptera, family Pteropodidae) caught. Antibodies against serogroup Pyrogenes and serovar wolffi (Sejroe) were also found in the tenrec, while antibodies against serovar icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) were found in small Indian civets *Viverricula indica* (order Carnivora, family Viverridae) [78].

Domestic carnivores

MAT results showed the circulation of serovar icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae) in dogs [78].

Livestock

At the beginning of the 1990s, zebus, goats and dogs were highly infected, with 85% (34/40), 70% (7/10) and 83% (5/6) seropositive, respectively. In zebus, serovars identified by MAT were canicola (Canicola), grippytyphosa (Grippytyphosa), sejroe (Sejroe), each accounting for 23.5% of the seropositives, then ballum (Ballum, 11.7%), Pyrogenes (8.8%), wolffi (Sejroe, 5.8%) and australis (Australis, 2.9%). In goats, serovars were icterohaemorrhagiae, wolffi (each accounting for 28.6% of seropositives), canicola, ballum and grippytyphosa (14.3% each) [78].

DISCUSSION

Origin of the serovars

Introduction of animal species in a region induces introduction of simultaneous pathogens. So, originally, the presence of leptospiral serovars circulating on each island was linked with the history of the human colonization and the shipping importations of animals by the Europeans [20, 28, 79]. Nevertheless, serovars circulating on a colonized island are different from those of the colonizing country. Even if no study has compared mainland and tropical islands, we know that serovars carried by rats, mice and hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in New Zealand are not the same as those carried by the same species in

Great Britain, the country from where they were imported during colonization [80]. Thus, the few serogroups of leptospires circulating in animals on an island are specific to the animals which have colonized the island and could maintain themselves in this typical environment. Serovars present on tropical islands are generally circulating worldwide but each island represents a unique ecosystem, the limited panel of serovars found in each insular area is absolutely island specific.

The case of vaccinated animals

The most commercially available vaccines against leptospirosis are for dogs and are directed against serogroups Icterohaemorrhagiae and Canicola. Consequently, the presence of seropositive domestic dogs [50] and the presence of both these serogroups in high proportions in populations of healthy dogs [60, 61] could be partly explained by the vaccination measures currently practised in the majority of the presented islands. Nevertheless, a study in Trinidad showed that vaccination did not have any significant effect on *Leptospira* infection as similar prevalence of infections were detected for both vaccinated (5.3%) and non-vaccinated dogs (7.7%) [57]. Moreover, Hathaway *et al.* [80] showed that agglutinins induced by the vaccine disappear within weeks of administration [81]. Consequently, the seropositive dogs detected in the different studies were essentially due to exposure to field serovars of *Leptospira* sp.

Carrier state and immune response

In Hawaii the rate of renal infection in *R. norvegicus*, *R. rattus* and *M. musculus* is significantly higher than the serological prevalence in each species [67]. The same observation was reported in the rodent population of Terceira Island (Azores) [9] and in *R. norvegicus* caught in Brazil [7, 38]. Duration of immunity is not known in field rats, but after infection in carrier animals, leptospires are subsequently cleared from all organs except the renal tubules [82]. Thus, in the absence of re-infection, carrier animals may be serologically negative, thus the carrier state may not be detected in MAT-positive animals. In contrast, other studies showed that the serological prevalence in rats is higher than the renal carriage [8]. Consequently, serology is often not clear, as MAT-negative bacteriologically proved carriers may be encountered [2].

Diversity of hosts and serovars in insular areas

In insular areas of volcanic origin like La Réunion, Mayotte, Hawaii, Martinique, Guadeloupe and French Polynesia, the mammalian diversity is generally poor and leptospires have a limited choice in mammalian hosts compared to the larger choice offered by continental countries like Guyana [83], Peru [84], Brazil [85], or larger islands, e.g. New Zealand [80] or Australia [86]. In consequence, bacteria concentrate themselves in abundant species, susceptible but generally non-sensitive, living most frequently in an anthropic environment, and which are perfect to play the role of reservoir and spreader of bacteria. On these islands, this role is played most frequently by alien species, e.g. rats and mice, or even mongooses and dogs.

Almost all knowledge on leptospirosis is related to infection in mammals but the finding of *Leptospira* in amphibians and reptiles [45, 46], which live in moist or wet environments, and birds [55], leads to questions about the role of these species, if any, in the carriage and maintenance of foci of leptospirosis.

Comparison with mainland

The seroprevalence of leptospirosis in animals seems to be higher in small islands than in mainland or larger islands but the number of circulating serovars is lower. In fact, the diversity of serovars in a region may be correlated on the one hand directly with the faunistic diversity of the area (number of potential hosts) and on the other with its environmental diversity [8]. For example, in Australia, which can be considered as the nearest 'mainland' from New Caledonia, the prevalence of leptospirosis in the dog population is 1.9% (18/956) [87], which is markedly inferior to the prevalence in New Caledonian dogs (59.25%) [60]. Nevertheless, although only two serovars are described in the New Caledonian canids [60, 61], 11 are found in Australian dogs [87]. An other example can be found in Trinidad which has a greater mammal species diversity (about 100 mammalian species) than the neighbouring island of Grenada (15 mammalian species): 80 isolates of *L. interrogans* were reported in Trinidad to infect humans, domestic and wild animals, and only 20 were reported in Grenada [88]. The hypothesis is reinforced by the situation in the temperate Azorean islands (North Atlantic ocean) where three serovars are described in the four rodents and insectivorous

mammal species present, while six serovars are counted among the 21 micromammals in Portugal [51, 89].

Adaptation of the serovars to insular ecosystems

When a serovar is introduced within a new ecosystem, it finds an ecological niche that may be different from the one it uses in its native environment. Indeed, one animal species, living in two different countries/islands within two different ecosystems, may offer two distinct ecological niches for leptospire [80, 90]. Generally, in a geographical region an equilibrium is established in which there is an 'adaptation' of a serogroup to a reservoir species [4, 74]. Thus, the Indian mongoose (*H. auro-punctatus*) is considered as a reservoir for serogroups Sejroe, Icterohaemorrhagiae and Canicola in Hawaii [67, 68], serogroup Sejroe in Oahu island [91], serogroups Icterohaemorrhagiae, Sejroe and Australis in Guadeloupe [51, 52], serogroup Canicola in Trinidad [13, 19] and serovars *copenhagensis* (Icterohaemorrhagiae), *atchafalaya* (Tarassovi) and *brasiliensis* (Bataviae) in Grenada [19]. Moreover, in La Réunion, Moutou [74] reported that the dominant serogroup identified by serology in horses differed according to the riding school in which the animals lived, i.e. according to the geographical zone of the island.

Lastly, it should be noted that phenomena of speciation by adaptation to a particular host in a small biotope can lead to the appearance of new serovars, e.g. serovar *bim* (Autumnalis) in dogs on Barbados [48] or *atchafalaya* (Tarassovi) in Grenadian mongooses [19], or even serovar *lanka* (Louisiana) in Trinidad [19].

Evolution of seroprevalence

Few studies report a follow-up of the seroprevalence of leptospirosis in animal species. A survey was conducted between 1959 and 1961 on five species of wild mammals in Hawaii [67] and another survey on the same species was conducted between 1969 and 1973 [68] (see earlier results): comparison between the two studies shows that (i) serogroups of *Leptospira* sp. isolated by culture in each animal species were the same but the relative distribution of the serovars per species was different and (ii) the serogroup Sejroe was emergent in the mongoose. Furthermore, the respective densities of the rodents and mongooses have

changed in Hawaii, with an increase of the populations of *R. rattus*, *R. exulans* and mongooses, while the populations of *R. norvegicus* and mice decreased. In consequence, although in the 1960s *R. norvegicus* and the mouse were the main reservoirs of leptospire in Hawaii, in 1973 *R. rattus* represented the main bacterial reservoir. Therefore, the epidemiology of the disease had changed in Hawaii, switching from a peridomestic animal reservoir (*R. norvegicus* and mouse) to a more rural reservoir (*R. rattus* and mongoose) [68].

Different examples show that the seroprevalence of leptospirosis in one species seems to be quite stable over time. In 1971–1972 and in 1983, two serosurveys proved that the seroprevalence assessed by MAT in mongooses in Grenada did not evolve over 10 years with a prevalence of 35% [13] and 36%, respectively [19]. Moreover, prevalence of antibodies did not change much in Trinidadian mongooses over 6 years, with 33.3–51.1% seropositive in 1976 [13], whereas in 1983, 48% of the mongooses sampled were seropositive [19]. In La Réunion two serosurveys conducted in the same dog pound at two distinct periods (1977–1979 [74] and 1978–1983 [75]) showed that 40% (58/142 and 60/150, respectively) of the stray dogs were seropositive by MAT. Similarly for French Polynesia the seroprevalence in cattle did not evolve between 1988 and 1997 [65].

Nevertheless, an exception can be found in the population of pigs in La Réunion in which the seroprevalence seemed to increase significantly over 30 years going from 5% of pigs seropositive in 1979 to 6–29% at 7 years follow-up conducted between 2001 and 2008. Three hypothesis can be put forward: (i) the survey of Moutou [74] underestimated the prevalence of the disease in swine, either because of a too small sample size or because the animals sampled were too young; (ii) the disease has greatly evolved in La Réunion, with a 'burst' occurring during the last 30 years; (iii) changes in the methods of farming, going from small family pig farms to battery industrial breeding farms could have induced an evolution in the prevalence of leptospirosis in pigs. Thus, higher animal density could favour the maintenance and transmission of the disease inside farms, and the gathering of fattening animals born in different reproductive farms, or in a growing farm could favour the spread of the disease between sites. Moreover the seroprevalence and consequences of the disease are different when considering breeding sows or grower animals [92].

Meteorological factors

In tropical regions, high rainfall is the main climatic factor of maintenance of leptospires in the environment and of their transmission to exposed animals and humans [93, 94]. A survey conducted in Hawaii between 1969 and 1973 showed that the seroprevalence rates in rodents and mongooses were higher on the Eastern coast (where rainfall is high) than on the Western part of the island [68]. In North America, a statistical positive correlation was also demonstrated between prevalence of infection in dogs and rainfall [95]. Moreover, in 2002–2003 and 2003–2004 the Caribbean region had two successive years of the El Niño phenomenon, which resulted in an increase in rainfall and probably in a proliferation of rodents which modified the epidemiology of human leptospirosis in Guadeloupe. In consequence, not only was there an increase in the total number of human cases observed in this island, but also the number of cases due to serogroup Ballum, a mouse-associated serogroup [8, 9] increased [96].

Nevertheless, cyclones do not appear to be linked with an increase in the number of human cases in La Réunion (Dr A. Michault, personal communication), nor in Guadeloupe [96]. It is likely that these intense climatic phenomena are responsible for the leaching of the environmental reservoirs and the destruction of the habitats of the micromammals considered as reservoirs [96].

CONCLUSION

This paper reviews the current knowledge on animal leptospirosis in small tropical islands and shows that the specificity of the host–serovar relation is greatly dependent of a specific insular ecosystem. However, the interpretation of the serological results and comparison between islands might be hazardous for two main reasons: (i) data are mainly stemmed from sero-epidemiological surveys that include a variable number of species and individuals, and (ii) methods of analysis and thresholds of positivity differ between studies.

Nonetheless, leptospirosis appears endemic in the majority of the animal species. If the status of domestic or peri-domestic (rats, mongooses, mice) animals against leptospirosis has been well studied in insular areas, the wild fauna has been investigated less so. The interest of the scientific community in animal leptospirosis in these regions is modest thus far, and

available data are often poor, mainly due to the fact that research is concentrated on the human disease. This paper stresses the need for more research in this field and highlights that studies on fauna have to be done at the island scale. Identification of the prevailing serovars and of their animal reservoirs is essential to understand the particular epidemiology of leptospirosis on each island and advise measures of prevention for humans. Furthermore, the economic cost of human and animal leptospirosis in these islands is not negligible [97]. Because molecular tools are more powerful than serology and because they allow the establishment of stronger epidemiological links between strains circulating in animals and those inducing disease in humans, the use of genotyping techniques needs to be incorporated into epidemiological studies of *Leptospira* sp. in insular areas in order to generate more meaningful and translational data.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Pierre Aubry (Emeritus Professor at the Medicine Faculty of Antananarivo, Madagascar), Margarida Collares-Pereira (Institute of Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, Portugal) and Cyrille Goarant (Pasteur Institute, New Caledonia) for providing several cited papers. We thank François Moutou (AFSSA, Paris), Michel Pascal (INRA, Rennes), Pascale Bourhy (Centre National de Références des Leptospiroses, Pasteur Institute, Paris), Vincent Porphyre (CIRAD, La Réunion) and Paul André (Veterinarian, La Réunion) for their scientific advice, and Hélène Delatte (CIRAD, La Réunion) for support.

Political and population information on countries has been extracted from Wikipedia via the internet and is not necessarily accurate.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Everard COR. Leptospirosis in the Caribbean. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1981; **15**: 397–399.
2. Faine S, *et al.* *Leptospira and leptospirosis*, 2nd edn. Melbourne, Australia: MediSci, 1999, p. 296.
3. Morey RE, *et al.* Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; **44**: 3510–3516.

4. **Adler B, de la Peña Moctezuma A.** Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2010; **140**: 287–296.
5. **Bahaman AR, Ibrahim AL.** A short review of animal leptospirosis with special reference to Malaysia. *Tropical Biomedicine* 1987; **4**: 93–99.
6. **Levett PN.** Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14**: 296–326.
7. **Pereira MM, Andrade J.** Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospire and specific antibodies in rodents. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; **82**: 768–770.
8. **Vanasco NB, et al.** Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; **60**: 227–235.
9. **Collares-Pereira M, et al.** Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island Azores. *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 1151–1157.
10. **Centre National de Référence des leptospires.** Rapport annuel d'activité pour l'année 2007. Paris: Institut Pasteur.
11. **Everard CO, et al.** A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. *European Journal of Epidemiology* 1995; **11**: 311–320.
12. **Katz AR, et al.** Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974–1998. *Clinical Infectious Diseases* 2001; **33**: 1834–1841.
13. **Everard COR, Green AE.** Leptospirosis in Trinidad and Grenada, with special reference to the mongoose. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1976; **70**: 57–61.
14. **Gargominy O, et al.** Consequences for biodiversity of plant and animal species introductions in New Caledonia [in French]. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 1996; **51**: 375–402.
15. **Official Website of the Association for Preservation and Rehabilitation of Wildlife Caribbean [in French]** (<http://www.faune-guadeloupe.com/3-categorie-755619.html>). Accessed 17 September 2009.
16. **Global Invasive Species Database** (<http://www.issg.org/database>). Accessed 10 November 2009.
17. **World Wildlife Fund Full Report.** Trinidad and Tobago moist forests (http://www.worldwildlife.org/wildworld/profiles/terrestrial/nt/nt0171_full.html). Accessed 5 October 2009.
18. **Long JL.** *Introduced Mammals of the World. Their History, Distribution and Influence.* Victoria, Australia: CSIRO Publishing, 2003, p. 612.
19. **Everard CO, et al.** Leptospire in wildlife from Trinidad and Grenada. *Journal of Wildlife Diseases* 1983; **19**: 192–199.
20. **Lorvelec O, Pascal M, Pavis C.** Checklist and status of the French West Indies mammal species (except Chiroptera and Cetacea) [in French]. Petit-Bourg, Guadeloupe: Association for Study and Protection of Vertebrates and Plants of the Lesser Antilles, 2001.
21. **Matthias MA, Levett PN.** Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Medical Journal* 2002; **51**: 10–13.
22. **Soubeyran Y.** Exotic invasive species in French overseas collectivities. Inventory and recommendations. Synthesis by collectivity [in French]. Paris, France: IUCN French Committee, 2008, p. 141.
23. **Stone CP, et al.** Non-native land vertebrates. In: Stone CP, Stone DB, eds. *Conservation Biology in Hawaii.* Honolulu, Hawaii: University of Hawaii Press, 1988, p. 280.
24. **Wikramanayake ED, Dinerstein E, Loucks CJ.** *Terrestrial Ecoregions of the Indo-Pacific. A Conservation Assessment.* Illustrated edn. Island Press, 2001, p. 643.
25. **MacArthur RH, Wilson EO.** *The Theory of Island Biogeography.* Princetown Landmarks in Biology. Princeton: Princeton University Press, 2001, p. 203.
26. **Lorvelec O, et al.** The non-flying terrestrial mammals of the French West Indies, and the recent introduction of a squirrel [in French]. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 2007; **62**: 295–314.
27. **Courchamp F, Chapuis JL, Pascal M.** Mammals invaders on islands: impact, control and control impact. *Biological Reviews* 2003; **78**: 347–383.
28. **Howald G, et al.** Invasive rodent eradication on islands. *Conservation Biology* 2007; **21**: 1258–1268.
29. **Pascal M, et al.** Vertebrate species in New Caledonia: invasions and extinctions. In: Beauvais M-L, Coléno A, Jourdan A, eds. *Invasive Species in New Caledonian Archipelago* [in French]. IRD Éditions, Paris, 2006, pp. 111–162.
30. **O'Connell M.** Marmosa robinsoni. *Mammalian Species* 1983; **203**: 1–6.
31. **Proceedings of the fourth meeting of Caribbean foresters.** In: *Wildlife Management in the Caribbean Islands.* Institute of Tropical Forestry and the Caribbean National Forest, Rio Piedras, Puerto Rico, 1989.
32. **Germano JM, et al.** Herpetofaunal communities in Grenada: a comparison of altered sites, with an annotated checklist of Grenadian amphibians and reptiles. *Caribbean Journal of Science* 2003; **39**: 68–76.
33. **ICZN (International Commission on Zoological Nomenclature).** Opinion 2027 (Case 3010). Usage of 17 specific names based on wild species which are predated by or contemporary with those based on domestic animals (Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): conserved. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 2003; **60**: 81–84.
34. **World Health Organization.** *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.* Malta: World Health Organization, 2003, p. 122.
35. **Kazami A, et al.** Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. *Journal of Veterinary and Medical Science* 2002; **64**: 735–737.
36. **Dassanayake D, et al.** Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infectious Diseases* 2009; **9**: 48.
37. **Lilenbaum W, et al.** Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* (in press).

38. **Tucunduva de Faria M, et al.** Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 2008; **108**: 1–5.
39. **Kuriakose M, et al.** Leptospirosis in a midland rural area of Kerala state. *Indian Journal of Medical Research* 2008; **128**: 307–312.
40. **Wuthiekanun V, et al.** Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; **45**: 1363–1365.
41. **Taylor KD, Turner LH, Everard JD.** Leptospire in *Rattus* spp. on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991; **94**: 102–103.
42. **Levett PN, et al.** Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. *West Indian Medical Journal* 1998; **47**: 15–17.
43. **Baulu J, Everard CO, Everard JD.** Leptospire in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops Sabaeus*) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 1987; **23**: 60–66.
44. **Everard COR, et al.** Leptospire in the marine toad (*Bufo marinus*) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 1988; **24**: 334–338.
45. **Gravekamp C, et al.** Leptospire isolated from toads and frogs on the island of Barbados. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1991; **275**: 403–411.
46. **Everard CO, et al.** Leptospire in the whistling frog (*Eleutherodactylus johnstonei*) on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990; **93**: 140–145.
47. **Weekes CC, Everard COR, Levett PN.** Sero-epidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Veterinary Microbiology* 1997; **57**: 215–222.
48. **Jones CJ, et al.** Bim, a new serovar of *Leptospira interrogans* isolated from a dog in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; **19**: 946.
49. **Levett PN, Whittington CU, Camus E.** Serological survey of leptospirosis in livestock animals in the lesser Antilles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; **791**: 369–377.
50. **André-Fontaine G.** Animal leptospirosis [in French]. *Bulletin Épidémiologique de l'Afssa* 2004; **12**: 1–3.
51. **Michel V.** Study of the role of different wild species and of their environment on the epidemiology of zoonotic leptospirosis [in French] (thesis). Lyon: Université Claude Bernard, 2001, 251 pp.
52. **Michel V, Branger C, André-Fontaine G.** Epidemiology of leptospirosis. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2002; **54**: 7–10.
53. **Tissot D, Mailloux M, Corroller YL.** Serological study on bovine leptospirosis in Guadeloupe. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiiales* 1975; **68**: 420–425.
54. **Levillain A.** *La leptospirose aux Antilles*. CIRE Antilles-Guyane, 2001.
55. **Everard COR, et al.** Serological studies on leptospirosis in livestock and chickens from Grenada and Trinidad. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1985; **79**: 859–864.
56. **Everard CO, et al.** Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad: West Indies. *International Journal of Zoonoses* 1979; **6**: 33–40.
57. **Adesiyun AA, et al.** Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. *Journal of Veterinary Medicine B* 2006; **53**: 91–99.
58. **Adesiyun AA, et al.** Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Veterinarski Arhiv* 2009; **79**: 77–86.
59. **Brethes B, et al.** Epidemiological study of leptospirosis in New Caledonia [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1988; **81**: 189–197.
60. **Brethes B, et al.** Leptospirosis and environment. Study in the two most important focuses of New Caledonia [in French]. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 1988; **36**: 436–442.
61. **Centre National de Référence des Leptospire.** Rapport annuel d'activité 1999. Paris: Institut Pasteur.
62. **Thevenon JG, et al.** Epidemiological study of bovine leptospirosis in New-Caledonia [in French]. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1990; **166**: 903–909.
63. **Domenech J, Lechapt M.** Animal leptospirosis: prevalence in the South Pacific [in French]. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie* 1983; **2**: 1–8.
64. **Centre National de Référence des Leptospire.** Rapport annuel d'activité 1996. Paris: Institut Pasteur.
65. **Centre National de Référence des Leptospire.** Rapport annuel d'activité 1998. Paris: Institut Pasteur.
66. **Wallace GD, Gross B, Lee R.** Leptospirosis survey of small mammals on the island of Hawaii. In: 10th Pacific Scientific Congress, Honolulu, 1961.
67. **Minette HP.** Leptospirosis in rodents and mongooses on the Island of Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1964; **13**: 826–832.
68. **Shimizu MM.** Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, island of Hawaii. *International Journal of Zoonoses* 1984; **11**: 173–188.
69. **Aguirre AA, et al.** Infectious disease monitoring of the endangered hawaiian monk seal. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **43**: 229–241.
70. **Katz AR, Manea SJ, Sasaki DM.** Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health* 1991; **81**: 1310–1312.
71. **Raust P.** Animal leptospirosis in French Polynesia. Preliminary serological investigations [in French]. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire de Nouvelle-Calédonie* 1988; **12**: 15–19.
72. **Centre National de Référence des Leptospire.** Rapport annuel d'activité 1997. Paris: Institut Pasteur.
73. **Sigaud M, et al.** Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*): natural maintenance host of leptospire? [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques* 2009; **102**: 19–20.
74. **Moutou F.** Survey on the Murinae fauna in La Reunion French department. Rapport DDASS, 1980.
75. **Mollaret HH, Mailloux M, Debarbat F.** Leptospire in the island of Reunion. III. Epidemiological study [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 744–749.

76. **Debarbat F, Mollaret HH, Mailloux M.** Leptospiroses in the island of Reunion. II. Animal leptospiroses [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 736–743.
77. **Gares H.** Study of infertility risk factors in Reunion island dairy herds [in French] (thesis). Toulouse: Université Paul Sabatier, 2003, 103 pp.
78. **Charton A.** Contribution to the epidemiological study of leptospirosis. The case of Mayotte [in French] (thesis). Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 1992, 101 pp.
79. **Matisoo-Smith E, et al.** Patterns of prehistoric human mobility in Polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; **95**: 15145–15150.
80. **Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB.** Leptospirosis in free-living species in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 489–496.
81. **Klaasen HLBM, et al.** Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology* 2003; **95**: 121–132.
82. **Athanazio DA, et al.** *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira* interrogans. *Acta Tropica* 2008; **105**: 176–180.
83. **Matthias MA, et al.** Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **73**: 964–974.
84. **Bunnell JE, et al.** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **63**: 255–258.
85. **Lilenbaum W, et al.** Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science* 2002; **73**: 319–321.
86. **Milner AR, et al.** The prevalence of anti-leptospiral agglutinins in sera of wildlife in southeastern Australia. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 197–202.
87. **Zwijnenberg RJG, et al.** Cross-sectional study of canine leptospirosis in animal shelter populations in mainland Australia. *Australian Veterinary Journal* 2008; **86**: 317–323.
88. **Everard CO, et al.** Pathogenic leptospira isolates from the Caribbean Islands of Trinidad, Grenada and St. Vincent. *International Journal of Zoonoses* 1980; **7**: 90–100.
89. **Collares-Pereira M, et al.** First epidemiological data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *European Journal of Epidemiology* 1997; **13**: 435–441.
90. **Martiny JBH, et al.** Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 2006; **4**: 102–112.
91. **Higa HH, Fujinaka IT.** Prevalence of rodent and monogoose leptospirosis on the island of Oahu. *Public Health Reports* 1976; **91**: 171–177.
92. **Boqvist S, et al.** *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Veterinary Microbiology* 2003; **93**: 361–368.
93. **Yanagihara Y, et al.** Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2007; **30**: 399–413.
94. **Tassinari WS, et al.** Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health* 2008; **13**: 503–512.
95. **Ward MP.** Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Preventive Veterinary Medicine* 2002; **56**: 203–213.
96. **Hermann Storck C, et al.** Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiology and Infection* 2008; **136**: 1407–1415.
97. **Goarant C, et al.** Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Tropical Medicine and International Health* 2009; **14**: 1–4.



**CHAPITRE V : CONTEXTES GEOGRAPHIQUES,
MATERIELS ET METHODES**



1. L'île de La Réunion

1.1. Géographie et climat

Émergée il y a 3 millions d'années, La Réunion est une île volcanique et montagneuse située dans l'Océan Indien, 800 kilomètres à l'Est de Madagascar, par 55°30' de longitude est, et 21°05' de latitude sud (**Figure 11**). Avec les îles de Maurice et Rodrigues, La Réunion fait partie de l'archipel des Mascareignes ; elle possède une superficie de 2510 km² et une forme générale ovoïde (petit axe 45 km, grand axe 72 km) [409].

L'île est constituée de deux massifs accolés :

- Le Piton de la Fournaise, volcan toujours en activité, qui occupe le tiers sud de l'île et culmine à 2631 mètres ;
- Le Piton des Neiges (3069 mètres), massif plus ancien, au centre de l'île et dominant trois cirques aux parois abruptes : Cilaos au sud, Mafate au nord-ouest et Salazie au nord-est.

Les rivières ont largement entaillé les pentes en creusant de profonds sillons perpendiculaires à la côte. Les trois principales sont la Rivière des Galets, le Bras de Cilaos, la Rivière du Mât, exutoires respectifs des cirques de Mafate, de Cilaos et de Salazie (**Figure 12**).

L'île présente une géographie physique extrêmement contrastée, des points de vue géologique, climatique, orographique, végétal et pédologique [409].

Les quatre microrégions partagent des caractéristiques propres à l'île (croissance démographique et économique rapides, chômage et précarité) mais la géographie et l'histoire les ont modelées différemment.

La microrégion Sud est la plus vaste et la plus peuplée : elle regroupe 36% de la population totale, 38% du territoire et 10 communes.

L'Ouest couvre 21% du territoire, 26% de la population et regroupe 5 communes.

L'Est dispose d'un vaste territoire (30% de l'île, 6 communes) pour une population moins nombreuse (15%).

Le Nord, sur un espace confiné (11%), regroupe une population nombreuse (24%), sur 3 communes.

Entre 1999 et 2006, le solde migratoire apparent est positif dans l'Est et le Sud ; il est négatif dans le Nord et il devient pour la première fois négatif à l'Ouest [409].

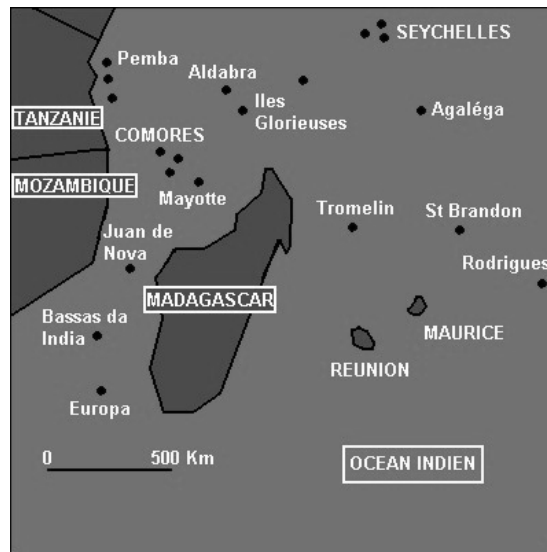


Figure 11 : La Réunion et Mayotte dans le contexte régional Océan Indien.

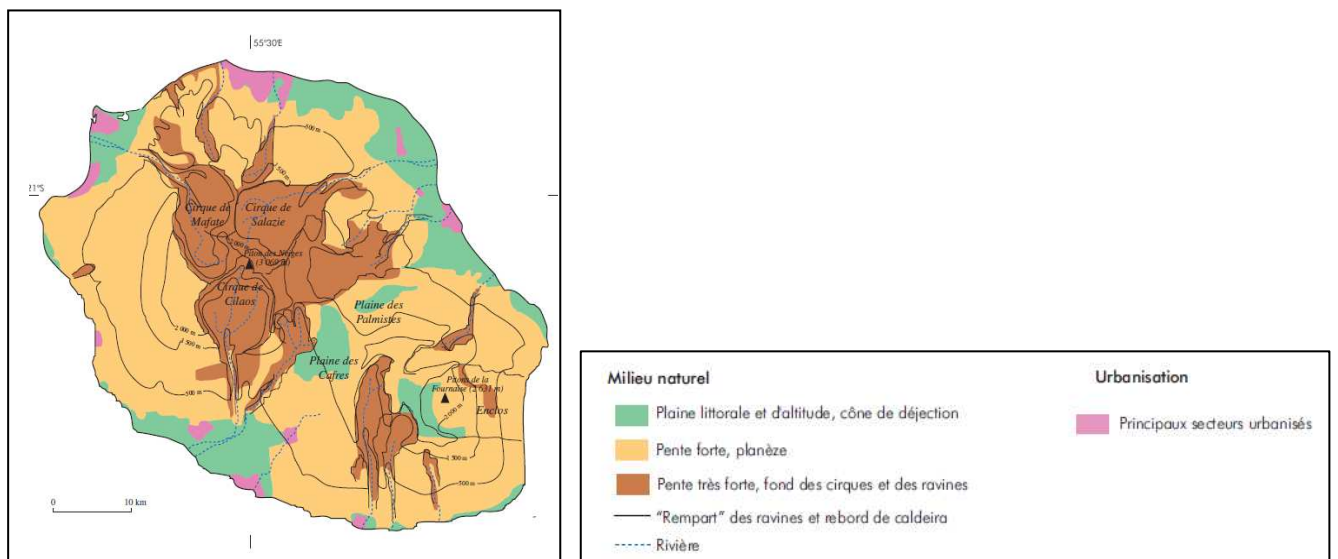


Figure 12 : Géographie de La Réunion.

(Carte réalisée par Rémy, B., Kaufmant, A., Laboratoire de cartographie, Université de La Réunion, d'après Benjamin, D. Atlas de France, "Les Outre-mers", 1998, page 104).

Le climat de La Réunion est tropical humide, mais il se singularise surtout par de grandes variabilités liées à la géographie et au relief de l'île. Il existe deux saisons marquées à La Réunion :

- La saison "des pluies", entre janvier et mars, les températures sont élevées et l'humidité est importante. C'est la période où se forme la plupart des dépressions tropicales.
- La saison "sèche", plus longue, qui va de mai à novembre [410].

Avril et décembre sont des mois de transition.

Le gradient thermique moyen est de 0,65°C pour 100 mètres de dénivellation (**Tableau 6**).

La pluviométrie moyenne annuelle montre une grande dissymétrie entre l'Est et l'Ouest de La Réunion (**Figure 13**). A l'ouest, les précipitations sont peu abondantes, alors que, même en saison sèche, les précipitations restent importantes sur l'Est. Les hauts reliefs de l'île, massifs du Piton des Neiges et du Piton de la Fournaise, sont la cause de cette dissymétrie Est/Ouest. Les précipitations tendent à se concentrer sur les régions directement exposées à l'humidité océane apportée par les alizés de secteur est, on parle de région "au vent". A l'inverse, les régions "sous le vent" (à l'ouest), qui bénéficient de l'abri du relief, sont beaucoup plus sèches et les régimes de brise y sont prédominants.

Tableau 6 : Températures en fonction de l'altitude à La Réunion (d'après [411]).

	Moyennes annuelles	Moyenne des maxima	Moyenne des minima
0 - 100 m	23 à 26°C	27 à 29,5°C	17 à 21°C
100 - 500 m	20,5 à 23°C	24,5 à 27,5°C	15 à 19°C
500 - 1000 m	16 à 21°C	20,5 à 26°C	11 à 16°C
1000 - 1500 m	14 à 17°C	19 à 21°C	9,5 à 13,5°C
1500 - 2000 m	12 à 17°C	17 à 19°C	7 à 10°C
> 2000 m	Moins de 12°C	Moins de 17°C	Moins de 7°C

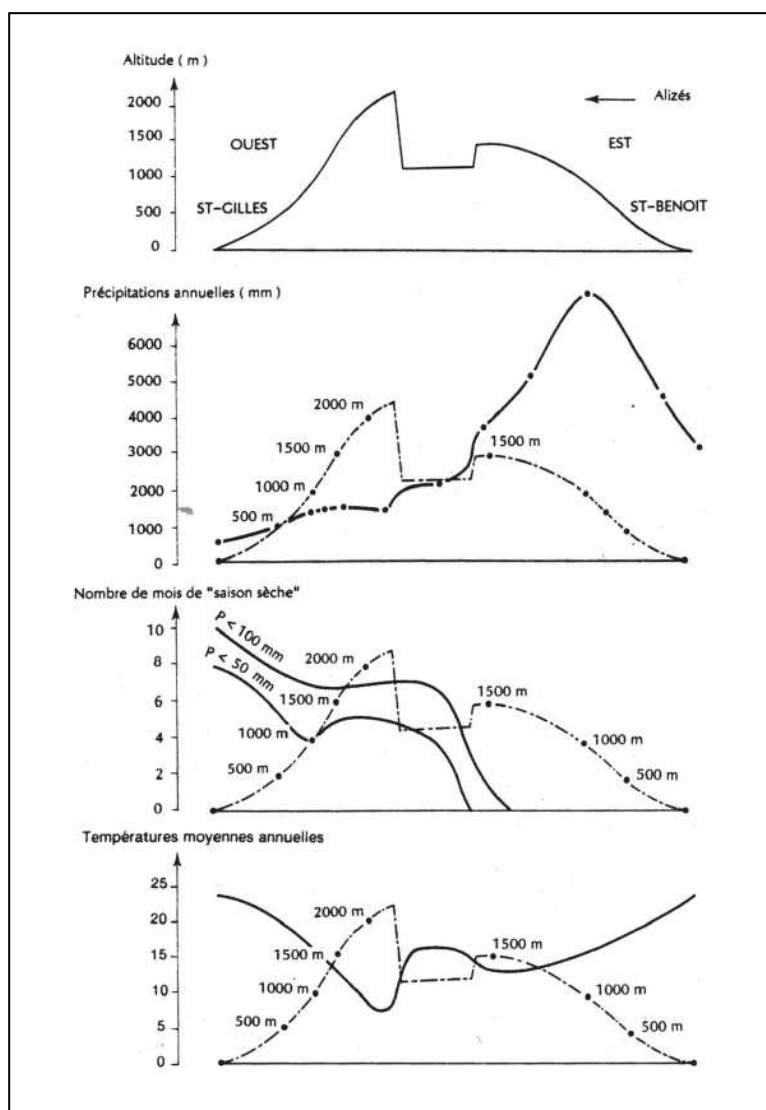


Figure 13 : Altitude – Climat : coupe schématique de l'île (Saint Gilles - Saint Benoît) [411].

1.2. La leptospirose humaine à La Réunion

L'incidence de la leptospirose à La Réunion était de 8,69 cas pour 100 000 habitants en 2009 [412]. Le sérotype prédominant identifié dans les cas humains est *Icterohaemorrhagiae* [106, 412-414]. D'autres sérotypes sont identifiés chez l'Homme lors du diagnostic sérologique : *Canicola*, *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi*, *Hebdomadis*, *Cynopteri*, *Ballum*, *Wolfii*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Panama* [412].

L'incidence de la maladie à La Réunion montre une saisonnalité marquée, fortement corrélée à la saison des pluies (voir **Article 1** présenté dans le **Chapitre II, Partie 3.1**). Il existe une inégalité dans la répartition des cas par commune, les communes les plus touchées étant celles situées à l'est de l'île, qui connaissent la plus forte pluviométrie [413-415].

Les années 1990 ont vu le développement du secteur tertiaire qui représente aujourd'hui la première catégorie socio-professionnelle qui s'est stabilisée autour de 20% de la population. Avec 14,6%, les ouvriers forment le deuxième groupe d'actifs, alors que les professions agricoles ont vu leur poids fortement diminuer depuis 1990, ces dernières ne représentant plus que 1% de la population de l'île, tout comme en France métropolitaine [409]. Ainsi, parallèlement à la diminution du nombre de travailleurs du secteur primaire et à l'augmentation des employés du tertiaire, le nombre de personnes exposées professionnellement à la leptospirose diminue à La Réunion, ce qui peut, en partie, expliquer la diminution de séroprévalence, passée de 1,1% en 1987 [202] à 0,6% en 2006 (voir **Article 3**).

Article 3 : Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, Michault A. 2011. Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(6): 1097-1099.

Short Report: Seroprevalence of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) Assessed by Microscopic Agglutination Test on Paper Disc-Absorbed Whole Blood

Amélie Desvars, Jimmy Gigan, Géraldine Hoarau, Patrick Gérardin, François Favier, and Alain Michault*

Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMRCMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte Clotilde, La Réunion, France;
Laboratoire de Bactériologie—Parasitologie—Virologie—Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France; Centre d'Investigation Clinique—Epidémiologie Clinique (CIC-EC) de La Réunion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/CHR/Université de La Réunion/Union Régionale des Médecins Libéraux de La Réunion (URMLR), GHSR, CHR, Saint Pierre, La Réunion, France

Abstract. In the last decade, leptospirosis has emerged as a globally important infectious disease. Humans most commonly become infected through occupational, recreational, or domestic contact with the urine of carrier animals, either directly or through contaminated water or soil. The disease occurs in urban areas of industrialized and developing countries as well as rural regions worldwide. We present a retrospective study conducted in 2006 on 2,269 randomly selected Reunion Island inhabitants. Blood sampling was performed on individual blotting papers, and microscopic agglutination test (MAT) was conducted on paper disc-absorbed (PDA) blood. We showed that seroprevalence of leptospirosis was $0.66\% \pm 0.34$ in the global population of Reunion Island, which is 1.78 lower than the seroprevalence estimated 20 years before. The serological method is described, and the results discussion focuses on methodology and socio-economic factors.

Leptospirosis is a potentially life-threatening zoonosis with a wide geographic distribution occurring in many mammalian species, including humans. The disease is caused by pathogenic serovars of *Leptospira* spp., a spirochete bacteria. The pathogenesis is systemic and associated with fever and renal, hepatic, pulmonary, and reproductive dysfunctions. The clinical spectrum is broad and not specific, whereas the majority of cases are probably unapparent.¹ Diagnosis is routinely based on the microscopic agglutination test (MAT), which is actually recognized to be serogroup-specific. Reunion Island is a French department located in the Indian Ocean, where the incidence of leptospirosis is high, with 8.69 cases per 100,000 inhabitant per year in 2009.² Nevertheless, because of the great number of paucisymptomatic forms, reported cases underestimate the real incidence of leptospirosis. In 1987, a large serosurvey based on a large sample of 3,338 Reunion Islanders estimated a community seroprevalence of 1.18% at the seropositivity cutoff of 1/100.³ In the present study, using the blotting papers collected on the sample of the population-based SEROCHIK survey (a previous serosurvey aimed at assessing the post-epidemic attack rate of Chikungunya fever in 2006),⁴ we report a simple and original method to estimate the magnitude of seroprevalence of human leptospirosis in 2006 in a large random sample of 2,269 individuals. We compare our results for 2006 with the seroprevalence rate found in 1987^{3,5} and discuss risk factors that can influence the prevalence of leptospirosis in Reunion Island.

The 2,442 participants of the SEROCHIK survey belonged to a random sample consisting of a two-stage sampling. At the first-stage sampling, households were randomly selected by the Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) over 23 townships, covering the entire territory of the island (except the Mafate circus). At the second-stage sampling, one participant per household was selected accord-

ing to the Kish method.⁴ For each individual, blood was taken with a finger stick on individual blotting papers (Whatman 903 ProteinSaver Card, Whatman, Dassel, Germany). The paper was air-dried before storing at -20°C until analysis.

To optimize the serological method using MAT on paper disc-absorbed (PDA) blood, we tested different technical parameters on 22 seropositive and 30 seronegative patients, who were previously diagnosed (from 2002 to 2005) by classical MAT, conducted on fluid serum at our laboratory. Among the seropositive patients, 11 were seropositive at titer 1/200 and 11 were seropositive at titer 1/6,400 with classical MAT. We used the classical MAT, which is the serological method of reference, to evaluate the MAT on PDA blood, and we compared antibody titers obtained for the 52 previously diagnosed patients with both methods. Whole blood from each positive patient was first absorbed within the specific circular area on a blotting paper. Then, the remaining blood was centrifuged, and the serum used for a second analysis with classical MAT. A circular area was cut in the PDA blood, and the blood was eluted by soaking overnight at 4°C in a 2-mL microtube with Sorensen buffer at the dilution 1:25 or with a 50/50 mix of Sorensen buffer and phosphate buffer saline (PBS). Two circular surfaces ($S = r^2\pi$) of the PDA blood were tested: $S_1 = 1.5^2\pi$ and $S_2 = 2.5^2\pi$ mm². The volume of elution buffer was adjusted depending on the surface of the PDA blood considered: 288 μL for S_1 and 800 μL for S_2 . Then, elution of the PDA blood samples was completed by either leaving the PDA blood in elution buffer one night at 4°C or leaving it 2 hours at room temperature with slow shaking or grinding for 2 minutes at 30 Hz in a vibratory shaker (Mixer mill MM 301, Retsch GmbH, Haan, Germany). Then, samples were centrifuged for 15 minutes at 10,000 rpm (25°C). The supernatant was considered equivalent to a 1:100 dilution of serum and tested in the same way as fresh serum by classical MAT.^{6,7}

To estimate the seroprevalence of leptospirosis in the global population, the MAT was conducted on 2,269 PDA blood samples collected in the population described above. The antigens used were live cultures of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni strain isolated in Reunion Island, *L. interrogans* serogroup Pyrogenes serovar

*Address correspondence to Alain Michault, Laboratoire de Bactériologie—Parasitologie—Virologie—Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), BP350, Avenue Mitterrand Saint Pierre cedex 97448, La Réunion, France. E-mail: alain.michault@chr-reunion.fr

TABLE 1
Organisms used as capture antigens in the MAT represent four different serogroups

Genus	Species	Serogroup	Serovar	Strain
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Strain isolated in Reunion Island
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>Leptospira</i>	<i>borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>Leptospira</i>	<i>biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc I

Pyrogenes strain Salinem, and *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Sejroe strain M84 (Table 1). We chose strains representative of three serogroups (Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, and Sejroe), because they are the most frequently diagnosed serogroups in clinical cases in Reunion Island; also, one locally isolated strain was chosen, because antibody titers to local isolates are often higher than titers to laboratory stock strains of serovars within the same serogroup.¹ The non-pathogenic strain *L. biflexa* serogroup Semarang serovar Patoc strain Patoc I (Table 1) was also included in the panel, because it cross-reacts with many pathogenic serogroups,⁸ allowing the detection of antibodies against not tested serogroups.

We found that using Sorensen buffer 1:25 without PBS was better on the antibody titers for both serological methods. Leaving the PDA blood sample one night at 4°C was not efficient to elute the antibodies, whereas grinding the sample or leaving it 2 hours at room temperature with slow shaking was equivalent. Thus, we chose the grinding method, because it was saved. We observed that, for the same positive patient, results with the circular surfaces S1 and S2 were similar. Thus, we chose to use the circular surface S1 ($r = 1.5$ mm), because it used a smaller surface of PDA blood.

All negative patients tested with the classical MAT method on fresh serum were negative with the method on PDA blood. Antibody titers against leptospirosis obtained with the MAT conducted on PDA blood for the 11 patients positive at titer 1/6,400 were one- to two-fold dilutions lower in titers compared with positivity obtained with MAT on fresh serum. In contrast, antibody titers for the 11 patients positive at titer 1/200 were equal or one-fold dilution lower (Table 2).

Because cross-reactions between serogroups are common as well as paradoxical reactions, in which the initial immune response is directed to a heterologous serovar or serogroup, MAT is of little value for the identification of the infecting serovar in individual cases of leptospirosis.⁹ In consequence,

our study presents only the seroprevalence of the disease and not the potential infecting serovars.

The seroprevalence of leptospirosis in the global population of Reunion Islanders in 2006, evaluated on a sample of 2,269 persons, was 0.66% \pm 0.34 (95% confidence interval) at the seropositivity cutoff of 1/100. This seroprevalence was 1.78 times lower than that reported by Duval and others⁵ in 1987. Moreover, the incidence of the disease in 2006 was 7.52 cases per 100,000 inhabitants per year² (i.e., 2.05 times lower than in 1987).⁵

During this 20-year period and still now, Icterohaemorrhagiae remains the serogroup involved in the majority of the clinical cases in Reunion Island.^{2,3} We limited the number of tested serogroups to four; thus, if non-included serogroups with titers close to the threshold of positivity are circulating in the population of Reunion Island, they were not detected by our MAT. Nevertheless, major serogroups found in symptomatic patients were similar in 1987 and 2006 (Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, and Sejroe)^{3,10}; in consequence, if minor serogroups were circulating in 2006, they would not affect the global seroprevalence of leptospirosis in the population.

Several socioeconomic factors may explain the decrease in the seroprevalence of leptospirosis during 19 years in Reunion Island. The first factor is the distribution of the population with regard to climatic factors. Indeed, rainfall is very abundant in the east (> 2,000 mm/year), whereas the north and south count less than 2,000 mm/year; also, the western coastal region counts less than 100 mm/year. Rainfall favors indirect contamination.¹ Between 1987 and 2006, the population of the west side of Reunion Island increased from 1.4% to 4%,¹¹ whereas there was a global decrease in the population of the east side. In consequence, the relative percentage of the population exposed to the climatic risk factor decreased between 1987 and 2006.

Second, changes in the occupational activities of the population may have influenced the seroprevalence of the disease. Working in fields or outdoors is a well-known risk factor of contamination for leptospirosis,^{3,12} whereas office workers are less exposed. In 1987, the service sector used less than 75% of working people against 85% in 2006.¹¹ Moreover, in 2006, Reunion Island counted only 7.7% of farm workers versus 14% in 1987.¹¹ In consequence, in two decades, the number of people daily exposed to the environmental reservoir of the disease decreased greatly.

Third, housing in Reunion Island has changed dramatically between 1987 and 2006, with an increase in the number of families living in apartments: 17.9% in 1987 versus 28.4% in 2006.¹¹ Gardening and presence of rodents in the living environment are risk factors for acquiring clinical leptospirosis,¹³ whereas living in an apartment is a protecting factor of contamination.¹² Moreover, the improvement of sanitary living conditions in Reunion Island (23.9% of the households with no running water, toilets, or bathroom in 1987 versus 5% in

TABLE 2

Results of the MAT conducted on PDA blood on the 22 positive patients

Serum	Positive patients at dilution 1/6,400 ^a	Positive patients at dilution 1/200 ^a
1	Positive 1/3,200	Positive 1/200
2	Positive 1/1,600	Positive 1/200
3	Positive 1/1,600	Positive 1/200
4	Positive 1/1,600	Positive 1/200
5	Positive 1/3,200	Positive 1/200
6	Positive 1/1,600	Positive 1/200
7	Positive 1/3,200	Positive 1/200
8	Positive 1/1,600	Positive 1/200
9	Positive 1/1,600	Positive 1/200
10	Positive 1/1,600	Positive 1/100
11	Positive 1/1,600	Positive 1/100

^a With classical MAT conducted on fresh serum.

2006)¹¹ as well as recurrent awareness campaigns about the disease among the population may have also participated in the reduction of the incidence of the disease.

In conclusion, we have shown that the PDA whole-blood sample method offers convenience in the collection, holding, and shipping of samples. This method can be very useful for large-scale studies or even for studies in the children population, because the sampling is not invasive and easy to perform. The method can be easily used in developing countries because of its cheapness. Also, conservation of the blood before analysis does not require immediate refrigeration. We have also evidenced that prevalence of leptospirosis has declined in Reunion Island between 1987 and 2006 and that it could be explained by socio-economic factors linked to sanitary improvements and the transition from a rural to urban way of life.

Received July 20, 2011. Accepted for publication August 25, 2011.

Acknowledgments: The authors thank Morgane Chambost and Mathieu Nicole for their contribution to this work and Vincent Michault for his help on the manuscript.

Authors' addresses: Amélie Desvars, Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMRCMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte Clotilde, La Réunion, France and Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mail: amel.desvars@gmail.com. Jimmy Gigan, Géraldine Hoarau, and Alain Michault, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mails: jimmy.gigan@chr-reunion.fr, guynoelhoa rau@gmail.com and alain.michault@chr-reunion.fr. Patrick Gérardin and François Favier, Centre d'Investigation Clinique-Epidémiologie Clinique (CIC-EC) de La Réunion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/CHR/Université de La Réunion/Union Régionale des Médecins Libéraux de La Réunion (URMLR), Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mails: patrick.gerardin@chr-reunion.fr and francois.favier@chr-reunion.fr.

REFERENCES

1. Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
2. Institut Pasteur, 2010. *Rapports d'activité du Centre National de Référence des Leptospirose*. Available at: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000031-010/actualites-rapports>. Accessed December 21, 2010.
3. Duval G, Michault A, Baranton G, Law-Koune JD, Folio G, Bertil G, Guiserix J, 1991. Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island. *Rev Epidemiol Sante Publique* 39: 135–141.
4. Gérardin P, Guernier V, Perrau J, Fianu A, Le Roux K, Grivard P, Michault A, de Lamballerie X, Flahault A, Favier F, 2008. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis* 8: 99.
5. Law-Koune JD, Duval G, Michault A, Baranton G, De Camaret P, Lemahieu JM, Van-der-Linden T, 1989. Human leptospirosis in Reunion Island: epidemiological study during three years (1985–1987). *Bull Soc Pathol Exot* 82: 185–191.
6. Fianu A, Le Roux K, Grivard P, Le Pors AK, Gigan J, Michault A, Gérardin P, Favier F, 2007. Valeur discriminante du test de dépistage du Chikungunya sur buvard. *Bull Soc Pathol Exot* 100: 356–357.
7. Kingscote BF, 1969. Leptospirosis survey in a white-tailed deer herd in Ontario: comparative use of fluid and paper disc-absorbed blood. *J Wildl Dis* 5: 68–72.
8. Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P, 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci.
9. 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.
10. Centre National de Référence des Leptospirose, 2007. *Activity Report 2006*. Paris, France: Institut Pasteur.
11. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques, 2010. *La Revue Économie de La Réunion*. Available at: <http://www.insee.fr/fr>. Accessed January 26, 2011.
12. Sarkar U, Nascimento S, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI, 2002. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 66: 605–610.
13. Bovet P, Yersin C, Mérien F, Davis CE, Pérolat P, 1999. Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol* 28: 583–590.

L'étude conduite au GHSR sur 2269 séro-buvards a permis de montrer une diminution de la séroprévalence de la leptospirose en population générale à La Réunion, sur une période de 20 années. Cette étude a aussi permis de montrer que le nombre de cas déclarés chaque année est très inférieur au nombre réel de personnes contaminées. En effet, nous avons estimé à $800\,000 \times 0,66\%$ soit 5280 le nombre de personnes ayant été infectées par *Leptospira* et présentes sur l'île en 2006. Bien que la durée de vie des anticorps à un taux élevé puisse être de plusieurs années et soit très variable en fonction des individus [416-418], ce chiffre n'est pas compatible avec la moyenne annuelle du nombre de cas déclarés (56 cas en moyenne par an entre 1998 et 2009 [412]).

Ainsi, nous montrons l'importance du nombre de personnes contaminées chaque année à La Réunion et pour lesquelles le diagnostic de leptospirose n'est pas établi. Ces formes bénignes, asymptomatiques, paucisymptomatiques voire grippales, représentent la majorité des cas à La Réunion, les formes graves ne sont que la partie "émergée de l'iceberg".

2. L'île de Mayotte

2.1. Géographie et climat

Située entre l'équateur et le tropique du Capricorne à l'entrée nord du Canal du Mozambique, au niveau du 45^{ème} méridien Est et entre les 12^{ème} et 13^{ème} parallèles Sud, l'île de Mayotte fait partie de l'archipel des Comores. Mayotte est distante de 1500 km de l'île de La Réunion. Elle est située à 400 km de la côte Est de l'Afrique et à 300 km de la côte occidentale de Madagascar (**Figure 11**).

Mayotte est la plus ancienne île de l'archipel comorien (environ 8 millions d'années). Comme les autres îles des Comores, Mayotte est d'origine volcanique. D'une superficie de 374 km², Mayotte comprend deux îles principales, Petite-Terre (11 km²) et Grande-Terre (363 km²), ainsi qu'une trentaine d'îlots épars. Le relief est dominé par des massifs basaltiques tels le mont Bénara dans la partie centrale (660 m) et le mont Choungui dans le Sud (594 m) (**Figure 14**).

Mayotte est un département d'outre-mer depuis 2011. Sa population atteignait 186 452 habitants en 2007 et la densité moyenne sur l'archipel s'élevait à 511 habitants/km² (recensement INSEE du 31 juillet 2011). Cette population est de plus en plus concentrée

autour du pôle urbain de Mamoudzou, chef-lieu de l'île, qui absorbe plus de 50 000 habitants, soit 27% de la population totale.

Mayotte jouit d'un climat de type tropical humide, qui présente deux saisons bien marquées :

- L'été austral, correspondant à la saison des pluies, s'étend d'octobre à mars. Les températures y sont particulièrement élevées, et le taux d'humidité important. Cette saison concentre l'essentiel des précipitations annuelles et c'est aussi la saison où l'île est exposée à des risques cycloniques.
- La saison sèche, ou hiver austral, s'étend d'avril à septembre. L'île est alors soumise au régime des alizés, vents secs venant du sud-est. Les températures et l'humidité sont moins élevées que durant la saison des pluies, et la pluviométrie est faible [419].



Figure 14 : L'île de Mayotte.

2.2. La leptospirose humaine à Mayotte

L'incidence annuelle de la leptospirose à Mayotte entre 1984 et 1989 était de 3,83 cas pour 100 000 habitants par an [420], mais depuis 2007, les méthodes de diagnostic (notamment la culture) ont été développées localement et l'incidence est aujourd'hui estimée à 25 cas pour 100 000 habitants par an [229]. Si les sérogroupes dominants chez l'Homme à

Mayotte étaient traditionnellement, et selon les années, Grippytyphosa, Sejroe et Pyrogenes [412], depuis l'inclusion fin 2007 du sérotype Mini dans le panel d'antigènes utilisé pour le test de microagglutination, ce dernier apparaît comme le plus représenté chez les cas hospitalisés à Mayotte [412]. En 2009, 84 cas de leptospirose ont été diagnostiqués par PCR, parmi lesquels 41 cultures positives ont été obtenues, permettant une meilleure identification des souches circulantes. Les sérotypes principaux étaient Mini (28/41), Pyrogenes (2/41), Pomona (8/41) et Grippytyphosa (1/41) [74] (**Figure 15**).

Le sérotype Icterohaemorrhagiae ne circule pas chez l'Homme à Mayotte [229].

Le sérotype Mini a été isolé la première fois à partir d'un patient en Italie en 1940. D'autres sérotypes ont été ensuite isolés à partir d'humains et d'animaux (opossums, bandicoots⁷, rats-laveurs) et classés dans le sérotype Mini en fonction de leurs déterminants antigéniques. Des anticorps dirigés contre le sérotype Mini (sérotype Sz wajizak) ont aussi été retrouvés chez des rats noirs, des souris, des hérissons (*Hemiechinus auritus* et *Erinaceus europaeus*), des bovins et des chiens en Israël [421], chez des capucins bruns (*Cebus apella*) au Brésil [422] et chez les chiens en Thaïlande [313]. Il se pourrait donc que Mini ait un spectre d'hôte assez large.

Les sérotypes Mini et Hebdomadis présentent des communautés antigéniques [74].

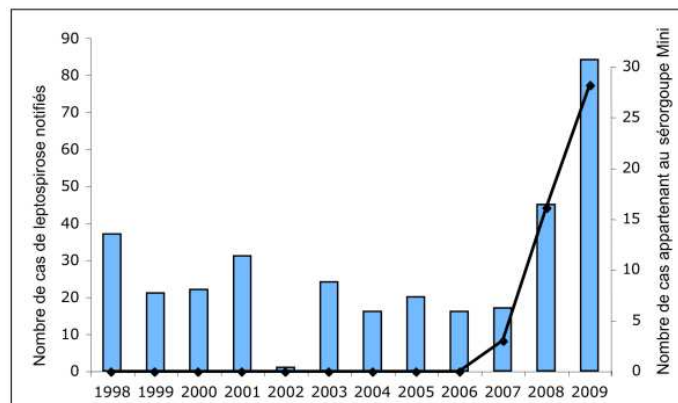


Figure 15 : Distribution des cas du sérotype Mini (ligne continue) par rapport au nombre total de cas de leptospirose à Mayotte (histogramme bleu), entre 1998 et 2009.

Ce graphique illustre l'effort de recherche de la maladie chez les patients depuis 2007 ainsi que le changement dans le panel utilisé pour le MAT, avec l'ajout du sérotype Mini [74].

⁷ Bandicoot : Ordre : Marsupialia ; famille Peramelidae.

En 2011, Bourhy *et al.* [229] ont démontré qu'à Mayotte, les leptospires responsables de cas cliniques chez l'homme appartiennent aux espèces génomiques *L. borgpetersenii* (52,1% des souches décrites), *L. kirschneri* (23,4%), *L. interrogans* (8,5%), et à l'espèce nouvellement découverte, proche de *L. borgpetersenii* (*borgpetersenii*-like), et actuellement considérée comme endémique de Mayotte : *L. borgpetersenii* groupe B (15,9%, **Figure 16** et **Figure 17**).

La circulation d'au moins quatre espèces génomiques, dont une présentant un profil génétique non décrit jusque-là montre que l'épidémiologie de la leptospirose est très spéciale sur cette île et pose la question des réservoirs animaux et de l'origine d'une telle diversité.

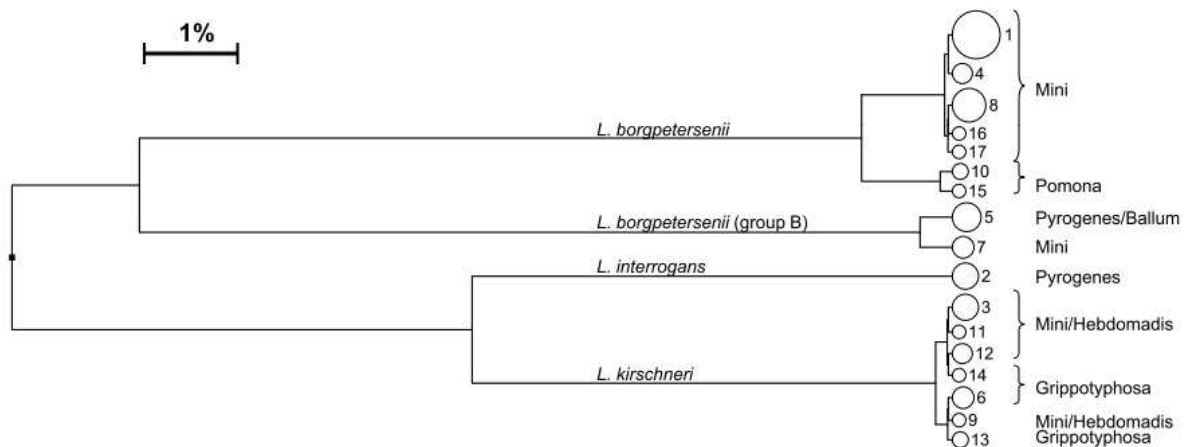


Figure 16 : Arbre phylogénique des isolats de *Leptospira* (n=95) basé sur les séquences de gènes Multiple Locus Sequence Typing (MLST) [229].

La méthode utilisée est la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Les gènes utilisés pour la construction de l'arbre sont *adk*, *lipL32*, *secY*, *rrs2* et *lipL41*. Les espèces, ST (sequence types) et sérogroupes probables sont indiqués. La taille des cercles correspond au nombre de souches pour chaque ST. ST9 correspond à un cas importé depuis les Comores [229].

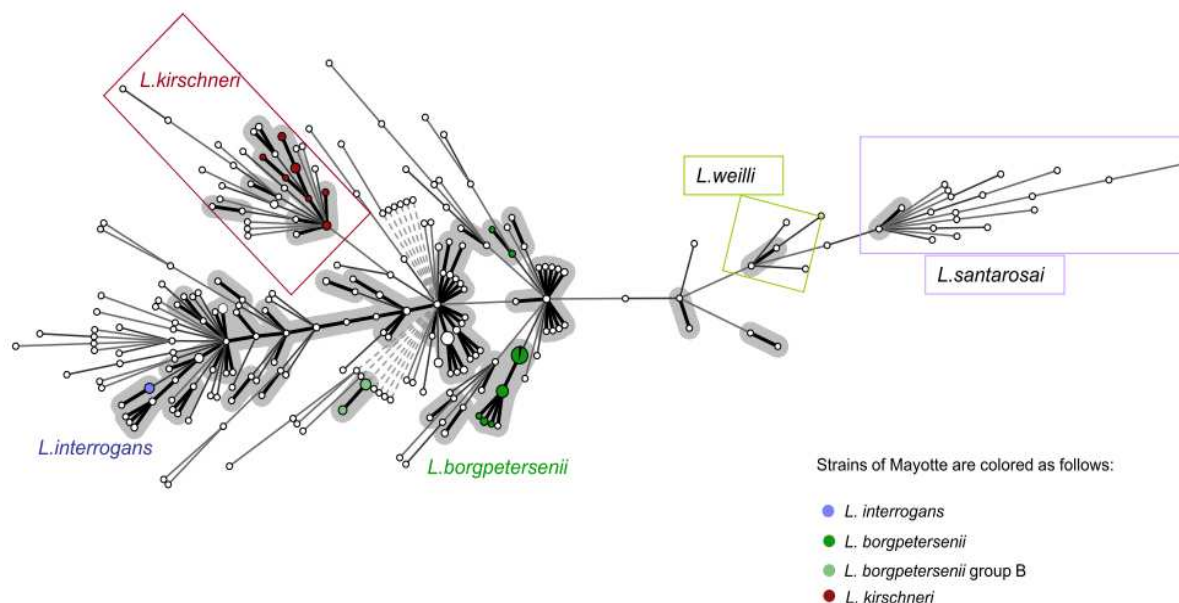


Figure 17 : Arbre couvrant de poids minimal (Minimum Spanning Tree, MST) de 372 souches de *Leptospira*, incluant des souches de Mayotte et des souches précédemment décrites [229].

L'arbre est basé sur les profils alléliques des gènes *adk*, *lipL32*, *rrs2*, *secY*, et *lipL41*. Les cercles non colorés correspondent aux génotypes décrits précédemment par Nalam *et al.* [423], les cercles colorés correspondent aux souches mahoraises. Les traits gras, pleins et discontinus entre les cercles correspondent respectivement à un, deux ou plus mismatch(s) alléliques (les liens avec plus de deux mismatches alléliques ne sont pas fiables) [229].

3. Monographies des mammifères étudiés à La Réunion et à Mayotte

Nous présenterons dans ce chapitre de brèves monographies des espèces mammaliennes étudiées dans le cadre de nos recherches [424]. Les espèces de micromammifères (rats, souris, musaraignes) ont toutes été introduites accidentellement sur les îles par les premiers navigateurs. Les espèces de rente ont été introduites volontairement par l'homme pour le développement local de l'élevage.

Un arbre taxonomique regroupant ces espèces est présenté en **Annexe A**, et l'**Annexe B** présente des photographies de quelques espèces sauvages.

3.1. La Souris grise

Mus musculus Linné, 1758

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Nom vernaculaire anglophone : House mouse

Région d'origine : Sous continent Indien et Asie du Sud-est.

Description : Micromammifères mesurant entre 65 et 95 mm, pesant entre 12 et 30 g.

Eléments d'écologie : Espèce omnivore, commensale de l'Homme, c'est l'un des mammifères les plus largement distribués dans le monde. La Souris se rencontre dans tous les milieux anthropisés où elle peut atteindre une forte densité. La reproduction a lieu toute l'année, une femelle peut donner 10 à 13 portées par an, de 6 à 12 petits chacune.

Introduction à La Réunion : Antérieure à 1750.

Introduction à Mayotte : IX^e-X^e siècle.

3.2. Le Rat noir

Rattus rattus Linné, 1758

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Noms vernaculaires anglophones : Ship rat, Black roof

Région d'origine : Sous-continent Indien.

Description : Petit rongeur mesurant environ 200 mm (sans la queue), pesant 120 à 160 g. La longueur de la queue est supérieure à celle du corps, permettant la distinction avec le Rat surmulot.

Eléments d'écologie : Espèce commensale de l'Homme, omnivore généraliste et opportuniste, le Rat noir occupe tous les habitats, et si les conditions sont adéquates, se reproduit toute l'année, les femelles ayant de 3 à 6 portées par an, chacune pouvant compter jusqu'à 10 jeunes. Animal nocturne, le Rat noir est un excellent grimpeur.

Introduction à La Réunion : Le Rat noir a été introduit depuis l'Europe vers 1670 [425].

Introduction à Mayotte : Le Rat noir a probablement été introduit à Mayotte depuis l'Afrique de l'Est et Madagascar aux VIII-IX^e siècles [425, 426].

3.3. Le Rat surmulot

Rattus norvegicus Berkenhout, 1769

Ordre : Rodentia ; Famille : Muridae

Noms vernaculaires anglophones : Brown rat, Common rat, Norway rat

Région d'origine : Nord de la Chine ou de la Mongolie.

Description : Rongeur mesurant 190 à 265 mm (sans la queue) et pesant 130 à 300 g. La longueur de la queue est inférieure à la longueur du corps.

Eléments d'écologie : Espèce commensale de l'Homme, omnivore généraliste et opportuniste, le Rat surmulot occupe tous les habitats et jusqu'à 3000 m d'altitude à La Réunion. Il semble néanmoins préférer les habitats humides avec une source d'eau à proximité. La reproduction peut avoir lieu toute l'année et une femelle peut avoir 4 à 7 portées par an, de 3 à 12 petits chacune. Animal nocturne, le Rat surmulot est un excellent nageur.

Introduction à La Réunion : 1735.

Introduction à Mayotte : absent de cette île.

3.4. La Musaraigne musquée

Suncus murinus Linné, 1766

Ordre : Soricomorpha ; Famille : Soricidae

Autres noms vernaculaires français : Grande Pachyure, Pachyure musquée, Rat musqué (créole Réunion)

Noms vernaculaires anglophones : Asian house shrew, Asian musk shrew

Région d'origine : Sud de l'Asie.

Description : Micromammifère mesurant jusqu'à 150 mm (sans la queue), pesant, chez les mâles adultes, entre 33 et 147 g. Les femelles sont plus petites. La queue peut atteindre 80 mm. La Musaraigne musquée est caractérisée par un long museau pointu, une grande variabilité de taille, poids et couleur.

Eléments d'écologie : Insectivore, principalement terrestre, la musaraigne fréquente les zones de forêts, agricoles et d'activités humaines auxquelles elle est particulièrement associée. A La Réunion, elle se rencontre dans tous les habitats terrestres, jusqu'à plus de 2500 m d'altitude.

Introduction à La Réunion : 1730.

Introduction à Mayotte : absent de cette île (mais *Suncus madagascariensis* est présente à Mayotte).

3.5. Le Tangué

Tenrec ecaudatus Schreber, 1778

Ordre : Lipotyphla ; Famille : Tenrecidae

Noms vernaculaires anglophones : Common tenrec, Tailless tenrec

Région d'origine : Espèce endémique de Madagascar [427].

Description : Grand insectivore, de 1600 à 2400 g. La longueur de la tête et du corps est comprise en 265 et 390 mm. La forme général de l'animal ressemble à celle de l'opossum nord américain, mais sans la longue queue. Le museau est long et pointu et le corps est couvert d'épines [427].

Eléments d'écologie : Animal insectivore et omnivore dont le régime alimentaire varie selon les saisons et la zone de vie. L'espèce est terrestre, présente dans de nombreux habitats : forêts, zones agricoles, prairies... [427] Introduit comme espèce gibier à La Réunion et à Mayotte. La saison de reproduction est variable en fonction de la latitude : le pic des naissances a lieu en janvier entre les latitudes 12° et 25° Sud à Madagascar, tandis que le pic se situe fin novembre-début décembre en zone plus tropicale comme les Seychelles (4°S). La portée compte généralement 20 à 25 petits, et jusqu'à 32 [427].

Introduction à La Réunion : 1801 [425].

Introduction à Mayotte : IX^e siècle [425].

3.6. Le Chat domestique

Felis catus Linné, 1758

Ordre : Carnivores ; Famille : Felidae

Région d'origine : Le Chat domestique (et ses formes marronnes) semblent avoir pour ancêtre sauvage une sous-espèce du Chat sauvage, *Felis silvestris lybica* Forster, 1780, originaire d'Afrique et du Moyen-Orient. La domestication du Chat sauvage s'est faite au Moyen-Orient avec l'apparition des premiers villages agricoles au niveau du croissant fertile⁸. La toute première trace de domestication connue et datée de 9000 à 9500 ans, a été relevée dans l'île de Chypre.

Description : Félin mesurant environ 50 cm de long (sans la queue), de 20 à 30 cm de haut, et pesant entre 3 et 6 kg.

⁸ Le croissant fertile comprend les territoires des États actuels du Liban, de Chypre, du Koweït, d'Israël, de Palestine (Cisjordanie et Gaza) ainsi que des parties de la Jordanie, de la Syrie, de l'Irak, de l'Iran, de l'Égypte (sur ce point, il ne semble pas y avoir consensus) et le sud-est de la Turquie.

Eléments d'écologie : Le Chat domestique ou haret s'adapte facilement à de nombreux environnements. On le retrouve sur tous les continents (sauf l'Antarctique). A La Réunion, le Chat peut se trouver jusqu'à 3000 m d'altitude. C'est un carnivore dont le régime alimentaire est surtout constitué d'oiseaux, de reptiles et de petits mammifères. La mise-bas a lieu généralement 2 fois par an, avec plusieurs jeunes par portée.

Introduction à La Réunion : Introduit depuis l'Europe pour contrôler les populations de rats, vers 1685 [425].

Introduction à Mayotte : VIII^e siècle.

3.7. Le Chien

Canis familiaris Linné, 1758

Ordre : Carnivores ; Famille : Canidae

Région d'origine : Le Chien domestique et marron descend du Loup gris *Canis lupus* Linné, 1758. Le Loup gris est la première espèce à avoir été domestiquée, tout d'abord au Moyen-Orient, il y a environ 15 000 ans. Le Chien domestique aurait ensuite été répandu en Europe, Asie, puis vers l'Amérique et l'Australie.

Eléments d'écologie : Carnivore à tendance omnivore, le Chien peut être observé dans différents milieux. Le Chien connaît deux cycles annuels de reproduction.

Introduction à La Réunion : Non documentée.

Introduction à Mayotte : Non documentée.

3.8. Le Cerf de Java

Rusa timorensis de Blainville, 1822

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Cervidae

Noms vernaculaires anglophones : Java deer, Rusa deer

Région d'origine : Asie du Sud-est (Indonésie).

Description : Petit cervidé tropical, le dimorphisme sexuel est marqué : les mâles sont plus lourds (80-125 kg) et plus grands (longueur : 130-215 cm, hauteur au garrot : 80-110 cm) que les femelles et portent saisonnièrement des bois.

Eléments d'écologie : Herbivore ruminant opportuniste, son régime alimentaire varie en fonction des ressources disponibles. A La Réunion, le Cerf de Java est une espèce gibier dont

la chasse est autorisée (Arrêté Ministériel du 25 août 2008) pendant environ 5 mois chaque année.

Introduction à La Réunion : Aux alentours de 1760 puis 1954.

Introduction à Mayotte : absent.

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière cervidés comptabilise 3200 biches reproductrices pour 10 éleveurs. L'élevage des cerfs est surtout semi-extensif, bien qu'il existe aussi des engraisseurs en bâtiment pour cette filière (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

3.9. Le Bovin

Bos taurus Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : Les premières traces de domestication de l'Aurochs (*Bos primigenius* Bojanus, 1827) remonteraient à 9000 ans avant JC en Turquie et seraient à l'origine des bovins européens.

Introduction à La Réunion : 1649 [425].

Introduction à Mayotte : IX^e siècle [425].

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière "bovin viande" regroupe 1730 éleveurs, compte 32 000 têtes, dont les races principales sont la Blonde d'Aquitaine et la Limousine. La filière "bovin lait" compte environ 3700 vaches laitières (surtout Prim'Holstein) et 90 éleveurs (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : 17 150 bovins sont dénombrés à Mayotte, qui se répartissent dans 3600 élevages, avec, en moyenne, 4,8 bovins par élevage. Presque trois quarts des bovins sont élevés à l'attache, déplacés au plus proche des ressources fourragères, et 15% des animaux sont valorisés pour la production laitière (données du Recensement Agricole 2010, Site Internet du Ministère de l'Agriculture <http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.10. La Chèvre

Capra hircus Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : Les premières traces de domestication de la Chèvre étagne (*Capra aegagrus*) remonteraient à environ 10 000 ans en Turquie et sur les hauts plateaux d'Iran.

Introduction à La Réunion : 1610 [425].

Introduction à Mayotte : IX^e-XIII^e siècle [425].

Statut de l'élevage à La Réunion : L'élevage caprin conserve encore un caractère familial et traditionnel à La Réunion et la totalité des bêtes n'est pas identifiée ni recensée. Les estimations officielles comptent 23 000 chèvres reproductrices (mais le chiffre est probablement bien supérieur), et 1400 éleveurs déclarés (<http://www.reunion.chambagri.fr>). Il existe une population de chèvres marronnes vivant dans les régions escarpées de l'île, et dont la taille de la population est difficile à estimer.

Statut de l'élevage à Mayotte : Près de 2200 exploitations élèvent des ovins et des caprins. Mais 93% de ces éleveurs se consacrent exclusivement aux chèvres pour un effectif total de plus de 11 500 animaux. Les petits ruminants sont conduits à l'attache pour 51% et parqués pour 46% (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.11. Le Mouton

Ovis aeries Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Bovidae

Région d'origine : La première domestication du Mouflon d'Asie mineure (*Ovis orientalis*) aurait eu lieu dans la région qui s'étend de la Turquie à l'Iran et se situerait autour de 6000 ans avant JC.

Introduction à La Réunion : Non documentée.

Introduction à Mayotte : Non documentée.

Statut de l'élevage à La Réunion : La structuration de la filière ovine est assez récente sur l'île, elle compte actuellement 143 producteurs et 600 brebis reproductrices (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : Avec à peine 1100 animaux au total, le cheptel de moutons mahorais est dix fois moins important que celui des caprins (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/mayotte-665>).

3.12. Le Cochon

Sus scrofa Linné, 1758

Ordre : Artiodactyla ; Famille : Suidae

Région d'origine : Le Cochon est issu de la domestication du sanglier d'Eurasie qui a d'abord eu lieu au Proche-Orient (Turquie), vers 8500-8200 avant JC.

Introduction à La Réunion : 1629 [425].

Introduction à Mayotte : IX^e-XI^{ème} siècle.

Statut de l'élevage à La Réunion : La filière "viande porcine" regroupe 305 éleveurs et compte 7000 truies reproductrices (<http://www.reunion.chambagri.fr>).

Statut de l'élevage à Mayotte : Elevage porcin quasi inexistant.

3.13. Le Petit Molosse de La Réunion

Mormopterus francoismoutoui Goodman, Jansen van Vuuren, Ratrimomanarico, Probst et Bowie, 2008

Ordre : Chiroptera ; Famille : Molossidae

Nom vernaculaire anglophone : Free-tailed bat

Région d'origine : Endémique de La Réunion [428].

Description : Petite chauve-souris dont la longueur totale moyenne est de 93,4 mm (longueur moyenne de la queue 40,2 mm) et la masse moyenne de 6,0 g [428].

Eléments d'écologie : Chauve-souris insectivore, *M. francoismoutoui* vit en colonies pouvant atteindre plusieurs milliers d'individus (*observation personnelle*). Le Petit Molosse de La Réunion niche dans différents milieux, anthropophiles ou sauvages, les gîtes possibles sont nombreux : toitures, derrière un volet, sous les ponts, grottes, fissures de falaises... Les mises-bas (un petit par femelle par an) ont lieu dans la deuxième moitié du mois de décembre [429] au sein de colonies dites "de maternité", composées uniquement de femelles et des jeunes.

Absent à Mayotte.

3.14. La Roussette

Pteropus seychellensis comorensis Nicoll, 1908

Ordre : Chiroptera ; Famille : Pteropodidae

Noms vernaculaires anglophones : Flying-fox, Fruit bat

Noms mahorais : Ndrema, Fanihi

Région d'origine : *P. seychellensis* est retrouvée sur l'ensemble de l'archipel des Comores, à Mayotte, sur l'île de Mafia (Tanzanie) ainsi qu'aux Seychelles (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/18759/0>).

Description : Grande chauve-souris brun foncé à collier roux. Poids moyen des femelles : environ 350 g ; poids moyen des mâles : environ 410 g ; Longueur du corps : 170-175 mm (*Desvars et al., données non publiées*).

Éléments d'écologie : Très commune à Mayotte, à activité nocturne mais aussi diurne, les Roussettes se nourrissent de fruits, nectars, feuilles, fleurs et pollen. Elles jouent un rôle important dans la pollinisation de certaines espèces. Les *Pteropus* ne possèdent pas d'organe d'écholocation [430] et s'orientent à la vue. Elles se rassemblent en dortoir de quelques dizaines d'individus.

Absente à La Réunion.

3.15. Le Lémur brun

Eulemur fulvus É. Geoffroy, 1796

Ordre : Primates ; Famille : Lemuridae

Nom vernaculaire anglophone : Common brown lemur

Noms mahorais : Komba, Ankomba

Région d'origine : Endémique de Madagascar, introduit à Mayotte [431].

Description : Lémurien de couleur marron. Le mâle est en général plus foncé que la femelle. Le poids moyen des mâles adultes est de 2,05 kg, tandis que celui des femelles est de 1,80 kg (*Desvars et al., données non publiées*).

Éléments d'écologie : Les Lémuriens sont surtout arboricoles, mais peuvent descendre à terre (*observation personnelle*). Le régime alimentaire est frugivore et folivore.

Absent à La Réunion.

4. Matériels et Méthodes

4.1. Capture des animaux et prélèvement du matériel biologique

La Réunion : Toutes les captures d'animaux à La Réunion et les prélèvements ont été conduits par A. Desvars⁹ entre le 12 février 2009 et le 20 août 2009. Des captures et autopsies de rats ont en plus été conduites entre le 16 et le 20 mai 2010 (mission Life Plus¹⁰).

Mayotte : Les captures et prélèvements sur les animaux de Mayotte ont été conduits entre le 29 mars et le 13 mai 2007 dans le cadre du projet de recherche ChikAni porté par l'INRA. Les prélèvements ont été effectués par trois vétérinaires¹¹.

4.1.1. Petits mammifères

Les rats, souris et musaraignes ont été capturés en milieu naturel grâce à des pièges-trappes (ratières Manufrance[®] pour les rats ; souricières INRA pour les souris et musaraignes, **Figure 18**). Les tangues ont été capturés par les chasseurs de la Fédération de Chasse de La Réunion lors de la période autorisée de chasse (15/02/2009-15/04/2009).

Les euthanasies des petits mammifères ont été conduites par administration d'une dose létale de pentobarbital (Doléthal[®]) par voie intra-péritonéale. Pour chaque animal, l'autopsie a été faite immédiatement après la mort : prise de sang (intra-cardiaque et sur buvard¹²), prélèvement des deux reins et prélèvement d'urine par voie intra-vésicale avec une seringue à insuline montée.

⁹ Pour les captures de microchiroptères, nous avons bénéficié de l'appui des personnes suivantes : Eric Buffard (Brigade de la Nature Océan Indien/Office Nationale de la Chasse et de la Faune Sauvage), Bérangère Buffard, Thomas Duval, Stéphane Roué (chiroptérologue).

Pour certaines nuits de captures de rongeurs, nous avons bénéficié de l'aide des personnes suivantes : Thomas Hüe, Thomas Duval, Sébastien Boyer, Ben Warren, l'équipe du CIRAD Forêt et Michel Pascal (INRA) dans le cadre du projet Life Plus.

Les captures de tangues ont été réalisées par les chasseurs licenciés de la Fédération de Chasse de La Réunion, qui ont accepté de céder à titre gracieux quelques animaux chassés. La collaboration active de Roselyne Baronce a été essentielle dans la réussite de ces captures.

¹⁰ Ces captures ont été faites dans le cadre de l'"Étude de l'état initial de conservation des zones à restaurer et à reconstituer" du programme européen Life Plus. L'étude a été réalisée par Michel Pascal (INRA), assisté sur le terrain par Eric Riviere, Gérard Lebreton, Emilie Lesseguince, Tiana Madaule (CIRAD) et Amélie Desvars.

¹¹ A. Desvars, T. Duval et C. Punelle.

¹² Le sang prélevé sur buvard n'a pas été analysé au cours de ce travail de thèse.

Pour les souris, musaraignes et quelques rats, il a été parfois impossible d'obtenir une quantité de sang suffisante par prélèvement intra-veineux ou intra-cardiaque. Pour ces animaux, seul un prélèvement de sang total sur buvard (Whatman 903 Protein Saver Card[®], **Figure 19**) a été fait (noté "buvard" dans le **Tableau 12**).



Figure 18 : Poste de piégeage composé d'une souricière INRA et d'un piège Manufrance[®].

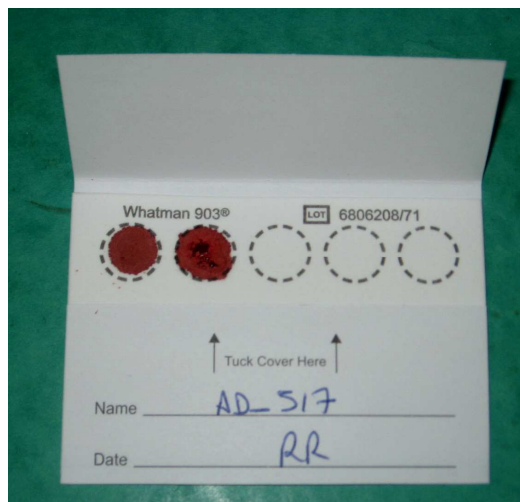


Figure 19 : Prélèvement sanguin sur buvard.

4.1.2. Carnivores errants

A La Réunion, les carnivores errants (chiens et chats) ont été prélevés à la fourrière lors de l'euthanasie faite par le vétérinaire sanitaire (injection intra-veineuse d'une dose létale de pentobarbital, Doléthal[®]).

A Mayotte, les carnivores errants ont été capturés par la Brigade Nature de Mayotte et le lieutenant de louveterie dans le cadre d'une opération de lutte contre l'errance animale, et prélevés sur le terrain. Les chiens domestiques ont été prélevés par les Dr Doméon et Schuler, vétérinaires praticiens à Mayotte.

La prise de sang a été faite soit avant la mort, à la veine jugulaire ou à la veine céphalique (patte antérieure), soit après la mort à la jugulaire ou par voie intra-cardiaque (jeunes animaux). Les animaux ont été autopsiés immédiatement après la mort et des prélèvements de tissus rénaux et d'urine (par voie intra-vésicale) ont été effectués.

L'échantillon de tissu rénal de 1 cm³ environ, sans distinction de la latéralité, a été prélevé au niveau de la jonction cortico-médullaire (les leptospires étant localisées dans le tube contourné proximal, au niveau du cortex [9]).

4.1.3. Animaux de rente

Les animaux de rente (bovins, cerfs, ovins, caprins et porcins) ont été prélevés sur la chaîne d'abattage à l'abattoir de Saint-Pierre de La Réunion.

Sur la chaîne d'abattage des bovins et cerfs, les organes thoraciques (poumons, cœur, foie) d'une part, et les reins d'autre part, passent sur une chaîne "abats" parallèle à celle des carcasses. Les prélèvements de reins ont été conduits sur cette chaîne "abats" et la prise de sang a été faite directement dans le cœur.

Pour les caprins, ovins et porcins, la prise de sang a été faite à la veine jugulaire lors de la saignée. Les échantillons de tissus rénaux ont été prélevés directement sur les carcasses avant la pesée.

Prélèvements de tissus rénaux : voir carnivores domestiques.

4.1.4. Microchiroptères

Les chiroptères (*Mormopterus francoismoutoui*) ont été capturés au filet (filet japonais Bonardi 110 D, nylon, maille 16 mm, longueur 12 mètres, 5 poches) et prélevés dans l'heure suivant la capture.

La veine humérale est piquée à l'aide d'une aiguille et un prélèvement de sang total sur buvard a été fait. Cette espèce étant une espèce protégée, il était primordial que le prélèvement sanguin soit bénin afin de relâcher les individus capturés dans les meilleures conditions¹³, nous avons donc préféré faire des prélèvements sanguins minimum sur ces animaux, en utilisant la méthode sur buvard.

Les prélèvements individuels d'urine ont été conduits immédiatement après la capture, sur l'animal en main : un prélèvement d'urine au niveau du méat urinaire externe a été fait

¹³ Le prélèvement sanguin (en ml), pour être sans danger, ne doit pas dépasser 1% du poids corporel total (en g). Le poids moyen de *Mormopterus francoismoutoui* étant de 5-6 grammes, pour que le prélèvement reste sans danger, il ne doit pas dépasser 60 µl.

avec un écouvillon en rayonne stérile. Des échantillonnages poolés ont aussi été effectués grâce à l'utilisation d'une bâche plastique posée deux heures sous la colonie. Les urines ont ensuite été collectées par écouvillonnage ("pool d'urine").

4.1.5. Roussettes (Mayotte)

Les roussettes (*Pteropus seychellensis*) ont été capturées au filet (filet japonais Bonardi 110 D, nylon, maille 16 ou 19 mm, longueur 12 mètres de long, 2,4 mètres de hauteur, 5 poches ou filet japonais Ecotone 110 D, nylon, maille 45 mm, 12 mètres de long, 3,2 mètres de hauteur, 4 poches), monté sur des perches à 7 mètres de hauteur environ [432].

Les filets étaient posés vers 16h00 (heure correspondant à une augmentation de l'activité des *Pteropus*) sur un site d'alimentation de hauteur compatible avec la hauteur des perches. Une fois démaillés, les animaux piégés étaient mis dans un panier en osier (80 cm de diamètre, 60 cm de hauteur) fabriqué à cet effet, en attendant d'être prélevés et relâchés. Au cours de la phase de captivité, les animaux étaient hydratés (vaporisation d'eau sur le pelage).

Le prélèvement sanguin (environ 1 ml) a été conduit à la veine humérale, après désinfection de la zone de ponction. La compression du point de ponction à l'aide d'un coton a permis l'hémostase.

Les animaux prélevés ont été marqués visuellement (rasage d'une zone de poils en région cervicale) avant d'être relâchés afin d'éviter qu'un animal soit prélevé deux fois.

4.1.6. Lémuriens (Mayotte)

Les captures ont été faites par télé-anesthésie¹⁴ grâce à la collaboration de la Brigade Nature de Mayotte. L'association tilétamine-zolazépam (Zolétil[®]) à la dose moyenne de 8 mg.kg⁻¹ a été utilisée. Les animaux fléchés étaient réceptionnés au filet par deux personnes. Si les animaux étaient trop superficiellement endormis, 0,2 à 0,25 ml (demi-dose) de produit anesthésique a été réinjecté en cours de manipulation.

Avant toute manipulation des animaux, une noisette de gel oculaire (Ocrygel[®]) a été posée sur la cornée afin de la protéger. Le site d'impact de l'aiguille d'anesthésie a été

¹⁴ Fusil modèle JM spécial DAN-INJECT / Seringues hypodermiques 1,5 ml (Vétal).

désinfecté avec de la Vétédine® Solution. Pour chaque lémurien le poids et le sexe ont été relevés. Les prises de sang ont été effectuées dans la veine jugulaire, après rasage et désinfection à l'alcool du site de ponction. Pour chaque individu, la quantité de sang prélevée était de 3 à 3,5 ml.

Au cours de la phase d'anesthésie, les fonctions vitales (fréquence cardiaque, fréquence respiratoire et température corporelle) ont été contrôlées. Les animaux prélevés ont été marqués visuellement (rasage d'une zone circulaire au niveau des poils de la queue). Après la manipulation, les animaux étaient mis en cage de réveil et étaient relâchés après réveil complet et sur le site même de leur capture.

4.1.7. Analyse semi-quantitative des urines par bandelettes urinaires

Lorsque la quantité d'urines prélevées le permettait une analyse des urines par bandelette Siemens Multistix® 8 SG a été réalisée sur les rats, tangués, chiens et chats de La Réunion. L'analyse par bandelette permet de rechercher dans les urines la présence de protéines, de sang, de leucocytes, de nitrites, de glucose, et de corps cétoniques (acide acétique). Elle permet aussi d'évaluer le pH et la densité urinaire.

Densité urinaire

La densité urinaire chez des chiens et chats sains peut varier de 1,001 à 1,065. Plus communément, on accepte qu'un chien et un chat ayant une fonction rénale normale aient une densité urinaire $> 1,030$ et $> 1,035$ respectivement. Il est important d'interpréter la densité urinaire en fonction de l'état d'hydratation de l'animal [433].

Hématurie

Une hématurie concomitante avec un taux de globules rouges sanguin normal peut être indicateur d'une pathologie des voies basses de l'appareil urinaire ou du tractus génital (urètre, prostate, vagin, pénis, vessie) parmi lesquelles les pathologies infectieuses, néoplasiques, idiopathiques ou inflammatoires, ou alors de l'appareil urinaire supérieur (rein, uretères), comme une pyélonéphrite ou une néoplasie [433].

Glycosurie

La plupart des bandelettes ont une limite de sensibilité de 40-80 mg/dl pour le glucose urinaire, mais elles sont semi-quantitatives au-delà de ce niveau, avec un changement de coloration plus intense si la concentration de glucose urinaire augmente. Une glycosurie peut

être causée par une hyperglycémie ou une atteinte du tubule rénal proximal. Le tubule proximal réabsorbe normalement la quasi-totalité du glucose filtré. Lorsque la concentration sanguine et donc la concentration de l'ultrafiltrat excède les capacités du tubule proximal (environ 180 mg/dl chez le chien, 300 mg/dl chez le chat), du glucose apparaît dans les urines [433].

Cétonurie

Les principaux corps cétoniques rencontrés chez les chiens et chats sont les acides acéto-acétique et hydroxybutyrique. Un grand nombre de substances peuvent provoquer des réactions faussement positives à l'analyse urinaire, comme la bilirubine par exemple. Les corps cétoniques sont produits par le métabolisme des acides gras. Un diabète mal contrôlé est la cause la plus fréquente d'apparition de corps cétoniques, mais on peut aussi l'observer chez un animal affamé, ou ayant un régime riche en protéines et pauvres en glucides. Par ailleurs, certains médicaments peuvent aussi induire une cétonurie [433].

Nitrites

Certaines bactéries ont la capacité de transformer les nitrates en nitrites. Néanmoins, la présence ou l'absence de nitrites n'est pas un marqueur fiable d'une bactériurie chez les chiens et chats [433].

Leucocyturie

La bandelette urinaire permet la détection des estérases qui se trouvent dans les granules des granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Chez les chiens, le test est spécifique, mais non sensible (il ne permet pas de détecter tous les cas de pyurie, mais lorsqu'il est positif, il permet d'affirmer la pyurie). La présence de globules blancs peut être indicatrice d'infection ou d'inflammation. A cause du fort taux de faux-positifs chez les chats, ce paramètre n'est pas utilisable dans cette espèce [433].

Protéinurie

La bandelette urinaire donne une estimation semi-quantitative de la protéinurie. L'indicateur de couleur est plus sensible à l'albumine qu'aux autres protéines, et dans la plupart des urines, l'albumine est la principale protéine (sa proportion chez le chien sain varie de 40% à 100% selon les auteurs [434]). Les résultats sont exprimés en "traces" (10 mg/dl), 1+ (30 mg/dl), 2+ (100 mg/dl), 3+ (300 mg/dl), ou 4+ (1000 mg/dl). Des urines très alcalines ou très concentrées peuvent induire des résultats faussement positifs. Une protéinurie peut être d'origine pré-glomérulaire, glomérulaire, ou post-glomérulaire. Les causes pré-glomérulaires

incluent la fièvre, un effort physique important, une congestion veineuse, ou une hyperprotéïnémie (comme par exemple lors d'un myélome multiple). Une protéinurie glomérulaire est causée par une atteinte de la barrière de filtration glomérulaire et est la plus commune et la plus grave cause de protéinurie. Une protéinurie post-glomérulaire peut être causée par une inflammation vésicale ou du tractus génital, ou par une atteinte tubulaire (inflammation des tubules ou défaut de réabsorption du taux normal de protéines filtrées) [433].

4.1.8. Zonage : Est versus Ouest (La Réunion)

Etant admis que la majorité des cas humains de leptospirose apparaissent dans l'est de l'île [75, 88, 202] et que l'incidence de la maladie est corrélée positivement avec la pluviométrie, nous avons voulu tester si cette observation était retrouvée chez les animaux. Pour cela, nous avons considéré :

- Partie ouest de l'île : zone située à l'ouest de l'isohyète 2000 mm de pluie par an (isohyète passant par Vincenzo dans le sud, et passant entre Sainte-Suzanne et Sainte-Marie dans le nord, **Figure 20**) ;
- Partie est de l'île : zone située à l'est de cet isohyète, comptant plus de 2000 mm de pluie par an.

A chaque animal prélevé nous avons attribué une zone en fonction de la commune de capture (animaux sauvages) ou de localisation de son élevage d'origine (animaux de rente).

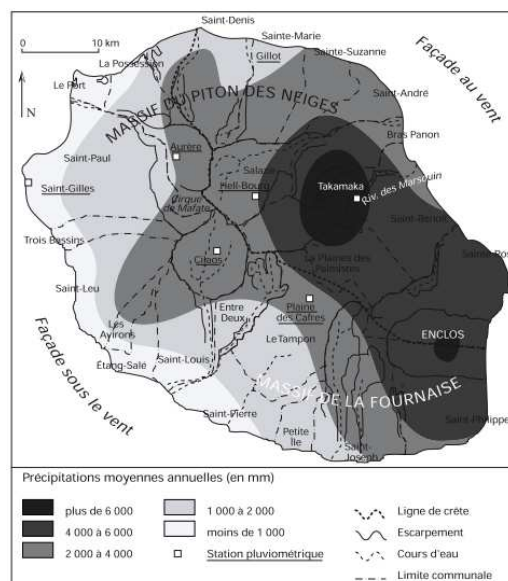


Figure 20 : Île de La Réunion : carte des précipitations moyennes annuelles [435].

4.2. Traitement des échantillons et des données collectées

Une fois collecté, le sang était centrifugé et le sérum était prélevé et congelé à -80°C.

Une fois secs, les buvards ont été conservés à température ambiante.

Les urines ont été neutralisées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) volume à volume, immédiatement après le prélèvement [436] et congelées à -80°C.

Les écouvillons des prélèvements d'urines de chiroptères ont été transportés dans un milieu de transport classique, fabriqué au laboratoire du GHSR, vortexés et congelés à -80°C en l'état en attendant l'extraction.

Les données épidémiologiques collectées sur le terrain ou lors des autopsies ont été relevées sur des fiches de terrain dédiées. Toutes les informations concernant les animaux prélevés et les sites de prélèvement ont été rentrées dans une base de données Access®.

4.3. Aspects réglementaires

4.3.1. La Réunion

4.3.1.1. Espèce protégée

Mormopterus francoismoutoui est une espèce protégée à La Réunion. Les textes juridiques de référence concernant la protection de cette espèce sont les suivants :

- Protection des chauves-souris en Europe : Décret no 96-202 du 11 mars 1996 portant publication de l'accord relatif à la conservation des chauves-souris en Europe (J.O n° 65 du 16 mars 1996).
- Liste des espèces animales protégées à La Réunion : Arrêté du 17 février 1989 fixant des mesures de protection des espèces animales représentées dans le département de La Réunion (J.O du 24/03/1989).

Une autorisation de capture-manipulation et relâcher sur place a été obtenue auprès de la Direction de l'Environnement, DIREN (avec l'accord du Centre National de Protection de la Nature, CNPN, **Annexe C**).

4.3.1.2. Espèce gibier

Le Tangué, *Tenrec ecaudatus*, étant une espèce gibier (cf. Arrêté du 25 août 2008 fixant la liste des espèces de gibier dont la chasse est autorisée sur le territoire du département de La Réunion), le prélèvement d'individus en milieu naturel est réglementé par :

- L'Arrêté préfectoral n°1268 du 30 mai 2008 (fixant la période de chasse du 15 février au 15 avril 2008) ;
- L'Arrêté du 17 mars 2008 modifiant l'arrêté du 7 juillet 2006 portant sur l'introduction dans le milieu naturel de grand gibier ou de lapins et sur le prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée ;
- L'Article 424.11 du Code de l'Environnement notifiant que « *l'introduction dans le milieu naturel de grand gibier et de lapins, et le prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée sont soumis à autorisation préfectorale, dans des conditions et selon des modalités fixées par un arrêté conjoint du ministre chargé de la chasse et du ministre chargé de l'agriculture* ».

Après soumission à l'accord de la Fédération de Chasse de La Réunion, une autorisation de capture et de prélèvements dans le milieu naturel de tangués a été accordée par la Direction de l'Agriculture et la Forêt (DAF) pour le projet de recherche (suite à demande spécifique, **Annexe D**).

4.3.1.3. Autorisation d'expérimenter sur animaux vivants

Les textes juridiques relatifs à l'expérimentation animale sont les suivants :

- Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux (JORF du 27/04/88) ;
- Articles R.214.87 à R.214.130 du Code Rural.

Un dossier de demande d'expérimenter sur animaux vivants a été constitué et présenté auprès de la Direction des Services Vétérinaires qui y a donné une suite favorable.

4.3.2. Mayotte

4.3.2.1. *Espèces protégées*

Le Lémur brun et la Roussette sont des espèces protégées à Mayotte. Ainsi, leur capture a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du Préfet et de la Direction de l'Agriculture et la Forêt (DAF) de Mayotte. L'arrêté préfectoral n°029/DAF/sef/2007 nous a autorisé la capture, les prélèvements et le relâcher sur place de ces deux espèces (**Annexe E**).

Eulemur fulvus est listé en Annexe I de la Convention de Washington (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES), tandis que *Pteropus seychellensis* appartient à l'Annexe II. Des permis d'importation vers La Réunion et d'exportation vers la métropole ont été obtenus pour le transport des échantillons (permis d'importation n°FR0797400112-I et FR0797400111-I délivrés le 16 avril 2007, et permis d'exportation n°FR0797600003-E et FR0797600004-E délivrés le 16 Octobre 2007, pour les lémuriens et les roussettes respectivement, **Annexes F et G**).

4.3.2.2. *Chiens errants*

L'arrêté préfectoral n°005/CAB/2007 portant régulation administrative des populations de chiens errants a permis d'effectuer des prélèvements sur ces animaux (**Annexe H**).

4.4. Sérologie par test de micro-agglutination (MAT)

La présence d'anticorps sériques anti-*Leptospira* a été recherchée par la procédure standard du test d'agglutination microscopique (MAT) [9].

Pour les sérums des animaux de La Réunion, dix-sept souches pathogènes de référence et une souche saprophyte (*L. biflexa*) ont été utilisées comme antigènes (**Tableau 7**).

Pour les sérums des animaux de Mayotte, nous avons utilisé onze souches, dont deux souches de référence et neuf souches isolées chez des patients à l'hôpital de Mamoudzou (**Tableau 8**) [74, 229].

Les souches ont été cultivées en milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) à 29°C, à l'obscurité et utilisées comme antigènes lorsque les cultures étaient âgées de 7-10 jours. Dans un premier temps nous avons fait un screening des sérums à la dilution 1:50. Les sérums montrant une agglutination à cette dilution ont ensuite été dilués au demi et testés pour des dilutions allant de 1:100 à 1:12800. Nous avons considéré un seuil de positivité de 1:100 pour toutes les espèces. Pour les sérums présentant des réactions d'agglutination positives à plus d'un antigène, les titres inférieurs d'au moins deux dilutions à la plus forte dilution positive ont été considérés comme des réactions de coagglutination et exclues des analyses ultérieures.

Tableau 7 : Souches en culture (milieu EMJH) utilisées pour les analyses sérologiques sur les animaux de La Réunion capturées en 2009 et raisons d'inclusion dans le panel.

(Toutes les souches ont été fournies par l'Institut Pasteur de Paris).

No	Espèces	Sérogroupe	Sérovars	Souches de référence	Origine	Source	Raisons du choix
1	<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico	Australie	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [403, 437-439], commun chez les rongeurs en Asie [440]
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	Japon	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [437, 441, 442]
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van tieren	Indonésie	Humain	Fréquent chez les rongeurs en Thaïlande [443], très présent chez les patients en Asie du Sud-Est [444]
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech IV	Hollande	Chien	Associé à la leptospirose du chien dans le monde entier
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3	Espagne	Mulot gris	Souris considérée comme réservoir de ce sérovar [73]
6	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C	Indonésie	Chauve-souris	Chauves-souris considérées comme réservoir de ce sérovar [73]
7	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	URSS	Humain	Le raton-laveur est considéré comme réservoir de ce sérovar [73], retrouvé chez les chiens en Amérique du Nord et Europe [333]
8	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo (hardjobovis)	Sponselee	Hollande	Bovin	Bovins considérés comme réservoir de ce sérovar [73]
9	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	Japon	Humain <i>via</i> un cochon d'Inde	Commun chez les bovins, notamment en Asie [440]
10	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg	Hollande	Humain	Classiquement responsable de la maladie de Weil, commun chez <i>Rattus</i> [440]
11	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K	Panama	Opossum	Représentant de l'espèce <i>L. noguchii</i>
12	<i>L. biflexa</i>	Semarranga	Patoc	Patoc 1	Italie	Eau	Généralement inclus dans le panel pour le MAT (réactions croisées avec les sérogroupe pathogènes)
13	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona	Australie	Humain	Porcs et bovins considérés comme réservoirs de ce sérovar [73]
14	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	Indonésie	Humain	Retrouvé fréquemment chez les animaux [438]
15	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84	Danemark	Souris	Bovins considérés comme réservoir de ce sérovar [73]
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin	URSS	Humain	Porcs considérés comme réservoir de ce sérovar [73], retrouvé aussi chez le chien en Amérique du Sud [441]
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun	France	Humain	Responsable de leptospirose humaine
18	<i>L. kirschneri</i>	Mini	Borincana/Unipertama /Hebdomadis	200801925	Mayotte	Humain	Sérovar circulant à Mayotte chez l'homme [74], représentant du séroroupe Mini.

Tableau 8 : Souches utilisées pour le MAT sur les sérums des animaux de Mayotte capturés en 2007 [229].

Nom de la souche ¹	Espèce	Sérogroupe	Sérovar possible	Sequence type (ST) définie par MLST [229]	Origine
200701203	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Beye/Mini	ST1	Mayotte (Homme)
200901118	<i>L. borgpetersenii</i>	Pomona	Mozdok	ST10	Mayotte (Homme)
201001127	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	?	ST5	Mayotte (Homme)
200901122	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	Kenya	ST5	Mayotte (Homme)
201001125	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	?	ST2	Mayotte (Homme)
200901489	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes/Camlo/Robinsoni	ST2	Mayotte (Homme)
Wijnberg	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	/	Hollande (Homme)
Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	/	Hollande (Chien)
200803703	<i>L. kirschneri</i>	Mini	Borincana/Unipertama/Hebdomadis	ST9	Madagascar (Homme)
201001128	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	?	ST13	Mayotte (Homme)
200801774	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	ST6	Mayotte (Homme)

¹ Toutes les souches utilisées, isolées chez des patients à Mayotte, appartiennent à la collection de l'Institut Pasteur de Paris.

4.5. Extraction

L'extraction d'ADN total à partir des échantillons a été conduite à partir de 20-25 mg de tissu rénal pesé, ou 100 µl d'urines+PBS (parfois moins pour les urines de souris ou musaraignes), avec le kit d'extraction manuel Dneasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les instructions du fabricant.

Afin de déterminer la présence d'inhibiteurs au sein des échantillons biologiques et afin d'identifier les faux négatifs, un contrôle interne (CI) a été construit (voir ci-dessous). Lors de l'étape d'ajout de la protéinase K, nous avons ajouté 10 µl du CI, à la concentration déterminée comme optimale (voir ci-dessous), qui a ensuite été co-extrait avec l'ADN de l'échantillon.

4.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

4.6.1. Définitions

Pour la mise au point de la PCR en temps réel sur le LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) nous avons suivi les recommandations du "*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines*" [445, 446].

Conformément au MIQE, nous utiliserons les termes suivants [446] :

- qPCR : real-time quantitative PCR ou PCR quantitative en temps réel,
- Cq : pour cycle de quantification (aussi appelé Cp pour *crossing point* ou Ct pour *threshold cycle*).

4.6.2. Présentation de LipL32

Découverte il y a un peu plus de 10 ans, LipL32, lipoprotéine de 32 kDa [42], aussi connue sous le nom de haemolysis associated protein 1, Hap1 [39], est la protéine de surface la plus abondante chez les leptospires pathogènes [42, 447] et représente 75% des protéines de la membrane externe [448] (**Figure 21**). Cette lipoprotéine est hautement conservée parmi

les leptospires pathogènes, avec 96,9% d'identité entre les séquences d'ADN, alors qu'il n'existe aucun gène orthologue chez les espèces saprophytes [38, 39, 42, 43, 447].

LipL32 est un des antigènes les plus immunogènes reconnus par le système immunitaire humain lors d'infection naturelle [42, 48, 449] et la protéine LipL32 est fortement impliquée dans la pathogenèse de la néphrite tubulo-interstitielle observée lors d'infection [450]. LipL32 est également considérée comme une protéine candidate pour la mise au point de vaccins contre la leptospirose [451-454].

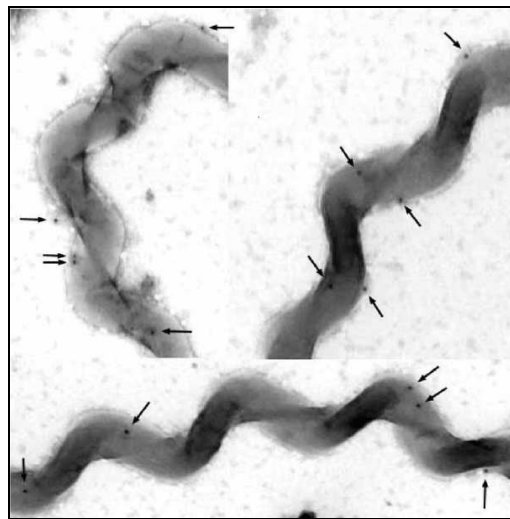


Figure 21 : Microscopie électronique après immunomarquage de la protéine LipL32 par antisérum anti-LipL32 à l'or colloïdal à la surface de *L. kirschneri*. (les flèches indiquent la localisation des molécules de LipL32 ainsi mises en évidence) [447]

Levett *et al.* [149] ont utilisé pour la première fois le gène *lipL32* pour le diagnostic de l'infection leptospirosique, et un fragment de 423 pb, localisé entre les positions 270 et 692 du gène codant pour LipL32, a servi de cible pour la PCR en temps réel (technologie SYBR Green). Le gène *lipL32* a été la cible de différentes PCR classiques [455, 456] et il a aussi été utilisé pour la mise au point de PCR nichées [457, 458] avec de bons résultats de spécificité et de sensibilité pour le diagnostic de routine.

En 2009, Stoddard *et al.*, [150] publie une technique de qPCR en technologie TaqMan visant un fragment de 242 pb du gène *lipL32*. La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 20 génomes équivalents par réaction, la méthode de détection est spécifique des leptospires pathogènes et applicable sur des échantillons biologiques [150]. Cette technique a été utilisée dans notre étude pour la mise en évidence de génomes de *Leptospira* pathogènes dans nos échantillons.

4.6.3. Construction d'un contrôle positif et d'un standard pour la PCR quantitative

Afin de quantifier l'ADN de *Leptospira* présent dans chaque échantillon de tissu rénal, nous avons cloné la séquence cible de 242 pb du gène codant pour LipL32 de *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Wijinberg dans un vecteur plasmidique pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Madison, WI). La méthode consiste à amplifier par PCR conventionnelle un fragment spécifique de *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Wijinberg cultivé en milieu EMJH, en utilisant les amorces LipL32-45F/LipL32-286R (**Tableau 9**) [150]. Le fragment amplifié a ensuite été ligué dans le vecteur pGEM[®]-T en suivant les instructions du fabricant, et des cellules JM109 de *Escherichia coli* ont été transformées avec ce plasmide. Le plasmide a ensuite été extrait d'*E. coli* en culture en milieu liquide. Des dilutions en série de l'ADN plasmidique ont été réalisées jusqu'à 10⁻¹² et considérées comme standard afin d'évaluer la sensibilité de la PCR quantitative.

La quantification de l'ADN a été faite avec le kit QuantIt[™] PicoGreen[®] (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) sur le LightCycler 2.0 System (Roche, Meylan, France). Cet ADN standard quantifié a ensuite été utilisé comme référence dans chaque run pour la quantification des leptospires dans les échantillons biologiques.

4.6.4 Construction d'un contrôle interne (CI) – Prélèvements de La Réunion

Afin de contrôler la réussite de l'étape d'extraction et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons biologiques, nous avons choisi un CI devant répondre aux critères suivants :

- Être utilisable pour les 13 espèces de mammifères étudiées ;
- La séquence ADN du CI devait être différente de séquences ADN de pathogènes connus chez les animaux ;
- La séquence ADN du CI ne devait pas avoir d'homologies avec une séquence d'ADN de *Leptospira*.

Par conséquent, pour les animaux de La Réunion, nous avons choisi une séquence de 63 pb du gène codant pour l'ADN polymérase du Varicella-Zoster Virus (VZV) isolé chez un

patient au GHSR. Cette séquence a été clonée dans un vecteur pGEM[®]-T Vector (Promega, Madison, WI), en utilisant les amorces VZV UP/VZV DP (**Tableau 9**) [459].

Afin d'identifier la concentration optimale de plasmide VZV à utiliser dans la qPCR, nous avons fait des dilutions en série du plasmide extrait (10^{-1} à 10^{-12}) et les avons testées par qPCR. La concentration optimale à ajouter dans chaque échantillon est celle pour laquelle l'IC est toujours détectable dans les échantillons négatifs.

4.6.5. Détection du génome de *Leptospira* par qPCR

Nous avons utilisé les amorces spécifiques des *Leptospira* pathogènes [150, 460] LipL32-45F/LipL32-286R visant un fragment de 242 pb sur le gène *lipL32* et la sonde d'hydrolyse LipL32-189P décrites par Stoddard *et al.* [150] (**Tableau 9**).

Les qPCR ont été conduites sur le LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les concentrations en amorces et en sonde ainsi que les conditions d'amplification ont été optimisées afin d'obtenir la meilleure sensibilité.

Le protocole d'amplification était le suivant :

- Dénaturation initiale à 95°C, pendant 8 minutes,
- 55 cycles à 95°C pendant 10 secondes, puis 58°C pendant 15 secondes,
- Refroidissement à 40°C, pendant 30 secondes.

Les concentrations finales des réactifs étaient les suivantes : 0,4 µM pour chaque amorce, 0,13 µM de sonde d'hydrolyse, 1X LightCycler[®]480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) et 2,5 µl d'extrait d'ADN, dans un volume de réaction total de 10 µl.

Pour chaque échantillon, la qPCR a été répétée au moins 2 fois. Nous considérons un échantillon comme positif si son C_q est compris entre 5 et 40 cycles (40 est le C_q maximal obtenu pour un échantillon positif à la dernière dilution permettant d'obtenir un résultat positif). Dans chaque run, nous incluons un puit témoin positif quantifié (mix + plasmide contenant *lipL32*), et un puit témoin négatif (mix + eau PCR-grade).

4.6.6. Détection du contrôle interne (CI) par qPCR

4.6.6.1. Prélèvements de La Réunion

Nous avons recherché la présence d'ADN amplifiable dans les échantillons négatifs afin de rechercher la présence d'éventuels inhibiteurs de la PCR. Pour cela, nous avons amplifié le fragment cloné du CI (Varicella-Zoster Virus) grâce aux amorces VZV UP/VZV DP associés à la sonde d'hydrolyse VZV P (**Tableau 9**) [459]. La qPCR a été conduite sur le LightCycler[®]480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Le protocole d'amplification était le suivant :

- Dénaturation à 95°C, pendant 8 minutes,
- Touch down de 10 cycles à 95°C, pendant 15 secondes, puis 60°C, pendant 30 secondes,
- 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes, puis 65°C pendant 30 secondes,
- Refroidissement à 40°C, pendant 30 secondes.

Les conditions de réaction étaient les suivantes : 0,25 µM de chaque amorces, 0,10 µM de sonde d'hydrolyse, 1X LightCycler[®]480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Meylan, France), et 2,5 µl d'extrait d'ADN, dans un volume de réaction total de 10 µl.

4.6.6.2. Prélèvements de Mayotte¹⁵

Pour les prélèvements rénaux de rats de Mayotte, nous avons utilisé le gène codant pour la GAPDH comme contrôle interne. Les amorces utilisées étaient les amorces hamster GAPDH C/D, qui amplifient un fragment de 250 pb sur le gène de ménage GAPDH (**Tableau 9**) [461]. Les produits d'amplification ont ensuite été visualisés par révélation au bromure d'éthidium après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

¹⁵ Ces analyses ont été conduites au cours du stage à l'Institut Pasteur de Paris.

Tableau 9 : Amorces et sondes utilisées pour les qPCR.

Cible	Amorce ou sonde d'hydrolyse ^a	Séquence (5' to 3')	Ref.
Gène codant pour LipL32 <i>Leptospira</i>	LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	[150]
	LipL32-286R	GAACTCCCATTTCAGCGATT	
	LipL32-189P	AAAGCCAGGACAAGCGCCG	
Gène codant pour l'ADN polymérase VZV ^b	VZV UP	CGGCATGGCCCGTCTAT	[459]
	VZV DP	TCGCGTGCTGCGGC	
	VZV P	ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC	
Gène codant pour la GADPH de hamster	Hamster GADPH C	TGGTATCGTGGGAAGGACTCA	[459]
	Hamster GADPH D	CCTGCTTCACCACCTTCTTG	

^a Toutes les sondes ont une terminaison 3' FAM et une terminaison 5' TAMRA.

^b Numéros d'accèsion GeneBank : AB059828-31 et X04370.

4.7. Culture de tissu rénal et d'urines sur milieu EMJH (animaux de La Réunion)

La mise en culture des tissus rénaux ou des urines a, pour chaque animal, été effectuée dans les quatre heures suivant l'euthanasie. A cause des contraintes de terrain, la méthode de culture a été différente pour les carnivores domestiques (cultures faites en 2009) et pour les rongeurs (cultures faites en 2010).

Carnivores domestiques : sous un poste de sécurité microbiologique, un morceau de tissu rénal d'environ 1 cm³ est préalablement broyé à l'intérieur du tube d'une seringue (2 ou 5 ml) à l'aide du piston. Puis, un échantillon de la taille d'un petit pois est de nouveau broyé mécaniquement à l'aide d'un broyeur (Mixer Mill MM 301, Retsch GmbH) en présence d'1 ml de milieu de culture EMJH (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) et de deux billes de verre stériles. Le liquide obtenu est alorsensemencé dans un milieu de culture EMJH et mis à l'étuve à l'obscurité à 29°C.

Rats noirs : Juste après le prélèvement, un rein est broyé à l'intérieur du tube d'une seringue (2 ml) à l'aide du piston etensemencé directement dans un milieu de culture EMJH qui est ensuite mis à l'étuve à l'obscurité à 29°C.

Lorsque la vessie était pleine, 0,2 à 0,3 ml d'urines a été prélevé stérilement directement dans la vessie à l'aide d'une seringue à insuline montée etensemencé immédiatement dans un milieu de culture EMJH.

Afin de rechercher la présence de leptospires, les cultures ont été examinées chaque semaine au microscope à fond noir, pendant quatre mois, délai après lequel, si aucun

leptospire n'était observé, elles étaient considérées comme négatives. Si des leptospires étaient présents, un repiquage de la culture était effectué.

Lorsque des contaminants (coques, bacilles) étaient présents dans les cultures, nous avons filtré le milieu de culture avec un filtre de 0,22 µm [9].

4.8. Analyse des séquences d'ARNr 16S (prélèvements de reins de rats noirs de Mayotte)

La séquence codant pour l'ARNr 16S de *Leptospira* permet d'identifier la souche au niveau de l'espèce génomique [462]. Les amplifications et les alignements de séquences ont été conduits par l'équipe de l'Unité de Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur de Paris. L'ADN a été amplifié de façon classique par Taq polymérase (GE Healthcare). Le gène *rrs* a été amplifié par PCR nichée grâce aux couples d'amorces A/B [146] puis C/RS4 [463] (**Tableau 10**). Le séquençage a été conduit à la plate-forme Génotypage des Pathogènes (Institut Pasteur, Paris) sur un séquenceur à capillaires ABI 3730XL (Applied Biosystems) en utilisant le fluorophore Big Dye v1.1 (Applied Biosystems). Les séquences ont ensuite été comparées avec les séquences des souches de *Leptospira* isolées chez des patients à Mayotte [229] ainsi qu'avec les séquences connues publiées dans GenBank, par Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR nichée (prélèvements de reins de rats noirs, Mayotte 2007).

Amorces	Séquences	Références
A	5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3'	[146]
B	5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'	[146]
C	5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3'	[146]
RS4	5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3'	[463]

Les séquences ont été alignées sous Multalin [464] et MEGA.5 [465] avec le programme MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation) [466]. Le meilleur modèle a été sélectionné grâce au programme JModelTest2 [467] en utilisant le critère d'information d'Akaike (AIC). Enfin, l'arbre a été construit avec le programme FigTree.

4.9. Analyses statistiques (animaux de La Réunion)¹⁶

Toutes les analyses statistiques ont été conduites à l'aide du logiciel R [468]. Le seuil de significativité considéré est $p < 0,05$.

4.9.1. Comparaison des charges bactériennes rénales

Nous avons cherché à comparer les moyennes des charges rénales entre les espèces en réalisant une analyse de variance et un test de comparaisons multiples des moyennes. Les contraintes à vérifier pour valider l'analyse sont la normalité et l'homogénéité des variances des résidus. Notre démarche a été la suivante :

- Transformation des données brutes de charges bactériennes (x) en $\ln(x+1)$;
- Analyse de variance et test de Fisher-Snedecor ;
- Description graphique de la distribution des résidus (afin de voir si cette distribution se rapprochait de la normalité) ;
- Test d'homogénéité des variances et validation graphique ;
- Si hypothèses non validées, transformation de Box-Cox sur données pour homogénéiser les variances ;
- Test de comparaisons multiples des moyennes si hypothèses validées ;
- Comparaison des résultats avec un test de comparaisons multiples basé sur le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney avec correction de type Bonferroni ;
- Recherche des facteurs de variations de la charge bactérienne rénale chez le rat noir et la souris.

4.9.2. Facteurs de risque d'infection par *Leptospira*

Différents facteurs de risque ont été testés en fonction des données disponibles pour chaque espèce.

¹⁶ Pour cette partie, les analyses statistiques ont été faites avec la précieuse collaboration d'Aurore Benneveau et de Frédéric Chiroleu.

Pour les rongeurs :

- Espèce,
- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Lieu de capture (est *versus* ouest, en fonction de l'isohyète 2000 mm de pluie par an¹⁷),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Pour les musaraignes et les tangués :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Lieu de capture (est *versus* ouest).

Pour les carnivores errants :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Lieu de capture (est *versus* ouest),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Pour les porcs et les cerfs :

- Poids,
- Résultat de l'analyse sérologique.

(89/90 porcs prélevés sont des truies de réformes. Nous n'avons pas les données de sexe et d'âge pour les cerfs).

Pour les caprins (nous n'avons pas d'information sur l'élevage d'origine pour la majorité des chèvres prélevées) :

- Sexe,
- Poids.

¹⁷ Voir Matériels et Méthodes.

Pour les bovins :

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Poids,
- Nombre de ferme(s) fréquentées (les bovins peuvent circuler dans plusieurs fermes au cours de leur vie. Nous avons testé l'effet du nombre de fermes dans lesquelles l'animal a circulé au cours de sa vie),
- Résultat de l'analyse sérologique.

Aucune étude statistique n'a été faite sur les ovins (seulement cinq individus prélevés) ni sur les chauves-souris (seulement deux positifs).

Les bovins, les caprins et les porcs étant des animaux qui circulent beaucoup entre différents élevages au cours de leur vie, nous avons décidé de ne pas tester l'effet "localisation de l'élevage d'origine" car cette donnée correspond au dernier élevage fréquenté uniquement. De plus, pour ces espèces, les biais liés aux conditions d'élevage sont importants et peuvent faire varier de façon importante les résultats de l'analyse des facteurs de risque. Il conviendra d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats.

L'association des facteurs de risque avec l'infection leptospirosique a été d'abord testée par analyse univariée. Les odds ratio (OR) bruts ont été calculés pour tester l'association entre les variables étudiées et le statut sérologique d'une part, entre les variables étudiées et le statut de porteur rénal d'autre part. Une régression logistique a été utilisée pour tester les interactions entre les variables, afin de déterminer quelles étaient les variables liées. Une sélection ascendante des variables explicatives a été conduite en utilisant le critère d'information d'Akaike (Akaike's Information Criterion, AIC) afin de choisir le meilleur modèle. La performance du modèle a été mesurée grâce au test de Hosmer-Lemeshow (une valeur de $p < 0,05$ indique que le modèle est peu concordant avec la réalité). Toutes les interactions possibles entre les variables ont été testées et retenues dans le modèle si elles étaient statistiquement et biologiquement significatives ($p < 0,05$), et les OR corrigés ont été calculés.

4.9.3. Corrélation entre l'infection rénale et l'analyse semi-quantitative des paramètres urinaires

La même méthodologie a été appliquée à l'étude des résultats des bandelettes urinaires. Nous n'avons pris en compte dans cette seconde étude que les animaux pour lesquels nous avons un résultat d'analyse urinaire (soit 95 animaux). Les facteurs de risque considérés étaient :

- La présence de leucocytes dans les urines,
- La présence de nitrites dans les urines,
- La présence de protéines dans les urines,
- Le pH urinaire,
- La présence de sang dans les urines,
- La densité urinaire,
- La présence de corps cétoniques dans les urines,
- La présence de glucose dans les urines.



**CHAPITRE VI : EPIDEMIOLOGIE ET ECOLOGIE DE LA
LEPTOSPIROSE ANIMALE A LA REUNION**



1. Résultats

1.1. Bilan des captures

Toutes les captures et prélèvements ont été conduits entre le 12 février 2009 et le 20 août 2009 ; quelques piégeages de rats ont de nouveau été effectués entre le 16 et le 20 mai 2010. La **Figure 22** présente la répartition des sites de captures; la **Figure 23** illustre quelques environnements où des captures de rats ont été faites.

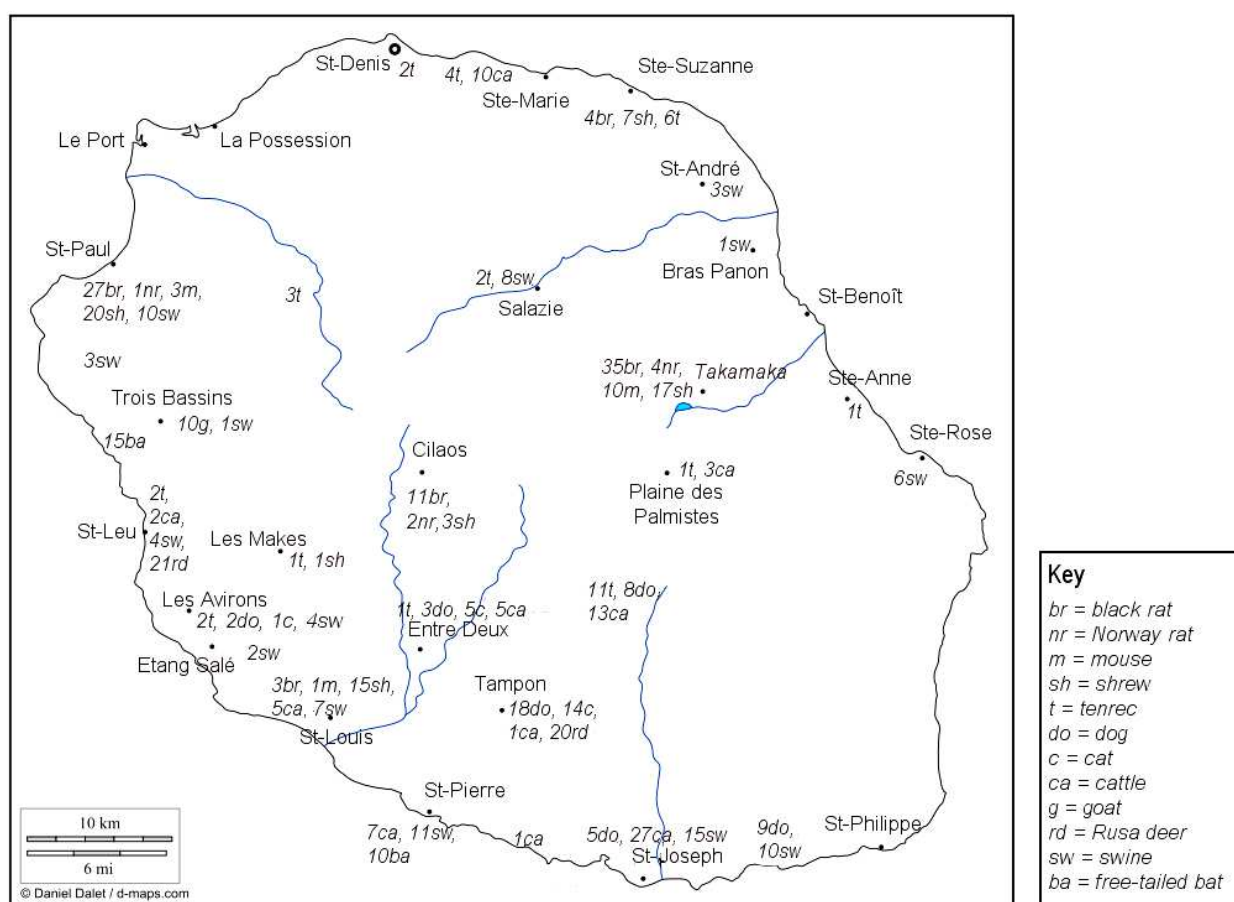




Figure 23 : Types d'environnements explorés pour la capture de micromammifères à La Réunion.

A. Exploitation agricole à Takamaka (Hauts de Saint-Benoît) ; **B.** Sainte-Suzanne, champs de canne près du temple tamoul ; **C.** Sainte-Suzanne ; **D.** Ratière posée aux pieds des massifs de bambous ; **E.** Sainte-Suzanne (berges de la rivière) ; **F.** Takamaka : hangar et amoncellement de matériaux (servant de gîtes pour les rongeurs) ; **G.** Takamaka : abri pour les bovins ; **H.** Etang du Gol ; **I.** Etang de Saint-Paul.

Les **Tableaux 11 et 12** synthétisent les résultats des captures et des prélèvements.

Les résultats de piégeage montrent que les populations de souris et de rats surmulots sont de taille inférieure à celle des rats noirs. A La Réunion, le climat chaud et la présence de divers habitats forestiers complexes, sont favorables au rat noir et lui procurent un avantage significatif sur le rat surmulot, moins à l'aise dans les milieux verticaux [469, 470]. Barbehenn [471] suggère que la musaraigne a été responsable du déclin de la population de souris domestiques sur l'île de Guam (océan Pacifique). Ces deux micromammifères sont sympatriques à La Réunion (*observation personnelle*), c'est pourquoi nous supposons qu'un schéma de compétition similaire a eu lieu à La Réunion, expliquant la faible densité de souris domestiques sur l'île et le peu de piégeages rapportés pour cette espèce.

Les truies reproductrices de réforme représentent 98,8% de la totalité des porcins prélevés (un seul verrat a été prélevé). Nous avons choisi de prélever ces animaux plutôt que

les animaux à l'engrais pour deux raisons : a/ la leptospirose ayant des conséquences sur la reproduction, il nous a semblé judicieux d'évaluer la prévalence de la maladie chez les animaux reproducteurs plutôt que chez les jeunes animaux à l'engraissement ; b/ techniquement, il était plus simple pour une personne seule de prélever les truies de réformes car la chaîne d'abattage est plus lente et l'organisation des abattages permettait d'avoir des animaux provenant de nombreux élevages.

Nous n'avons pas d'information concernant le sexe et l'âge des cerfs *Rusa* prélevés à l'abattoir, mais nous savons cependant que les animaux abattus avaient environ le même âge.

L'élevage des ovins est en développement à La Réunion, ces animaux sont principalement consommés sous forme de viande fraîche (en opposition à la viande congelée) pour les fêtes (Aïd el Kebir, fêtes des mères, Pâques) et abattus pour ces occasions seulement, c'est pourquoi nous n'avons que cinq ovins dans notre échantillon.

Nous ne rappellerons pas dans ce chapitre les notions exposées dans la **section 1.2.** du **Chapitre IV "Comment définir une "espèce réservoir" par les résultats d'analyses de laboratoire ?"**. Le lecteur pourra s'y référer pour mieux comprendre l'interprétation des résultats qui suivent.

Tableau 11 : Animaux prélevés à La Réunion en 2009 et 2010.

En 2010, 37 rats noirs ont été capturés afin d'effectuer des prélèvements de reins et urines pour mise en culture (dans la cadre d'une collaboration avec Michel Pascal pour le projet Life Plus).

Espèce	Nb total	Nb femelles	Nb mâles	Sexe nd	Adultes	Jeunes ^a	Sub-adulte ^b	Age nd	Poids moyen (±écart-type)	Poids min-max	Longueur corps (±écart-type), en mm	Long. corps min-max (mm)	Lieu de capture (faune sauvage) / Lieu de résidence (animaux de rente) avant la mort	Nb par zone ^f
Rat Noir (2009)	80	32	47	1	52	28	0	0	128,2 (±37,81) g	115–202 g	169,96 (±15,66)	115 - 202	Cilaos (11), SteSuzanne (4), StLouis (3), StPaul (27), Takamaka (35)	39 E, 41 O
Rat Noir (2010)	37	18	19	0	na	na	na	0	104,5 (±33,88) g	51 – 193 g	158,46 (±19,55)	21 - 189	Forêt de la Grande Chaloupe (communes de La Possession et StDenis)	37O
Rat Surmulot	7	3	4	0	5	2	0	0	131,1 (±34,54) g	90-170 g	175,28 (±19,03)	150 - 207	Cilaos (2), StPaul (1), Takamaka (4)	4 E, 3 O
Souris	14	6	7	1	10	4	0	0	13,94 (±1,96) g	10,3 - 17,5 g	74,14 (±7,67)	62 - 88	StLouis (1), StPaul (3), Takamaka (10)	10 E, 4 O
Musaraigne	62	31	31	0	53	9	0	0	25,2 (±6,33) g	14,6-45 g	97,97 (±12,5)	76 – 150	Cilaos (3), SteSuzanne (7), StLouis (15), StPaul (20), Takamaka (17)	24 E, 38 O
Tenrec	38	25	13	0	20	18	0	0	479,6 (±158,98) g	215–820 g	242,34 (±33,27)	188 – 287	Avirons (2), Entre Deux (1), Maido (3), Les Makes (1), Plaine des Cafres (11), Plaine des Palmistes (1), Salazie (2), StDenis (2), SteAnne (1), SteMarie (4), SteSuzanne (6), StLeu (2)	21 E, 17 O
Chien errant	51	24	27	0	39	11	0	0	na	na	na	na	Avirons (2), Entre Deux (3), Langevin (7), Plaine des Cafres (8), Saint-Joseph (5), Tampon (18), Vincendo (2), na (6)	22 E, 23 O, 6 na
Chat errant	30	16	14	0	15	13	0	0	na	na	na	na	Avirons (1), Entre Deux (5), Tampon (14), na (10)	20 O, 10 na
Bovin	91 ^c	24	67	0	15 ^d	35 (veaux)	41 ^e	0	245,3 (±118,49) kg	85-472,2 kg	na	na	Entre Deux (5), Petite Ile (1), Plaine des Cafres (13), Plaine des Palmistes (3), SteMarie (10), StJoseph (27), StLeu (2), StLouis (5), StPierre (7), Tampon (1), na (17)	?
Caprin	60	51	9	0	60	0	0	0	16,6 (±5,36) kg	7,4-31,1 kg	na	na	Trois Bassins (10), na (50)	10 O, 50 na
Ovin	5	0	5	0	0	5	0	0	20,7 (±2,342) kg	17,2–23.3 kg	na	na	na (5)	5 na
Cerf Rusa	41	na	na	41	na	na	na	41	26,6 (±2,21) kg	17-46,8 kg	na	na	StLeu (21), Tampon (20)	41 O
Porcin	90	89	1	0	90	0	0	0	189,5 (±34,89) kg	117,2-264,2 kg	na	na	Avirons (4), Bras Panon (1), Etang Salé les Hauts (2), Grand Ilet (8), Langevin (6), Rivière StLouis (5), Les Makes (1), Piton StLeu (4), Ste André (3), SteRose (6), StGilles les Hauts (5), StJoseph (15), StLouis (2), StPaul (10), StPierre (11), Trois Bassins (1), Vincendo (4), na (2)	43 E, 45 O, 2 na
Petit Molosse (prélèv. poolés)	15	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	Trois Bassins (15)	15 O
Petit Molosse (prélèv. individuels)	10	8	2	0	10	0	0	0	6,8 (±0,48) g	5,5–6,9 g	na	na	StPierre (10)	10 O
Total	631	327	246	43	345	109	41	57						

na : Donnée non disponible (*not available*) ; nd : Non déterminé.

a Jeune : Individu qui ne s'est pas reproduit.

b Sub-adulte : Jeune adulte dans sa première année de reproduction.

Parmi les 91 bovins : 52 bovins allaitants et 39 bovins laitiers.

d Parmi les 15 bovins adultes : 4 taureaux et 11 vaches.

e Parmi les 41 sub-adultes : 11 génisses et 30 taurillons.

f Zone de l'île selon l'isohyète 2000 mm. E = Est, O = Ouest.c

Tableau 12 : Types de prélèvements effectués par espèce (animaux de La Réunion, prélèvements 2009 et 2010).

Espèces	Prélèvement pour sérologie MAT			Prélèvements pour PCR		Prélèvements pour culture		Analyse par bandelette urinaire
	Nb total capturés	Sérum	Sang sur buvard ¹	Tissu rénal pour PCR	Urines	Tissu rénal	Urines	Nombre d'analyses
Rat Noir	117	66	80	80	36	37 ²	3 ²	19
Rat Surmulot	7	7	7	7	2	0	0	0
Souris	14	3	14	14	5	0	0	0
Musaraigne	62	3	62	62	22	0	0	0
Tenrec	38	38	0	38	35	0	0	35
Chien	51	50	0	30	27	30	0	27
Chat	30	30	0	30	18	30	0	14
Bovin	91	88	0	89	0	0	0	0
Caprin	60	60	0	60	0	0	0	0
Ovin	5	5	0	5	0	0	0	0
Cerf Rusa	41	34	0	41	0	0	0	0
Porcin	90	89	0	90	0	0	0	0
Petit Molosse (prélèv. poolés)	15	0	na	na	15	0	0	0
Petit Molosse (prélèv. individuels)	10	0	54	0	10	0	0	0
Total	631	473	217	546	170	97	3	95

na : Donnée non disponible (*not available*).

¹ Non analysés pour le moment.

² Prélèvements effectués en 2010.

1.2. Résultats sérologiques

L'**Annexe I** présente les tableaux des résultats de sérologie et de qPCR par espèce, et pour chaque espèce les résultats sont détaillés en fonction des caractères épidémiologiques relevés.

Nous avons considéré qu'un sérum était positif à un séro groupe si le titre d'agglutination était au moins de 100. Si des agglutinations étaient observées pour plusieurs sérogroupes, nous avons considéré que le séro groupe infectant était celui pour lequel le titre présentait au moins deux dilutions d'écart avec les autres. Sinon, nous avons considéré le/les séro groupe(s) infectant(s) comme "non déterminé".

La séroprévalence est la plus élevée chez les rats surmulots (85,7%), puis les rats noirs (78,8%), les cervidés (61,8%), les caprins (60%), les truies (48,3%), les chiens (46%), les bovins (34,5%), les chats (26,7%), et les tangués (15,8%). Le **Tableau 13** présente les résultats de séroprévalence et les intervalles de confiance à 95% de la séroprévalence par espèce, qui sont repris dans la **Figure 24**.

Tableau 13 : Séroprévalence et intervalle de confiance à 95% de la séroprévalence chez 9 espèces animales de La Réunion prélevées en 2009 (MAT).

	N	N positifs	Séroprévalence (%)	IC95% de la séroprévalence
Rats noirs	66	52	78,8	68,9 – 88,6
Rats surmulots	7	6	85,7	59,8 – 100,0
Tenrecs	38	5	15,8	4,2 – 27,4
Chats	30	8	26,7	10,8 – 42,4
Chiens	50	23	46,0	32,2 – 59,8
Bovins	87	30	34,1	24,2 – 44,0
Caprins	30	36	60	47,6 – 72,4
Cerfs	34	21	61,8	45,4 – 78,1
Porcins	89	43	48,3	37,9 – 58,7

Le **Tableau 14** présente les sérogroupes identifiés par MAT comme infectant pour chaque espèce ; ces résultats sont représentés graphiquement sur la **Figure 25**. Le **Tableau 15** présente les titres en anticorps pour chaque séro groupe et par espèce. Enfin, le **Tableau 16** détaille toutes les réactions d'agglutinations observées dans chaque espèce, ainsi que les titres minimum et maximum (ce dernier tableau permet de présenter l'ensemble des réactions d'agglutination observées, y compris les réactions de co-agglutinations qui ne sont pas présentées dans les tableaux 14 et 15).

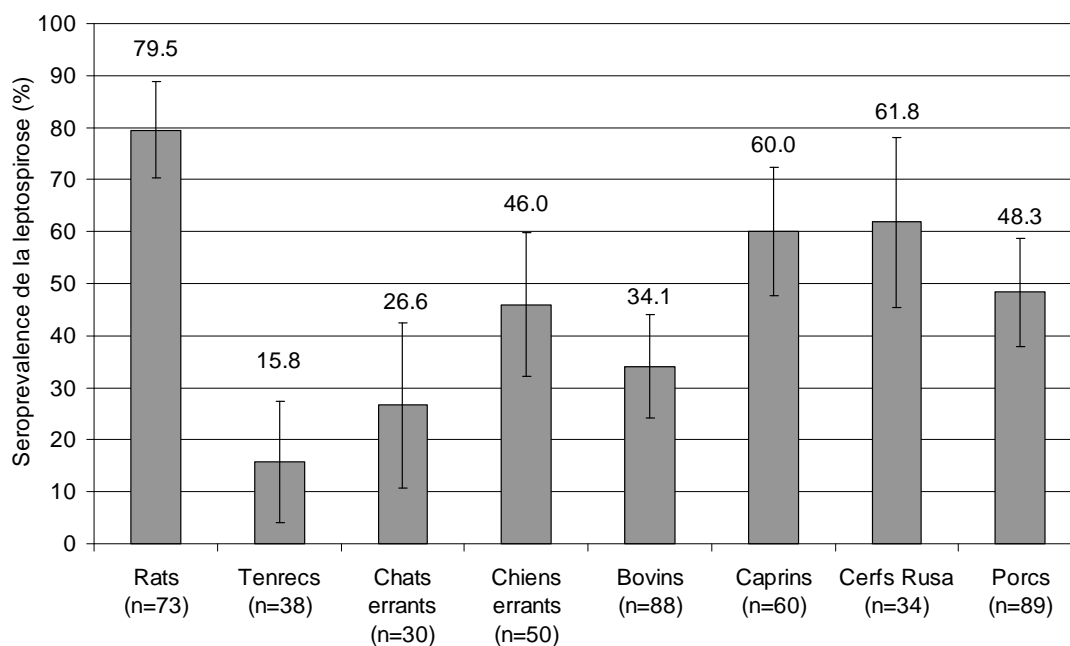


Figure 24 : Séroprévalence par espèce et intervalle de confiance à 95% chez les animaux de La Réunion prélevés en 2009 (MAT).

1.2.1. Rats noirs

Le sérotype le plus fréquemment retrouvé chez les rats noirs est *Icterohaemorrhagiae* (22/52, soit 43,3% des séropositifs), avec des titres compris entre 100 et 3200, suivi de *Canicola* (7/52, soit 13,5%) avec des titres compris entre 100 et 400. Nous avons aussi identifié les sérotypes *Sejroe*, *Mini* et *Cynopteri* comme circulant chez le rat noir. Les réactions à plus d'un sérotype représentent 36,5% des réactions sérologiques positives chez les rats noirs.

1.2.2. Rats surmulots

Chez les rats surmulots, on note la circulation des sérotypes *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Sejroe* et *Panama*. Les titres sont faibles, compris entre 100 et 400.

1.2.3. Tenrec

Chez les tenrecs, le sérotype le plus fréquent est *Icterohaemorrhagiae*, comptant pour 60% des réactions positives. Des anticorps contre les sérotypes *Canicola* et *Bataviae* ont aussi été identifiés. Les titres en anticorps dirigés contre *Icterohaemorrhagiae* peuvent atteindre 800, tandis que ceux dirigés contre *Canicola* et *Bataviae* sont de 100.

1.2.4. Chats errants

Les chats séropositifs le sont généralement à plusieurs sérogroupes sans qu'il soit possible de déterminer un séro groupe majoritaire (87,5% de sérologies positives à plus d'un séro groupe). Le **Tableau 16** présente l'ensemble des sérogroupes identifiés chez le chat. Les titres en anticorps anti-leptospires sont relativement faibles chez les chats, puisque compris entre 100 et 400.

1.2.5. Chiens errants

Canicola est le séro groupe le plus fréquent chez les chiens (10/23, soit 43,5%), tandis qu'Icterohaemorrhagiae représente 21,7% (5/23) des séropositifs. Les titres en anticorps contre les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola peuvent atteindre 1600 et 800 respectivement. Nous avons aussi retrouvés des anticorps contre les sérogroupes Sejroe, Panama, Tarassovi et Ballum chez les canidés, avec des titres peu élevés (100 à 400).

1.2.6. Bovins

Chez les bovins, 56,6% des réactions séropositives sont dirigées contre le séro groupe Sejroe avec des titres pouvant s'élever jusqu'à 3200. Des réactions sérologiques positives ont aussi été trouvées contre les sérogroupes Canicola, Panama, Pyrogenes, Tarassovi et Ballum, avec des titres faibles, ≤ 400). Enfin, 20% des bovins étaient séropositifs à plus d'un séro groupe.

1.2.7. Caprins, Cervidés et Porcins

Panama est le séro groupe circulant majoritairement chez les caprins, cervidés et porcins, représentant respectivement 69,4%, 38,1% et 37,2% des séropositifs. Pyrogenes représente le second séro groupe majeurs chez ces trois espèces, avec 16,6%, 23,8% et 25,6% des séropositifs chez les caprins, cervidés et porcins respectivement. De plus, les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Mini sont retrouvés chez les cervidés et les porcins ; Ballum et

Cynopteri sont retrouvés chez les porcins uniquement, tandis qu'un caprin présentait une sérologie positive vis-à-vis du séro groupe Autumnalis.

Chez ces trois espèces, les titres en anticorps sont faibles, généralement inférieurs ou égaux à 400, excepté chez deux caprins qui présentent des titres élevés en anticorps contre le séro groupe Pyrogenes (800 et 1600).

Les réactions à plus d'un séro groupe comptent pour 23,8% des réactions sérologiques positives chez les cervidés, 20,9% chez les porcins et 11,1% chez les caprins.

1.2.8. Souris et Musaraigne

Seulement trois sérologies par MAT sur sérum ont été conduites chez chacune de ces deux espèces. Nous n'avons en effet pas eu le temps, au cours de ce travail de thèse, de traiter les sérologies sur buvards.

Les trois souris testées étaient séropositives : une contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae au titre de 3200, tandis que les deux autres étaient séropositives pour plusieurs séro groupes à des titres plus faibles (100 à 400).

Parmi les trois musaraignes testées, deux étaient séropositives : l'une présentait des anticorps contre Icterohaemorrhagiae au titre de 6400, l'autre était séropositive pour le séro groupe Bataviae au titre 400.

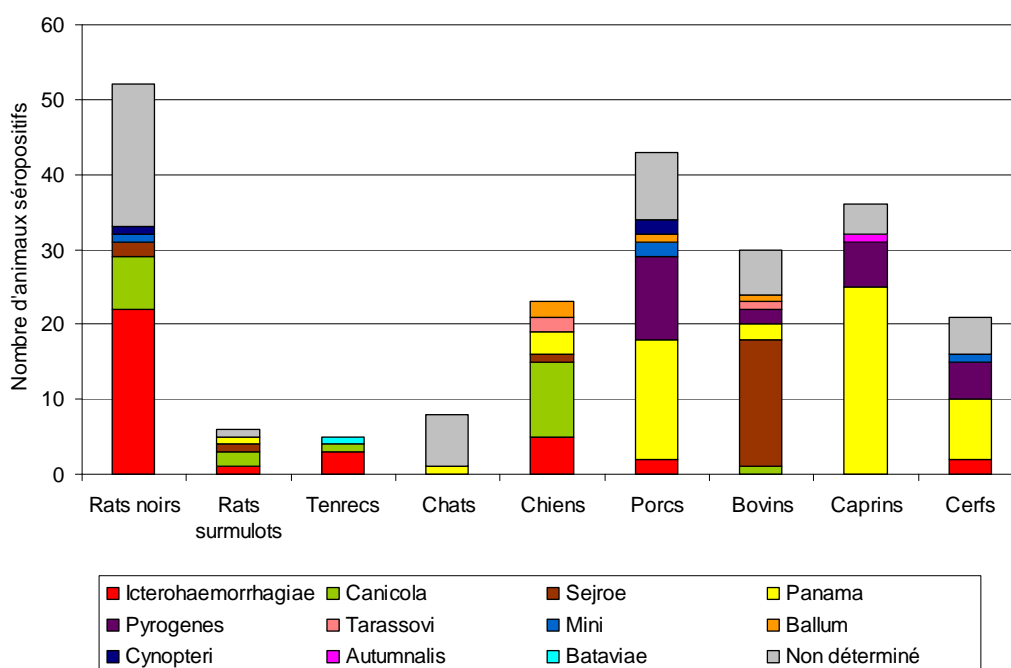


Figure 25 : Nombre d'animaux séropositifs par séro groupe et par espèce (224 animaux séropositifs de La Réunion, 2009).

Tableau 14 : Résumé des résultats sérologiques par espèce et par séro groupe sur 224 animaux de La Réunion séropositifs par MAT (captures de 2009).

Les résultats sur musaraignes, souris et ovins ne sont pas présentés car le nombre d'individus testés était ≤ 5 .

	Ictero.	Canicola	Sejroe	Panama	Pyrogenes	Tarassovi	Mini	Ballum	Cynopteri	Autumnalis	Bataviae	Non déterminé	Négatif	Total
Rat noir	22	7	2	0	0	0	1	0	1	0	0	19	14	66
Rat surmulot	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7
Tenrec	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	33	38
Chat	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	22	30
Chien	5	10	1	3	0	2	0	2	0	0	0	0	27	50
Bovin	0	1	17	2	2	1	0	1	0	0	0	6	58	88
Caprin	0	0	0	25	6	0	0	0	0	1	0	4	24	60
Cerf	2	0	0	8	5	0	1	0	0	0	0	5	13	34
Porcin	2	0	0	16	11	0	2	1	2	0	0	9	46	89
Total	35	21	21	56	24	3	4	4	3	1	1	51	238	462

Ictero. = Icterohaemorrhagiae.

Tableau 15 : Titres minimum et maximum obtenus par MAT pour chaque séro groupe, par espèce (224 animaux séropositifs de La Réunion, 2009).

Les réactions de co-agglutination ne sont pas présentées.

	Ictero.	Canicola	Sejroe	Panama	Pyrogenes	Tarassovi	Mini	Ballum	Cynopteri	Autumnalis	Bataviae
Rat noir	100-3200	100-400	100, 400	/	/	/	100	/	3200	/	/
Rat surmulot	400	200, 400	200	100	/	/	/	/	/	/	/
Tenrec	200-800	100	/	/	/	/	/	/	/	/	100
Chat	/	/	/	100	/	/	/	/	/	/	/
Chien	100-1600	100-800	400	100	/	200, 400	/	100	/	/	/
Bovin	/	200	100-3200	100	100	400	/	100	/	/	/
Caprin	/	/	/	100-400	100-1600	/	/	/	/	200	/
Cerf	400	/	/	100-200	100	/	800	/	/	/	/
Porcin	200, 400	/	/	100-400	100-400	/	100, 400	100	100, 100	/	/

Tableau 16 : Résultats détaillés de séroprévalence, minimum et maximum des titres en anticorps (MAT).

Les réactions de co-agglutination ne sont pas prises en compte et toutes les réactions positives sont présentées.

Espèces	Séroprévalence (%)	Sérogroupe	Nombre de réactions d'agglutination significative	Titre minimum	Titre maximum	
Rat Noir	52/66 (78,8)	Australis	1	400	400	
		Autumnalis	2	100	100	
		Bataviae	5	100	200	
		Ballum	3	200	1600	
		Canicola	18	100	1600	
		Cynopteri	4	100	3200	
		Grippotyphosa	5	100	1600	
		Hebdomadis	5	100	1600	
		Icterohaemorrhagiae	37	100	3200	
		Mini	9	100	800	
		Panama	9	100	1600	
		Pomona	4	100	800	
		Pyrogenes	7	100	1600	
		Sejroe	11	100	3200	
Tarassovi	5	400	3200			
Rat Surmulot	6/7 (85,7)	Canicola	3	200	400	
		Icterohaemorrhagiae	1	400	400	
		Panama	1	100	100	
		Sejroe	2	200	400	
Souris	3/3 (100)	Canicola	2	100	200	
		Icterohaemorrhagiae	3	100	3200	
		Pyrogenes	2	200	400	
Musaraigne	2/3 (66,6)	Bataviae	1	100	100	
		Icterohaemorrhagiae	1	6400	6400	
Tenrec	6/38 (15,8)	Bataviae	1	100	100	
		Canicola	1	100	100	
Chien	23/50 (46,0)	Icterohaemorrhagiae	3	200	800	
		Bataviae	1	200	200	
		Ballum	3	100	100	
		Canicola	10	100	800	
		Icterohaemorrhagiae	5	100	1600	
		Panama	3	100	100	
		Sejroe	1	400	400	
		Tarassovi	2	200	400	
Chat	8/30 (26,7)	Australis	1	200	200	
		Ballum	1	100	100	
		Canicola	3	100	100	
		Icterohaemorrhagiae	1	200	200	
		Mini	1	200	200	
		Panama	6	100	400	
		Pomona	1	200	200	
		Pyrogenes	4	100	400	
		Ballum	1	100	100	
		Canicola	3	200	800	
Bovin	30/88 (34,1)	Icterohaemorrhagiae	1	400	400	
		Mini	4	100	400	
		Panama	2	100	100	
		Pyrogenes	5	100	200	
		Sejroe	21	100	3200	
		Tarassovi	2	100	400	
		Autumnalis	1	200	200	
		Ballum	1	200	200	
		Panama	30	100	400	
Caprin	36/60 (60,0)	Pyrogenes	9	100	1600	
		Ovin	0/5 (0,0)	/	/	/
		Icterohaemorrhagiae	4	100	400	
Cerf Rusa	21/34 (61,8)	Mini	1	800	800	
		Panama	15	100	200	
		Pyrogenes	9	100	100	
		Australis	1	200	200	
Porcin	42/89 (47,2)	Autumnalis	2	100	100	
		Ballum	3	100	200	
		Canicola	1	100	100	
		Cynopteri	3	100	100	
		Icterohaemorrhagiae	2	200	400	
		Mini	2	100	400	
		Panama	24	100	400	
		Pyrogenes	14	100	200	
		Sejroe	1	100	100	
		Tarassovi	1	100	100	

1.3. Prévalence du portage rénal (résultats des qPCR)

La sensibilité de détection de la technique, évaluée au laboratoire sur le LightCycler®480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) était de 7400 copies par ml. Etant donné que *Leptospira* contient en moyenne cinq génomes équivalents par bactérie [460], notre sensibilité analytique était de 1-2 bactérie(s) par µl, soit 2-2,5 bactéries par réaction.

Les résultats de prévalence du portage rénal par espèce sont reportés dans le **Tableau 17** et résumés graphiquement sur la **Figure 26** ; les résultats de prévalence de l'excrétion urinaire sont reportés dans la **Figure 27** (comme le nombre d'animaux étudiés pour la prévalence de l'excrétion urinaire était faible, nous ne présentons pas les IC95%).

Bien que Tulsiani *et al.* [326] montrent une parfaite concordance entre les résultats de PCR sur reins et sur urines, notre étude démontre que la proportion d'animaux détectés comme présentant une leptospirurie est inférieure à la proportion d'animaux porteurs de leptospires au niveau rénal.

La détection de la présence de leptospires au niveau rénal est un témoin plus sensible que la détection de la bactérie dans les urines, cette dernière étant intermittente [9].

Dans notre étude, nous considérons tout animal porteur rénal de *Leptospira* comme excréteur (transitoire ou chronique) de la bactérie, et donc contributeur (transitoire ou chronique) à la contamination de l'environnement.

Tableau 17 : Prévalence du portage rénal chez 12 espèces animale étudiées à La Réunion (2009) évaluée par qPCR ciblant le gène *lipL32* et intervalle de confiance à 95% (IC95%).

	N	N positifs	Prévalence du portage rénal (%)	IC95% de la prévalence du portage rénal
Rats noirs	76	50	65,8	55,1 – 76,4
Rats surmulots	6	4	66,6	28,9 – 100,0
Souris	13	11	84,6	65,0 – 100,0
Musaraignes	48	15	31,25	18,1 – 44,4
Tenrecs	34	0	0	/
Chats	21	6	28,6	9,2 – 47,9
Chiens	24	7	29,2	11,0 – 47,3
Bovins	76	14	18,4	9,7 – 27,1
Caprins	49	13	26,5	14,2 – 38,9
Cerfs	32	6	18,8	5,2 – 32,3
Ovins	5	0	0	/
Porcins	83	13	15,6	7,8 – 23,5

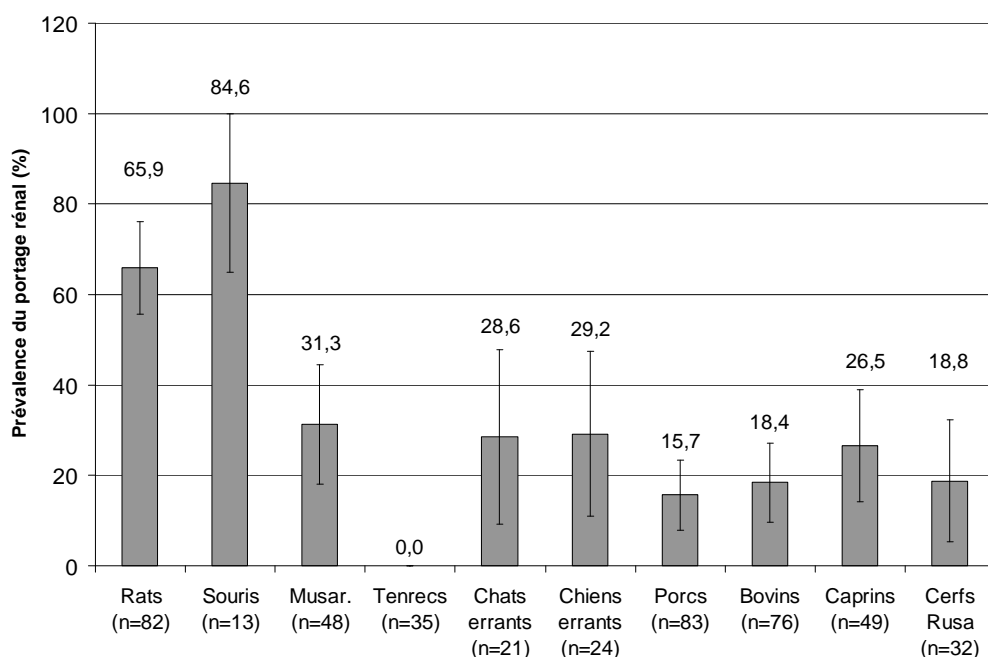


Figure 26 : Prévalence du portage rénal de *Leptospira* par espèce (animaux de La Réunion, 2009) évaluée par qPCR ciblant le gène *lipL32* et intervalle de confiance à 95%. (*R. rattus* et *R. norvegicus* ont été regroupés sous l'appellation "rats")

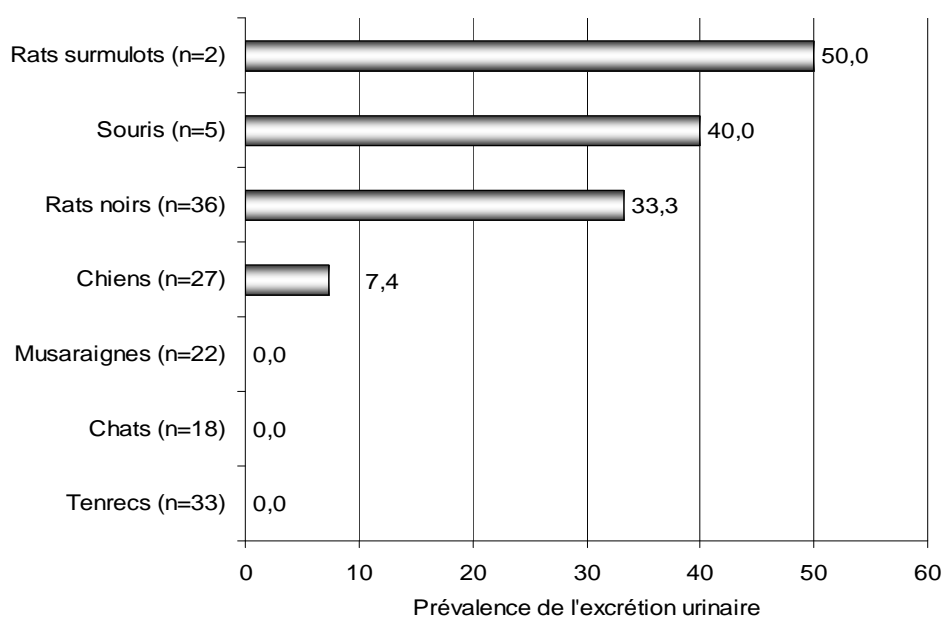


Figure 27 : Prévalence de l'excrétion urinaire par espèce (animaux de La Réunion, 2009) évaluée par qPCR ciblant le gène *lipL32*.

Les résultats des qPCR sur les prélèvements poolés d'urine de chauves-souris ont montré 80% (12/15) d'échantillons présentant des inhibiteurs, tandis que 20% (3/15) des échantillons étaient négatifs. Les prélèvements individuels d'urine présentaient des inhibiteurs pour 80% (8/10) d'entre eux, mais deux individus (20%) prélevés ont été détectés comme excréteurs urinaires par qPCR, bien que les Cq soient élevés (39,6 et 32,3 cycles).

1.4. Résultats des cultures de reins et d'urines

Les cultures de reins et urines n'ont pas donné de résultats probants. En effet, aucune culture faite à partir de reins de chien ou de chat n'a été positive (alors que certains de ces échantillons ont donné des résultats positifs en qPCR). Par ailleurs, si les observations microscopiques ont permis d'observer des leptospires dans deux cultures rénales de rats noirs prélevés en 2010, des contaminants se sont par la suite développés dans ces cultures et nous n'avons pas pu les conserver.

1.5. Charge bactérienne rénale moyenne

1.5.1. Description des données

Tableau 18 : Quantification de la concentration en leptospires dans le tissu rénal par qPCR visant le gène *lipL32*. Moyennes brutes et écart-types, données transformées ($\ln[x+1]$) et écart-types de la charge bactérienne rénale par espèce.

Espèce (nombre)	Moyenne brute \pm écart-type (copies de génome/mg de rein)	Moyenne $\ln(x+1)$ \pm écart-type
Souris (n = 11)	$6,4 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^3$	$9,558 \pm 6,118$
Rat noir (n = 50)	$5,7 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^7$	$8,006 \pm 4,818$
Musaraigne (n = 15)	$2,1 \times 10^3 \pm 3,2 \times 10^3$	$6,912 \pm 1,215$
Cerf Rusa (n = 6)	$2,9 \times 10^3 \pm 3,7 \times 10^3$	$6,899 \pm 2,053$
Chèvre (n = 13)	$9,2 \times 10^2 \pm 7,8 \times 10^2$	$6,043 \pm 1,688$
Bovin (n = 14)	$8,8 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^3$	$5,415 \pm 2,105$
Cochon (n = 13)	$2,9 \times 10^3 \pm 3,7 \times 10^3$	$5,321 \pm 2,044$
Rat surmulot (n = 4)	$7,8 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^3$	$5,151 \pm 2,512$
Chat (n = 6)	$4,3 \times 10^2 \pm 4,7 \times 10^2$	$4,951 \pm 2,102$
Chien (n = 7)	$1,9 \times 10^3 \pm 3,0 \times 10^3$	$4,949 \pm 3,007$

Les plus grandes moyennes de charge rénale sont observées pour la souris et le rat noir mais les écart-types les plus importants pour les valeurs de charge bactérienne rénale sont aussi observés dans ces deux espèces. Au contraire, les valeurs de charge bactérienne rénale sont relativement homogènes pour les autres espèces (**Figure 28**).

Le test de Fisher-Snedecor de l'analyse de variance montre qu'il n'y a pas d'effet "espèce" sur la charge rénale moyenne ($p > 0,05$).

Néanmoins, pour certaines espèces, les effectifs des animaux positifs sont faibles (rats surmulots $n=4$, chats $n=6$, chiens $n=7$, cerfs $n=6$) et ne permettent peut être pas aux tests statistiques d'être assez puissants pour détecter des différences.

1.5.2. Modélisation

Chez les caprins, porcins et chiens, tous les animaux positifs pour la recherche de leptospires au niveau rénal sont des adultes ; chez les musaraignes, 14/15 animaux porteurs sont adultes ; chez les chats, 3/6 positifs sont des adultes ; tous les cervidés avaient approximativement le même âge ; chez les bovins, les animaux positifs sont surtout des sub-adultes (9/14) (**Annexe I**). Pour ces espèces, on ne peut donc pas tester l'effet de l'âge sur la charge bactérienne rénale. Par contre, sur les 50 rats noirs porteurs de leptospires au niveau rénal, 34 sont des adultes et 16 sont des jeunes ; chez les souris, sur les 11 animaux positifs, 8 sont adultes et 3 sont des jeunes (cette population n'a pas été étudiée à cause de sa faible taille).

Nous avons construit les graphiques de dispersion de la charge bactérienne rénale en fonction du poids pour les adultes et les jeunes rats noirs (**Figure 29**). Nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'une relation linéaire entre la charge bactérienne rénale et le poids, chez les adultes d'une part et chez les jeunes d'autre part :

- Chez les rats noirs adultes, l'équation de la droite de régression est la suivante : $y = 0,029x + 4,324$. L'intervalle de confiance à 95% sur la pente de régression est de $[-0.037 - 0.096]$, indiquant une pente non significativement différente de 0.
- Chez les jeunes rats noirs, l'équation de la droite de régression est la suivante : $y = 0,086x - 1,147$. L'intervalle de confiance à 95% sur la pente de régression est de $[0.018 - 0.154]$, indiquant une pente significativement positive au seuil de 5%.

Chez les rats noirs, la grande variance observée dans les données de charge bactérienne rénale est probablement liée à l'existence d'une corrélation positive entre la charge rénale en bactéries et le poids chez les jeunes. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez les adultes.

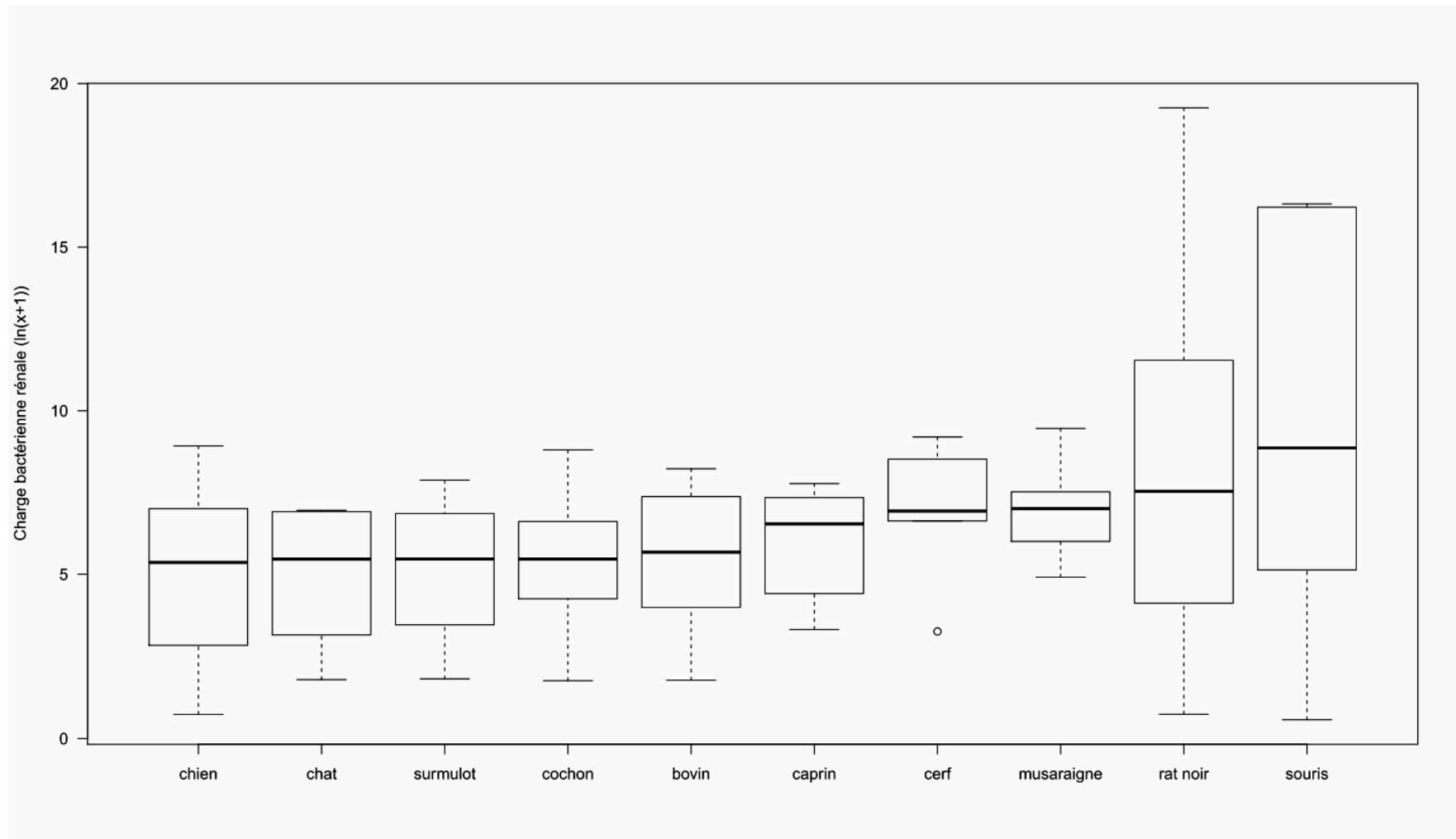


Figure 28 : Cartographie des résultats de charge bactérienne rénale par espèce.

Graphique représentant la médiane (trait gras horizontal) de $\ln(\text{charge bactérienne rénale}+1)$, le premier quartile (limite inférieure du rectangle), le troisième quartile (limite supérieure du rectangle) et l'écart-type (moustache).

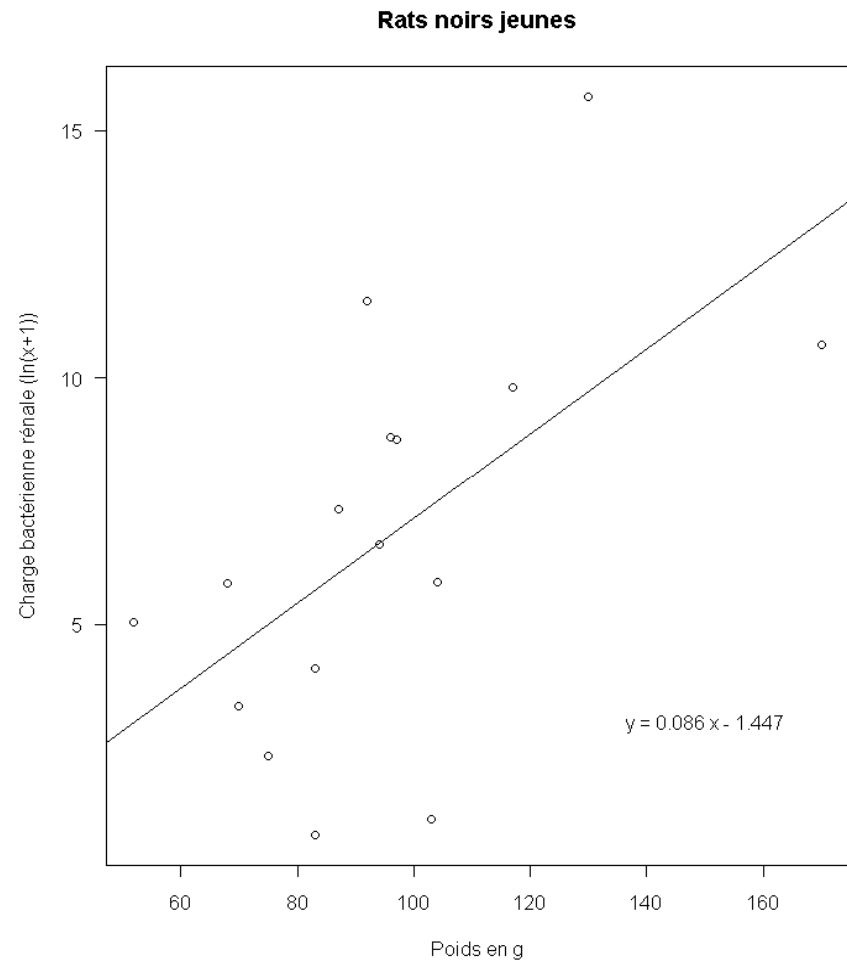
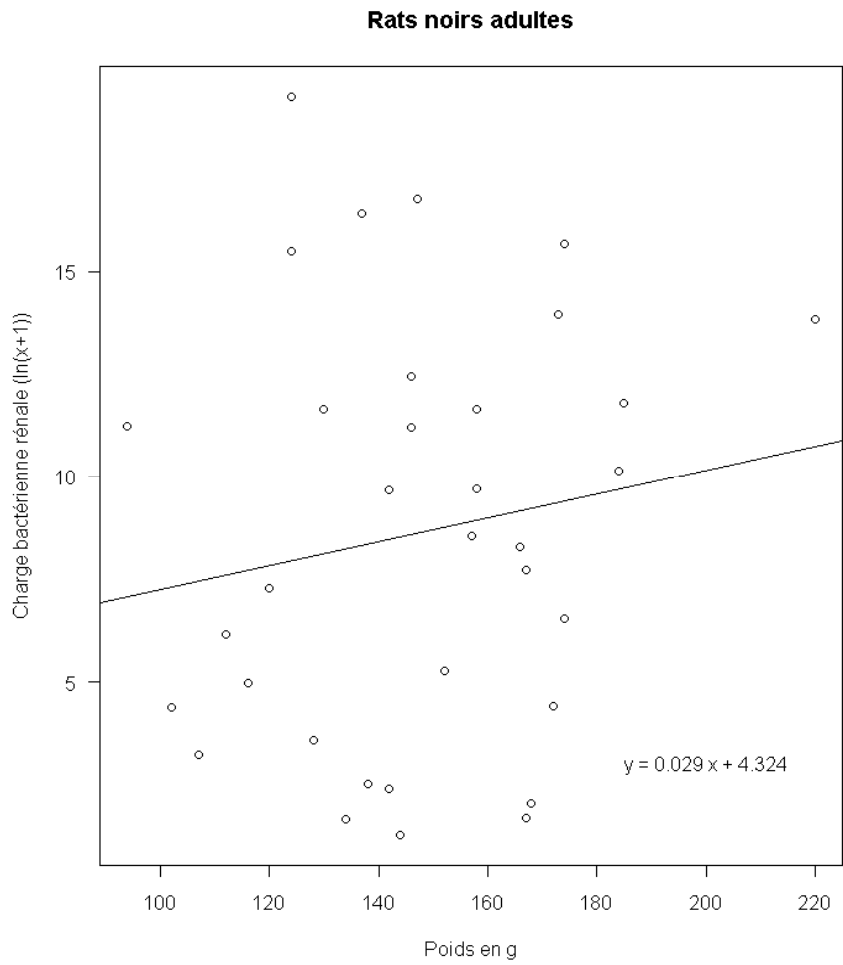


Figure 29 : Poids des rats noirs adultes et jeunes en fonction de la charge bactérienne rénale (ln[x+1]), droite de régression et équation de la droite.

1.6. Facteurs de risque de séropositivité

1.6.1. Tableaux de contingence

Voir **Tableaux 19 à 25**.

Dans les tableaux de contingence, nous n'avons considéré que les qPCR pour lesquelles nous avons un résultat "positif" ou "négatif" (les qPCRs pour lesquelles nous avons détecté la présence d'"inhibiteurs" n'ont pas été prises en compte).

1.6.2. Résultats des analyses statistiques

Aucun facteur de risque parmi ceux testés ne s'est révélé significativement lié à la séropositivité chez les rongeurs, les carnivores errants, les tenrecs, les caprins et les porcins (**Tableau 26**).

1.6.2.1. Bovins

Chez les bovins, plusieurs facteurs de risque ont pu être mis en évidence (**Tableau 26**) :

- Être une femelle est un facteur de risque de séropositivité ($p = 0,009$; OR = 3,67 ; IC 95%¹⁸ [1,37 - 10,16]).
- L'âge (obtenu grâce aux dates de naissance et d'abattage inscrites sur le passeport bovin) est un facteur de risque de séropositivité ($p = 1,6 \times 10^{-4}$; OR = 1,040 ; [1,02 - 1,07]) :
 - o Les bovins adultes (vaches, taureaux) ont plus de chance d'être séropositifs que les veaux ($p = 4,1 \times 10^{-4}$; OR = 24,0 ; [4,82 - 187,07]).
 - o Les bovins sub-adultes (génisses et taurillons) ont plus de chance d'être séropositifs que les veaux ($p = 6,3 \times 10^{-4}$; OR = 15,20 ; [3,86 - 102,03]).
- Les bovins allaitants ont plus de chance d'être séropositifs que les bovins laitiers ($p = 0,006$; OR = 3,77 ; [1,45 - 10,78]).

¹⁸ IC = Intervalle de confiance à 95%.

- Plus le poids du bovin est élevé, plus il a de chance d'être séropositif ($p = 1,3 \times 10^{-6}$; OR = 1,11 ; [1,06 - 1,17]).

L'effet "race" n'a pas été testé chez les bovins car cette variable est liée au type de production.

Chez les bovins, l'association des variables "sexe" et "âge" est celle qui explique le mieux la séropositivité ($p < 0.01$ et $p < 0.001$; OR corrigés 4,47 et 1,01 et IC 95% corrigés [1,46 - 15,25] et [1,00 - 1,02] respectivement).

Dans ce modèle, l'interaction entre les variables "sexe" et "âge" n'est pas significative ($p = 0,7$).

Les tests statistiques montrent a/ que les bovins adultes et sub-adultes ont plus de chance que les jeunes d'être séropositifs, b/ que les bovins femelles ont plus de chance d'être séropositifs que les mâles. Or, chez les bovins, la répartition des âges chez les mâles et les femelles est différente : chez les adultes, il y a plus de femelles que de mâles, et chez les veaux, il y a plus de mâles que de femelles. Nous supposons par conséquent que l'effet du sexe sur la séropositivité des bovins est lié à l'effet de l'âge.

La moyenne pondérale observée pour les bovins femelles est de $269,3 \pm 99,5$ kg, tandis que celle observée chez les bovins mâles est de $236,7 \pm 79,3$ kg (non significativement différent : $t = -1,16$ et IC95% [-88,5 - 23,26] ; $df = 89$; $p\text{-value} = 0,25$). La moyenne pondérale observée pour les bovins laitiers est de $158,0 \pm 79,3$ kg (cette moyenne est "tirée vers le bas" car la plupart des bovins laitiers étudiés sont des veaux "de lait"), tandis que celle observée chez les bovins allaitants est de $310,8 \pm 99,5$ kg. Ces deux moyennes sont statistiquement différentes ($t = 7,8$ et IC95% [114,2 - 94,3] ; $p = 7,3 \times 10^{-12}$).

Il existe donc une liaison entre la variable poids et la variable type de production (allaitant *versus* laitier). Cette donnée devra être prise en compte dans la discussion des résultats d'analyse statistique.

L'analyse statistique montre que la contamination par *Leptospira* se fait généralement à partir de l'âge de 4 mois (âge des veaux "de lait" prélevés dans notre étude), mais qu'elle peut aussi avoir lieu après, entre l'âge de 2 ans (âge des taurillons et génisses) et l'âge adulte. L'infection peut aussi avoir lieu à l'âge adulte.

Plus l'animal vieillit plus la probabilité qu'il ait été en contact avec la bactérie est élevée.

1.6.2.2. Cerfs Rusa

Chez les cerfs, le facteur localisation de l'élevage a une influence sur la séropositivité des animaux, et les analyses statistiques montrent que si l'animal provient de l'élevage du Tampon, il a plus de chance d'être séropositif qu'un animal originaire de l'élevage de Saint-Leu ($p = 0,008$; OR = 7.20 ; [1,64 - 37,87]).

Les conditions d'élevage au Tampon sont peut-être plus favorables à la transmission de la bactérie.

Etant donné que les cerfs proviennent de deux élevages, il est probable que la variable "localisation de l'élevage" se confonde avec la variable "zootechnie" que nous n'avons pas évaluée directement. Nous ne disposons pas d'informations sur les élevages qui nous permettraient de poser des hypothèses quant aux pratiques à risque.

Tableau 19 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les carnivores domestiques.

Variables	Niveaux	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein	
		Chien	Chat	Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	27	22	23	26	31	18	10	29	18	7
	Séropositif	23	8	13	18	25	6	11	14	14	5

Tableau 20 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les rongeurs.

Variables	Niveaux	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein		
		Rat surmulot	Rat noir	Souris	Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	1	14	0	5	10	12	3	6	9	8	6
	Séropositif	6	52	3	27	33	44	17	38	23	16	43

Tableau 21 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les tenrecs.

Variables	Niveaux	Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la qPCR sur rein	
		Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	23	10	19	14	17	16	0	0
	Séropositif	2	3	1	4	4	1	0	0

Tableau 22 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les caprins.

Variables	Niveaux	Sexe		Résultat de la qPCR sur rein	
		Femelles	Mâles	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	21	3	15	21
	Séropositif	30	6	6	7

Tous les caprins prélevés sont des animaux adultes. Il nous manque la localisation de l'élevage pour la majorité des caprins.

Tableau 23 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), le sexe, l'âge, le type d'élevage, le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein et la race chez les bovins.

Variables	Sexe		Age			Type d'élevage		Résultat de la qPCR sur rein		
	Niveaux	Femelle	Mâle	Adulte	Sub-adulte	Juvenile	Allaitant	Laitier	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	10	48	6	20	32	27	31	43	4
	Séropositif	13	17	9	19	2	23	7	18	9

Variables	Race							
	Niveaux	Blonde d'Aquitaine	Brune	Charolaise	Limousine	Croisée	Montbéliarde	Prim'Holstein
Résultat de la sérologie	Séronégatif	1	0	1	9	15	1	30
	Séropositif	0	1	0	10	13	0	6

Tableau 24 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT), la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les cerfs.

Variables	Localisation de l'élevage		Résultat de la qPCR sur rein		
	Niveaux	Ferme du Tampon	Ferme de Saint-Leu	Négatif	Positif
Résultat de la sérologie	Séronégatif	9	4	8	2
	Séropositif	5	16	13	4

Pas d'information sur le sexe et l'âge des cerfs prélevés.

Tableau 25 : Tableau de contingence donnant la relation entre le statut sérologique (déterminé par MAT) et le résultat de la qPCR (visant *lipL32*) sur rein chez les porcins.

Variables	Résultat de la qPCR sur rein		
	Négatif	Positif	
Résultat de la sérologie	Séronégatif	40	4
	Séropositif	30	8

89/90 porcins prélevés sont des truies de réforme adultes.

Tableau 26 : Facteurs de risque de séropositivité (déterminée par MAT) parmi les différentes espèces étudiées à La Réunion (2009).

Espèce (nb testé)	Facteurs de risque épidémiologiques testés	Nb séro-positifs	P	OR brut (IC 95%)	OR corrigé (IC 95%)
Carnivores errants ¹ (n = 80)	Espèce (chien/chat)	23 / 8	0,081		
	Sexe (femelle/mâle)	13 / 18	0,331		
	Age (adulte/juvenile)	25 / 6	0,092		
	Lieu de capture (est/ouest)	11 / 14	0,129		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	14 / 5	0,901		
Rongeurs ² (n = 76)	Espèce (rat surmulot/ rat noir/souris)	6 / 52 / 3	0,460		
	Sexe (femelle/mâle)	27 / 33	0,409		
	Age (adulte/juvenile)	44 / 17	0,526		
	Lieu de capture (est/ouest)	38 / 23	0,119		
	Poids ³		0,743		
Tenrecs (n = 38)	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	16 / 43	0,036*	3,58 [1,08 - 12,49]	
	Sexe (femelle/mâle)	2 / 3	0,204		
	Age (adulte/juvenile)	1 / 4	0,108		
	Lieu de capture (est/ouest)	4 / 1	0,215		
	Poids ³		0,144		
Bovins (n = 88)	Sexe (femelle/mâle)	13 / 17	0,009*	3,670 [1,37 - 10,16]	4,471 [1,457 - 15,250]
	Age (adulte/juvenile)	9 / 2	4,1e-04*	24,00 [4,82 - 187,08]	ns
	Age (sub-adulte/juvenile)	19 / 2	6,3e-04*	15,20 [3,86 - 102,03]	ns
	Age exact ³		1,6e-04*	1,040 [1,02 - 1,07]	ns
	Poids ³		1,3e-06*	1,111 [1,06 - 1,14]	1,012 [1,006 - 1,019]
	Type (allaitant/laitier)	23 / 7	0,006*	3,772 [1,45 - 10,78]	ns
	Nombre de ferme(s) fréquentées ³		0,745		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	18 / 9	0,008*	5,37 [1,54 - 21,99]	
Caprins (n = 60)	Sexe	30 / 6	0,655		
	Poids ³		0,604		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)		0,779		
Porcins ⁴ (n = 89)	Poids ³		0,172		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	14 / 5	0,081		
Cerf Rusa ⁵ (n = 34)	Lieu d'élevage (Tampon/St-Leu)	5 / 16	0,008*	7,20 [1,638 - 37,872]	
	Poids ³		0,341		
	Résultat de la PCR sur rein (neg/pos)	13 / 4	0,830		

¹ Chiens et chats.² Rats noirs, rats surmulot, et souris.³ Variable continue (pas de table de contingence).⁴ 89/90 porcins échantillonnés étaient des truies de réformes.⁵ Pas d'information sur le sexe et l'âge disponibles.

1.7. Facteurs de risque de portage rénal

1.7.1. Tableaux de contingence

Voir **Tableaux 27 à 32**.

1.7.2. Résultats des analyses statistiques

Aucun facteur de risque parmi ceux testés ne s'est révélé statistiquement significatif pour expliquer le portage rénal chez les rongeurs, les carnivores errants, les musaraignes, les caprins, et les porcins (**Tableau 33**).

Chez les bovins, les résultats de l'analyse montrent que (**Tableau 33**) :

- Plus un bovin est lourd, plus il a de chance d'être porteur rénal ($p = 0,002$; OR = 1,09 ; IC 95% [1,03 – 1,18]. La variable poids est directement corrélée à l'âge ou à la catégorie d'âge, néanmoins, aucun lien n'a pu être mis en évidence entre les facteurs de risque "âge exact" et "catégorie d'âge" et le portage rénal de *Leptospira*.
- Un bovin allaitant a plus de chance d'être porteur rénal qu'un bovin laitier ($p = 0,015$; OR = 5,45 ; [1,34 - 36,92]).

Par ailleurs, nous avons vu auparavant que les bovins allaitants avaient en moyenne un poids supérieur aux bovins laitiers et que ces deux variables étaient liées. Il convient donc d'interpréter avec prudence les effets "type de production" et "poids" car on ne peut pas différencier lequel a un effet véritable sur le portage rénal ou si les deux sont effectivement des facteurs de risque.

Chez les cerfs, plus un animal est léger, plus il a de chance d'être porteur rénal ($p = 0,015$; OR = 0,69 ; [0,47 – 0,94], **Tableau 33**).

1.7.3. Lien entre séropositivité et portage rénal

Chez les rongeurs et les bovins, nous mettons en évidence une relation significative entre l'infection rénale et la séropositivité (**Tableau 26**) :

- Un rongeur a 3,58 (OR) fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,036$; IC 95% [1,08 - 12,49]).
- Un bovin a 5,37 fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,008$; IC 95% [1,54 - 21,99]).

Cette relation entre séropositivité et portage rénal de *Leptospira* n'a pas été mise en évidence chez les autres espèces animales étudiées.

Tableau 27 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les carnivores domestiques.

Variables	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la sérologie		
	Niveaux	Chien	Chat	Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	17	15	17	15	20	12	8	17	18	14
	Positif	7	6	8	5	10	3	3	6	7	5

Tableau 28 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), l'espèce, le sexe, l'âge, le lieu de capture et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les rongeurs.

Variables	Espèce		Sexe		Age		Lieu de capture		Résultat de la sérologie			
	Niveaux	Rat surmulot	Rat noir	Souris	Femelle	Mâle	Adulte	Juvenile	Est	Ouest	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	2	26	2	10	20	18	12	17	13	8	16
	Positif	4	50	11	29	35	45	20	33	32	6	43

Tableau 29 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), le sexe, l'âge et le lieu de capture pour les musaraignes.

Variables	Sexe		Age		Lieu de capture		
	Niveaux	Femelles	Mâles	Adultes	Juveniles	Est	Ouest
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	17	16	26	7	11	22
	Positif	9	6	14	1	8	7

Tableau 30 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), le sexe, l'âge, e type d'élevage, la localisation du dernier élevage, le résultat de la sérologie (par MAT) et la race pour les bovins.

Variables	Sexe		Age			Type d'élevage		Résultat de la sérologie		
	Niveaux	Femelle	Mâle	Adulte	Sub-adulte	Juvenile	Allaitant	Laitier	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	17	46	10	28	25	33	30	43	18
	Positif	3	11	3	9	2	12	2	4	9

Variables	Race							
	Niveaux	Blonde d'Aquitaine	Brune	Charolaise	Limousine	Croisée	Montbelliarde	Prim'Holstein
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	1	1	1	10	20	1	28
	Positif	0	0	0	6	6	0	2

Tableau 31 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), le sexe et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les caprins.

Variables	Sexe		Résultat de la sérologie		
	Niveaux	Femelle	Mâle	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	28	8	15	6
	Positif	12	1	21	7

Tous les caprins prélevés sont des animaux adultes. Il nous manque la localisation de l'élevage pour la majorité des caprins.

Tableau 32 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR visant *lipL32*), la localisation de l'élevage d'origine et le résultat de la sérologie (par MAT) pour les cerfs.

Variables	Localisation de l'élevage		Résultat de la sérologie		
	Niveaux	Ferme du Tampon	Ferme de Saint-Leu	Séronégatif	Séropositif
Résultat de la qPCR sur rein	Négatif	13	13	8	13
	Positif	2	4	2	4

Pas d'information sur le sexe et l'âge des cerfs prélevés.

Tableau 33 : Facteurs de risque d'infection rénale par *Leptospira* (déterminée par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) parmi les différentes espèces étudiées.

Espèce (nb testé)	Facteurs de risque épidémiologiques testés	Nb qPCR sur rein positifs	p	OR brut (IC 95%)	OR corrigé (IC 95%)
Carnivores errants ¹ (n = 45)	Espèce (chien/chat)	7 / 6	0,965		
	Sexe (femelle/mâle)	8 / 5	0,605		
	Age (adulte/juvenile)	10 / 3	0,342		
	Lieu de capture (est/ouest)	3 / 6	0,941		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	7 / 5	0,901		
Rongeurs ² (n = 95)	Espèce (rat surmulot/ rat noir/souris)	4 / 50 / 11	0,359		
	Sexe (femelle/mâle)	29 / 35	0,268		
	Age (adulte/juvenile)	45 / 20	0,379		
	Lieu de capture (est/ouest)	33 / 32	0,592		
	Poids ³		0,695		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	6 / 43	0,036*	3,58 [1,08-12,49]	
Musaraignes (n = 48)	Sexe (femelle/mâle)	9 / 6	0,583		
	Age (adulte/juvenile)	14 / 1	0,179		
	Lieu de capture (est/ouest)	8 / 7	0,191		
	Poids ³	0,191	0,425		
Bovins (n = 77)	Sexe (femelle/mâle)	3 / 11	0,663		ns
	Age (adulte/juvenile)	10 / 25	0,180		ns
	Age (sub-adulte/juvenile)	9 / 2	0,093		ns
	Age exact ³		0,162		ns
	Poids ³	12 / 2	0,002*	1,09 [1,03 - 1,18]	1,009 [1,00 - 1,01]
	Type (allaitant/laitier)	12 / 2	0,015*	5,45 [1,34 - 36,92]	ns
	Nombre de ferme(s) fréquentées ^c		0,745		ns
Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	4 / 9	0,008*	5,37 [1,542 - 21,990]	ns	
Chèvres ⁴ (n = 49)	Sexe	12 / 1	0,213		
	Poids ³		0,673		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)		0,779		
Porcins ⁵ (n = 83)	Poids ³		0,960		
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	4 / 8	0,125		
Cerf Rusa ⁶ (n = 32)	Lieu d'élevage (Tampon/St-Leu)	5 / 16	0,456		
	Poids ³		0,015*	0,69 [0,47 - 0,94]	
	Résultat de la sérologie (séronég/séropos)	2 / 4	0,830		

¹ Chiens et chats.

² Rats noirs, rats surmulot, et souris.

³ Variable continue (pas de table de contingence).

⁴ Pas d'informations sur la localisation de l'élevage d'origine.

⁵ 89/90 porcins échantillonnés étaient des truies de réformes.

⁶ Pas d'information sur le sexe et l'âge disponibles.

1.8. Analyses par bandelettes urinaires

1.8.1. Tableaux de contingence

Nous avons des résultats de qPCR sur rein et d'analyses urinaires pour quatre espèces : le rat noir, le chien, le chat et le tangué.

La densité de l'urine et son pH n'ont pas été pris en compte car il existe pour ces deux paramètres une variabilité inter-espèce et les valeurs de référence ne sont pas connues pour toutes les espèces étudiées.

Aucun animal ne présentait de glycosurie.

Tableau 34 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et l'espèce pour les quatre espèces étudiées.

Résultat de la qPCR sur rein	Espèce				p-value
	Rat noir	Chat	Chien	Tangué	
Négatif	6	11	13	31	3.5x10 ^{-07*}
Positif	11	1	7	0	

Tableau 35 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et la présence d'une hématurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Hématurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	32	12	0	2	14	1	0,41
Positif	6	5	0	2	6	0	

Tableau 36 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et la présence d'une cétonurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Cétonurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	52	4	0	1	0	4	0,03*
Positif	11	1	2	1	1	3	

Tableau 37 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et la présence de nitrites dans les urines, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Nitrites			p-value
	Absence	Traces	+	
Négatif	60	0	1	0,46
Positif	19	0	0	

Tableau 38 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et la présence d'une leucocyturie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Leucocyturie				p-value
	Absence	Traces	+	++	
Négatif	51	0	7	3	0,11
Positif	14	2	2	1	

Tableau 39 : Tableau de contingence donnant la relation entre le portage rénal (déterminé par qPCR sur rein visant le gène *lipL32*) et la présence d'une protéinurie, évaluée par analyse semi-quantitative (pour les quatre espèces confondues).

Résultat de la qPCR sur rein	Protéinurie						p-value
	Absence	Traces	+	++	+++	++++	
Négatif	8	12	26	7	6	2	0,01*
Positif	4	0	6	4	1	4	

1.8.2. Résultats des analyses statistiques

L'analyse statistique de la variable "espèce" montre que le rat noir a plus de chance d'être porteur rénal que les trois autres espèces considérées ($p = 3.5 \times 10^{-7}$).

Deux paramètres urinaires sont statistiquement liés à la présence de leptospires au niveau rénal pour les quatre espèces considérées simultanément : la protéinurie ($p = 0,01$) et la cétonurie ($p = 0,03$).

2. Discussion sur l'épidémiologie et l'écologie de la leptospirose animale à La Réunion

2.1. Espèces hôtes de *Leptospira*

Les remarques suivantes, communes à toutes les espèces, ne seront pas reprises par la suite :

1/ Pour un même sérum, l'observation d'agglutinations significatives pour plusieurs sérogroupes (sérologie "non déterminée") est un résultat difficilement interprétable puisque nous ne pouvons pas déterminer si ces différents anticorps sont le résultat des réponses immunitaires à des infections passées ou récentes ou alors le résultat de réactions croisées. Ainsi, pour déterminer le véritable statut sérologique des animaux, il aurait été nécessaire d'utiliser des sérums pairés, prélevés à 5-10 jours d'intervalle [13], ce qui se révèle impossible pour les micromammifères, et difficile à mettre en œuvre pour les animaux de rente et les animaux errants.

2/ La présence de *Leptospira* dans les reins des animaux est la preuve que l'animal est infecté au moment du prélèvement (avec ou sans symptôme) mais ne démontre pas que cet animal est excréteur (intermittent ou continu) de la bactérie. La notion de "réservoir" [472], qui induit une notion de chronicité de l'infection, pourra être avancée en considérant, à l'échelle d'une population animale, les résultats de séroprévalence, de prévalence du portage rénal et d'excrétion urinaire [328].

3/ L'absence de détection de *Leptospira* dans l'urine des animaux identifiés comme porteurs au niveau rénal trouve deux explications :

- La discontinuité de l'excrétion urinaire [9, 13],
- Une concentration faible de bactéries dans les urines, c'est-à-dire en dessous du seuil de détection de la qPCR.

Ces deux hypothèses sont valables pour toutes les espèces et nous ne les reprendrons donc pas par la suite.

4/ Les anticorps circulant ne correspondent pas toujours à la souche présente dans les reins [294], c'est pourquoi les résultats du MAT sont à considérer avec précautions : le résultat sérologique d'un animal porteur rénal ne permet pas d'affirmer avec certitude l'identité du

sérogroupe excrété. Néanmoins, les résultats de sérologie ont un fort pouvoir prédictif à l'échelle de la population pour déterminer les sérogroupe y circulant majoritairement.

2.1.1. Rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) et souris domestiques (*Mus musculus*)

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux I à III)

Rats noirs

Séroprévalence : 52/66 (78,8%)

Prévalence du portage rénal : 50/76 (62,5%)

Charge bactérienne rénale : $5,7 \times 10^6$ ($\pm 3,3 \times 10^7$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 12/36 (33,3%)

Rats surmulots

Séroprévalence : 6/7 (85,7%)

Prévalence du portage rénal : 4/6 (66,6%)

Charge bactérienne rénale : $7,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 1/2 (50%)

Souris domestiques

Séroprévalence : 3/3 (100%)

Prévalence du portage rénal : 11/13 (84,6%)

Charge bactérienne rénale : $6,4 \times 10^6$ ($\pm 8,5 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 2/5 (40%)

Le rat noir, *R. rattus*, et le rat surmulot, *R. norvegicus*, sont des généralistes, omnivores manifestant de grandes capacités d'adaptation [470]. Par ailleurs, à La Réunion (comme à Mayotte) ces rats n'ont que peu de prédateurs [470]. La souris domestique est une espèce commensale de l'homme. Elle vit dans les maisons, les champs cultivés et s'éloigne généralement peu des zones anthropisées. Les populations de rongeurs fluctuent de façon saisonnière au cours de l'année [473], sous la pression de facteurs extrinsèques, tels que la disponibilité en nourriture, l'effet de pathogènes, ou la présence de prédateurs (busard de Maillard, chat, chien et Homme à La Réunion) [473, 474]. Ces rongeurs allochtones sont réputés anthropophiles mais tout à fait susceptibles de coloniser les milieux naturels [475]. A La Réunion, l'espèce de rongeur dominante est *R. rattus*. Ces trois espèces de rongeurs se reproduisent toute l'année en milieu insulaire tropical [474, 476], en Martinique et Guadeloupe il y a une très nette baisse des naissances chez *Rattus* sp. pendant 3 mois et deux pics de mises bas (*Michel Pascal, communication personnelle*). En milieu naturel, la durée de vie estimée de *Rattus* sp. est d'1-2 ans [476], celle de *Mus* sp. ne dépasse pas 18 mois [477].

La population de rats à La Réunion est très dense. La seule estimation de densité connue est celle effectuée en 2010-2011 par la Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR) sur le massif de la Roche Ecrite : l'étude conduite sur un protocole de

captures-recaptures estime la densité de rats entre 21 et 54 individus/ha sur l'ensemble du massif forestier de la Roche Ecrite [478]. À supposer que cette densité soit la même sur l'ensemble de l'île de La Réunion l'effectif de la population insulaire de rat noir s'élèverait à 5 271 000 – 13 554 000 individus !!

Une étude de terrain a montré qu'aux Antilles françaises les trois espèces de rongeurs, *R. rattus*, *R. norvegicus* et *M. musculus*, se répartissent en fonction des écosystèmes disponibles sur l'île. L'étude montre que les parcelles cultivées jouent le rôle de réservoirs pour la souris domestique alors que les "savanes" (formations à épineux) et la forêt tropicale humide jouent ce rôle à l'égard du rat noir. De plus, l'écotone que constituent les bordures des parcelles cultivées favorisent les déplacements des deux espèces de *Rattus* et permettent l'installation du rat surmulot [475]. Cette répartition des espèces en fonction de l'habitat pourrait entraîner une variation du risque de contamination par *Leptospira* en fonction de l'écosystème considéré.

Les rongeurs (rats noirs, rats surmulots et souris) sont les espèces hôtes chez lesquelles nous avons retrouvé la plus forte séroprévalence et le taux de portage rénal le plus élevé. Les rongeurs sont résistants à l'infection par *Leptospira* et sont des porteurs chroniques de la bactérie [479, 480]. La densité de leur population, leur répartition sur l'ensemble de l'île et les taux de séroprévalence et de portage rénal observés font de ces petits mammifères les hôtes principaux de *Leptospira* à La Réunion.

Nous montrons que chez les rongeurs, la séropositivité est significativement corrélée au portage rénal (OR = 3,58), ce qui suggère que les recontaminations (par une même souche ou par différentes souches de *Leptospira*) sont fréquentes et stimulent de façon continue la synthèse d'anticorps. Ces ré-infections se font à partir de l'environnement ou directement par le biais des contacts sociaux [481].

Les titrés élevés de séropositivité (jusqu'à 3200) et la corrélation positive séropositivité/portage rénal laissent penser que les réinfections sont fréquentes chez les rats.

Nous montrons qu'à La Réunion 73,6% des sérums de *R. rattus* ont des anticorps contre le séro-groupe Icterohaemorrhagiae (déterminé par MAT), 32,1% des sérums de *R. rattus* et 50% des sérums de *R. norvegicus* en montrent une pour Canicola, et enfin, 18,9% des sérums de *R. rattus* montrent une agglutination pour Sejroe. Tous les autres séro-groupe

testés par MAT ont été retrouvés chez *R. rattus* mais sont probablement le résultat de réactions de co-agglutinations. Seules trois souris ont fait l'objet d'examen sérologiques toutes trois présentant des anticorps contre le séro-groupe Icterohaemorrhagiae, dont une souris à un titre de 3200. Ces résultats sont très similaires à ceux publiés dans d'autres régions du monde qui montrent que les rats sont généralement porteurs des sérovirs Copenhagener et Icterohaemorrhagiae, mais peuvent occasionnellement être porteurs d'autres sérovirs [281, 322, 443, 482-485].

Le séro-groupe Icterohaemorrhagiae est le séro-groupe majoritaire circulant chez les rongeurs à La Réunion. C'est aussi le séro-groupe responsable de la majorité des infections cliniques en population humaine réunionnaise.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que *Canicola* circule chez les deux espèces de rats à La Réunion. Sur l'île voisine de Madagascar, *R. rattus* et *R. norvegicus* sont réservoirs du séro-groupe *Canicola* [485] et il est donc possible que ce aussi soit le cas à La Réunion.

Sejroe est le principal séro-groupe retrouvé chez les bovins à La Réunion. Parmi nos sites de capture un seul présentait un petit élevage de bovins allaitants composé d'une dizaine d'animaux (site de Takamaka, situé dans les hauts de Saint-Benoît). Nous remarquons que mis à part un rat noir capturé à Saint-Paul, tous les rats noirs séropositifs pour le séro-groupe Sejroe provenaient du site de Takamaka. De plus, parmi les trois rats surmulots capturés sur ce secteur (tous séropositifs), deux présentaient des anticorps contre le séro-groupe Sejroe. Nous n'avons pas de résultat sérologique pour les souris et musaraignes capturées sur ce site, ni pour les bovins présents au moment des captures de micromammifères. Le rat est considéré comme une source de contamination pour les bovins dans de nombreuses régions du monde [380, 486]. Nous pouvons par conséquent suspecter que sur le site de Takamaka, la présence d'anticorps dirigés contre Sejroe chez ces rats est liée à l'existence d'un cycle de transmission rats-bovins. Nous concluons qu'à La Réunion, le rat noir et le rat surmulot sont probablement des sources d'infection pour les bovins et des vecteurs transportant les bactéries entre les élevages.

Nous montrons que 36,5% des rats noirs séropositifs le sont pour plus d'un séro-groupe. Ce pourcentage s'élève à 22,4% dans l'étude de Villanueva *et al.* [294], conduite sur des rats capturés sur le terrain aux Philippines. Pour certains de ces animaux, ces agglutinations

multiples reflètent des infections multiples par différents sérogroupes, mais pour d'autres, il s'agit de réactions non spécifiques [294]. Il ne nous est pas possible de discerner les deux.

Le taux de portage rénal est de 62,5% et 66,6% chez le rat noir et le rat surmulot respectivement, ce qui est supérieur à la prévalence rapportée à Iquitos (Pérou) où 21,7% des *R. norvegicus* ($n=83$) et 4,6% des *R. rattus* ($n=151$) sont porteurs de leptospires [487], à celle rapportée aux Philippines où 43% des rats ($n=106$) ont été démontré porteurs de leptospires [294], ou à Madagascar où Rahelinirina *et al.* [485] rapportent 48,9% ($n=94$) et 30,8% ($n=55$) de porteurs chez *R. norvegicus* et *R. rattus* respectivement. Notre prévalence est néanmoins inférieure à celle estimée dans la population de rats de Détroit (91,9% de porteurs, $n=358$) [322] ou dans la ville de Salvador (Brésil), où la prévalence du portage rénal chez *R. norvegicus* est estimée à 80,3% ($n=142$) [323].

De plus, nous avons mis en évidence l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez 12/36 (33,3%) *R. rattus* et 1/2 *R. norvegicus*. Parmi ces animaux, dix seulement étaient porteurs et excréteurs, tandis que pour trois rats excréteurs urinaires nous n'avions pas de prélèvement de tissu rénal analysable (présence d'inhibiteurs de PCR). Comme le montrent d'autres études, il n'y a pas d'association claire entre portage rénal et excrétion urinaire [328]. Des analyses complémentaires de génotypage sont en cours afin de déterminer si, pour chaque animal, la souche présente au niveau rénal est la même que celle détectée dans les urines.

Chez la souris le taux de portage rénal est de 84,6% et nous avons mis en évidence l'excrétion urinaire de leptospires chez 2/5 souris. La prévalence du portage rénal chez *M. musculus* à La Réunion est très supérieure à celle estimée dans d'autres études chez la même espèce : 9,1% à Madagascar ($n=55$) [485] ou 44% ($n=43$) en Argentine [488]. Cependant, la prévalence de l'infection rénale à La Réunion est similaire à celle rapportée dans une étude conduite sur l'île de Terceira (Açores) où 85,4% ($n=41$) des souris domestiques portaient des leptospires au niveau rénal [292].

Presque deux tiers des rats de notre enquête et presque 85% des souris étaient porteurs de leptospires au niveau rénal. Les rongeurs sont résistants à l'infection par *Leptospira* [289, 489], à La Réunion ces animaux sont réservoirs de leptospirose et contaminent l'environnement *via* leurs urines, de façon intermittente ou chronique.

Nous observons que la charge bactérienne est très variable en fonction des individus (cf. écart-types très élevés). La concentration de leptospires dans les reins a été estimée en moyenne à $5,7 \times 10^6$ ($\pm 3,3 \times 10^7$) copies de génome/mg de rein chez *R. rattus*, $7,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein chez *R. norvegicus* et $6,4 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^3$ copies de génome/mg de rein chez *M. musculus*. Nous n'avons pas établi de différence statistique entre ces trois moyennes, ou avec celles estimées chez les autres espèces (voir **Chapitre VI, section 1.5**).

Une fois contaminés, les rongeurs peuvent excréter la bactérie et contaminer l'environnement pendant plusieurs mois [325]. La concentration de leptospires dans les urines 28 jours post-infection chez le rat de laboratoire de type "Dawley" (*R. norvegicus*) a été évaluée autour de 10^7 bactéries/ml [289], démontrant la grande capacité de contamination du milieu par cette espèce.

Compte-tenu de la densité de sa population, de sa distribution dans tous les milieux de l'île, de la forte prévalence du portage rénal rapporté pour cette espèce, et compte-tenu qu'il semble être un réservoir important du séro groupe Icterohaemorrhagiae, le rat noir semble être, à La Réunion, l'espèce de micromammifère qui contribue le plus à la contamination de l'environnement, donc de l'Homme.

Bien que discrète, la souris est présente dans la majorité des habitats de l'île [75]. L'importance potentielle de la souris dans l'épidémiologie de la leptospirose a été mise en évidence dans de nombreuses autres régions du monde, comme à Madagascar [485], au Brésil [484, 490], en Argentine [488], sur l'île de Terceira (Açores, Portugal) [292], à la Barbade [299], au Colorado [491], en Croatie [297], en Guadeloupe [283, 475]...

Espèce trop souvent négligée dans les campagnes de lutte contre la maladie, la souris domestique doit être considérée comme un hôte réservoir de *Leptospira* à La Réunion.

Nous n'observons pas dans notre étude de différence significative de séroprévalence ou de prévalence de portage rénal en fonction de l'âge, du sexe ou de la zone de vie (est ou ouest) chez les rongeurs. Au contraire, chez certaines espèces vivant en zone tempérée, comme les opossums en Nouvelle-Zélande (*Trichosurus vulpecula*), la transmission est dépendante des contacts sociaux entre les individus et intervient par conséquent

préférentiellement à l'âge adulte [481]. Aux Açores, le sexe des rongeurs n'a pas d'influence sur leur statut vis-à-vis de la leptospirose [492] et chez *R. rattus* et *R. norvegicus*, l'âge n'a pas d'influence sur la séroprévalence ou le statut de porteur rénal. Néanmoins, chez les souris l'âge a un effet significatif sur la prévalence du portage rénal qui est supérieure chez les souris adultes [492]. Dans leurs études, Mohamed-Hassan *et al.* [493] et Vanasco *et al.* [488] concluent que la prévalence de la leptospirose est plus importante chez les rats mâles que chez les femelles respectivement dans les régions de Kelantan et Terengganu (Malaisie) et en Argentine.

Plusieurs conclusions sont à tirer sur la situation réunionnaise :

- La contamination chez les rongeurs se fait tôt [322] et la probabilité de contact avec la bactérie est identique chez les adultes et chez les jeunes ;
- La contamination est la même chez les mâles et chez les femelles ;
- Le lieu de vie, donc la pluviométrie, n'intervient pas sur la probabilité de contamination chez ces rongeurs.

Chez les rats mâles ou femelles, lors des combats pour le territoire, la dominance ou la reproduction [494], les animaux se font des plaies et urinent, ainsi, les comportements d'agression sont des facteurs favorisant la transmission directe de la leptospirose dans la population de rongeurs.

Par conséquent, chez les rongeurs, le mode de transmission direct semble majoritaire par rapport à la contamination indirecte.

2.1.2. Insectivores : musaraigne musquée (*Suncus murinus*) et tangué (*Tenrec ecaudatus*)

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux IV et V)

Musaraignes

Séroprévalence : 2/3 (66,6%)

Prévalence du portage rénal : 15/48 (31,25%)

Charge bactérienne rénale : $2,1 \times 10^3$ ($\pm 3,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/22

Tenrecs

Séroprévalence : 5/38 (13,2%)

Prévalence du portage rénal : 0/34

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/33

Avec un taux de portage rénal estimé à 31,2% et une charge bactérienne moyenne de $2,1 \times 10^3$ ($\pm 3,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein, la musaraigne musquée semble représenter une espèce hôte de choix pour *Leptospira* à La Réunion.

Le rôle épidémiologique de cet insectivore a déjà été mis en évidence dans d'autres régions, notamment en Thaïlande [495] et à Madagascar, où le taux de portage rénal a été évalué à 43,5% [485].

Cette espèce est retrouvée en milieux forestiers, aussi bien qu'agricoles et anthropisés. Elle peut rentrer dans les habitations [496]. Sa reproduction a lieu toute l'année. La gestation est d'environ 30 jours et l'effectif de la portée varie de 4 à 8 petits. La maturité sexuelle est atteinte vers 35 jours chez la femelle. Les populations de *S. murinus* peuvent atteindre des effectifs élevés, l'espèce est très adaptable à différents écosystèmes.

A La Réunion, la musaraigne, appelée localement "rat musqué", est présente dans la majorité des habitats réunionnais (*observations personnelles*). La densité de sa population, méconnue, est probablement importante. Cette espèce, commensale de l'homme, peu considérée dans l'épidémiologie de la leptospirose, devra être prise en compte dans l'organisation de la lutte contre cette zoonose sur l'île.

A l'inverse, le tenrec, chez qui aucun portage rénal ni excrétion urinaire n'ont pu être mis en évidence, ne semble pas constituer un hôte significatif de la bactérie. Pourtant, les tenrecs sont sympatriques des rats, musaraignes, voire des chiens errants, dans les zones rurales et dans les forêts. Leur milieu de vie est donc contaminé par l'urine des animaux réservoirs et excréteurs de *Leptospira*. Des sérologies positives ayant été établies chez des tenrecs examinés à l'occasion de cette étude et au cours d'une étude antérieure [78] (voir article en **Annexe K**), on peut affirmer que cette espèce peut être contaminée par *Leptospira*, qu'elle développe une réaction immunitaire à son égard, mais que les souches contaminantes ne s'installent pas durablement au niveau rénal. Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- L'infection est létale chez les tenrecs et peu d'individus survivent à l'infection ;
- La réponse immunitaire chez le tenrec permet l'élimination complète des leptospires et empêche la colonisation rénale ;
- Les souches de *Leptospira* circulant actuellement à La Réunion pourraient-elles ne pas être adaptées à l'hôte *T. ecaudatus* ?

2.1.3. Chiens et chats errants

Rappel des résultats (Annexe I, Tableaux VI et VII)

Chiens

Séroprévalence : 23/50 (46,0%)

Prévalence du portage rénal : 7/24 (29,2%)

Charge bactérienne rénale : $1,9 \times 10^3 (\pm 3,0 \times 10^3)$ copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 2/27 (7,4%)

Chats

Séroprévalence : 8/30 (26,7%)

Prévalence du portage rénal : 6/24 (25,0%)

Charge bactérienne rénale : $4,3 \times 10^2 (\pm 4,7 \times 10^2)$ copies de génome/mg de rein

Prévalence de l'excrétion urinaire : 0/18

Les chiens errants sont considérés comme non vaccinés, les anticorps mis en évidence résultent donc d'infection naturelle. Il n'existe pas de vaccin chez le chat.

Notre étude montre une séroprévalence de 46% chez les chiens errants, proche de celle estimée en 1979 (41%) par Moutou [75]. Nos résultats confirment donc ceux de Moutou [75] en montrant que la majorité des anticorps agglutinants chez le chien est dirigée contre le séro groupe Canicola (43,5% des chiens séropositifs), suivi d'Icterohaemorrhagiae (21,7% des séropositifs). La séroprévalence trouvée chez les chiens errants à La Réunion est similaire à celle estimée dans d'autres zones tropicales et les séro groupes mis en évidence sont ceux généralement retrouvés chez le chien dans les autres régions du monde : dans la population de chiens errants à Ankara (Turquie), la séroprévalence a été estimée à 44% ($n=116$) [497] ; dans le milieu des années 80, Brethes *et al.* [498] rapportent une séroprévalence de 59,2% ($n=53$) chez les chiens en Nouvelle-Calédonie¹⁹ et 39,6% des réactions séropositives sont dirigées contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae ; dans la ville de Merida Yucatan (Mexique), la séroprévalence de la leptospirose a été évaluée à 35% ($n=400$), avec pour principaux séro groupes circulant Canicola (65% des séropositifs) et Icterohaemorrhagiae (11,4%) [499].

Nous avons mis en évidence que tous les chiens séropositifs pour le séro groupe Canicola présentaient des titres ≤ 800 , probablement témoins d'une infection ancienne [141, 227, 500]. Parmi les cinq chiens séropositifs pour le séro groupe Icterohaemorrhagiae, deux présentaient un titre de 1600, pouvant être associé à une infection en cours ou récente [141,

¹⁹ Île où l'incidence de la maladie chez l'Homme est élevée, avec 70,25 cas pour 100 000 habitants en 2009.

227, 500]. Les autres sérogroupes circulant chez les chiens étaient Sejroe, Panama, Tarassovi et Ballum, avec des titres faibles (≤ 400).

A La Réunion, la circulation chez les chiens errants de sérogroupes non inclus dans le vaccin bivalent disponible en France²⁰ laisse supposer la transmission possible de *Leptospira* pathogènes chez les canidés, contre lesquelles les animaux domestiques ne sont pas vaccinés.

Comme cela a été démontré dans d'autres régions du monde [307, 308, 310, 311, 315, 318, 441], à La Réunion, le chien semble être un réservoir de *Leptospira*, notamment du séro groupe Canicola et Icterohaemorrhagiae, pouvant être à l'origine de la contamination de l'Homme, principalement par voie indirecte.

Nous montrons que la séroprévalence chez les chats est moins élevée que celle observée dans l'espèce canine, avec 26,7% de séropositifs. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de sérogroupes majoritaires chez les chats car les réactions sérologiques à plusieurs sérogroupes (co-agglutinations non spécifiques ou réactions croisées) sont les plus fréquentes (7/8 des chats séropositifs, alors qu'au contraire chez les chiens errants, nous n'avons pas observé de réactions de coagglutination). Chez les chats, nous montrons que les titres en anticorps sont faibles (100 à 400) ce qui peut signifier qu'il s'agit d'infections anciennes.

Le rôle épidémiologique du chat dans la transmission de la leptospirose a été peu étudié et reste très controversé [309, 349, 351, 354, 501]. Les résultats du MAT montrent que 13,6% ($n=53$) des chats en Espagne sont séropositifs pour les sérogroupes Ballum ou Icterohaemorrhagiae (au seuil 1:100) [502], tandis que 9,2% ($n=87$) des chats étaient séropositifs en Ecosse [353]. En Iran la séroprévalence de la leptospirose a été évaluée à 27% ($n=111$) chez des chats errants et domestiques, avec des taux d'anticorps allant de 100 à 600 [350]. Les sérogroupes Canicola et Pomona sont retrouvés par MAT chez les chats errants, tandis que les sérogroupes Sejroe (sérovar Hardjo), Icterohaemorrhagiae et Grippytyphosa sont retrouvés chez les chats domestiques [350]. En Egypte [351] l'étude sérologique porte sur seulement deux chats et montre la présence d'agglutinations chez l'un d'eux avec les titres suivants : Grippytyphosa (3200), Hardjo (400), Patoc (200) et Canicola (100). Enfin, aux Philippines, en 1971, un *Leptospira* du séro groupe Grippytyphosa a été isolé à partir d'urines

²⁰ Ce vaccin bivalent protège contre les sérogroupes Icterohaemorrhagie et Canicola.

d'un chat présentant des signes cliniques d'infection et la sérologie a montré la présence d'anticorps contre ce sérotype (titre 800) chez cet animal [349].

Ces différentes études montrent 1/ une grande variabilité dans les sérotypes circulant chez les chats, 2/ que les titres en anticorps sont généralement peu élevés, et 3/ l'infection probable par plusieurs sérotypes au cours de la vie de l'animal.

Nous retrouvons la même diversité de sérotypes circulant chez les rats noirs (voir plus haut) et chez les chats errants. Une explication possible serait qu'il existe une transmission de la leptospirose des petits mammifères (rats, souris, musaraignes) au chat et *vice versa* par le biais des relations trophiques prédateur-proie. Les animaux peuvent alors être infectés par plusieurs sérotypes au cours de leur vie, contre lesquels ils fabriquent des anticorps spécifiques [503].

Les prévalences de portage rénal sont très proches chez les chiens et les chats errants, avec 29,2% de chiens identifiés comme porteurs et 28,6% de chats. Les moyennes des charges bactériennes rénales ne sont pas significativement différentes. Enfin, l'excrétion urinaire de *Leptospira* a été mise en évidence chez 7,4% des chiens, ce qui est proche des résultats d'une étude irlandaise qui a montré que 7% des chiens domestiques excrétaient des leptospires dans leurs urines [312], et de ceux d'une étude conduite aux Etats-Unis où une leptospiurie a été mise en évidence par PCR chez près de 9% des chiens [504]. Un seul chien de notre étude présentait simultanément des leptospires au niveau rénal et urinaire.

La littérature récente ne démontre pas de façon claire le rôle du chat en tant qu'hôte réservoir de *Leptospira*. Nos travaux montrent sans ambiguïté, grâce à la répétition des PCR dans des runs différents, à l'utilisation d'amorces et d'une sonde d'hydrolyse très spécifiques, et à la séparation physiques et temporelles des étapes d'extraction et d'amplification, que 28,6% des chats étudiés sont porteurs de leptospires au niveau rénal.

Le chat (prédateur), les petits mammifères (proies) et *Leptospira* (pathogène adapté aux rongeurs) représentent un système au sein duquel les contacts sont fréquents. Nous pensons que les chats jouent un rôle épidémiologique dans le maintien des populations de *Leptospira* en participant notamment à un cycle de transmission chats-micromammifères (rats/souris/musaraignes)-leptospires.

Alors que les estimations de prévalence du portage rénal étaient similaires chez les chiens et les chats errants, nous n'avons pas mis en évidence d'excrétion urinaire de leptospires chez le chat. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- Parmi les six chats démontrés comme porteurs au niveau rénal, le prélèvement urinaire n'a été faisable que sur trois. L'excrétion des leptospires étant intermittente chez les animaux réservoirs [9, 13], il est probable que ces trois individus, n'étaient pas en phase d'excrétion au moment du prélèvement ;
- La quantité de leptospires excrétée dans les urines des trois chats positifs par qPCR sur tissu rénal était en-dessous du seuil de détection de notre qPCR.

En tant que porteurs de leptospires, les chats peuvent avoir un rôle dans la contamination environnementale par *Leptospira* à La Réunion. Le chat urine pour marquer son territoire et il peut aussi uriner lors de combat avec d'autres chats. Les chats domestiques urinent généralement dans la litière ou dehors. Quel est le rôle du chat dans la contamination de l'Homme ?

Nos observations chez le chat nécessitent d'être approfondies, notamment il est nécessaire d'obtenir des données sur un plus grand nombre d'individus et de mettre en évidence l'excrétion urinaire.

Notre étude prouve que les carnivores errants sont très exposés aux leptospires pathogènes dans leur environnement (séroprévalence de 46,0% chez les chiens, 26,7% chez les chats). Le mode de vie errant, le contact fréquent avec des zones humides, et la consommation de charogne et de rongeurs [175, 269] favorisent le contact avec *Leptospira*. Nous montrons aussi que l'infection est la plupart du temps subclinique chez les carnivores errants puisque 29,2% des chiens et 28,6% des chats sont porteurs de la bactérie, tandis que ces animaux ne présentaient pas de signes cliniques visibles de maladie ni de lésions rénales observables à l'œil nu.

Nous ne mettons pas en évidence d'association significative entre la séropositivité ou le portage rénal de *Leptospira* chez les carnivores errants et les facteurs de risque "âge" et "sexe". Nos résultats sont en accord avec les études sur les chiens de Raghavan *et al.* [505], Alton *et al.* [344] et Aslantas *et al.* [497]. Ces résultats sont néanmoins en contradiction avec d'autres études qui montrent l'existence d'un groupe d'âge "à risque" [265, 506] ou démontrant

que le taux de séropositivité chez les mâles est supérieur à celui des femelles [507]. Nous supposons que ces différences sont principalement dues à des variations dans les méthodes d'échantillonnage.

Notre étude montre que la zone de vie (est ou ouest) n'est pas un facteur de risque de leptospirose chez les chiens et chats errants. L'incidence de la leptospirose est généralement plus élevée chez les chiens lors de la saison des pluies et les inondations sont des facteurs de risque significatifs de leptospirose canine [171, 506, 508, 509]. Au Canada et aux Etats-Unis les cas de leptospirose canine montrent une saisonnalité marquée : en saison pluvieuse, l'incidence de la leptospirose canine est plus élevée car l'environnement est favorable au maintien des leptospires dans l'environnement [270, 505].

En conclusion, s'il y existe une variation de l'incidence de la maladie en fonction de la pluviométrie chez les chiens errants, il serait envisageable de conduire sur les chiens domestiques des campagnes de vaccination ciblées, c'est-à-dire juste avant la/les périodes à risque ce qui permettraient de réduire le taux d'incidence et l'installation des leptospires au niveau rénal chez des chiens domestiques, qui représentent un risque zoonotique majeur [319, 338].

2.1.4. Animaux d'élevage

Notre étude constitue le premier état des lieux concernant la leptospirose chez les ruminants d'élevage autres que bovins (cerfs Rusa et chèvres). Nous ne discuterons pas des résultats obtenus sur les ovins car l'échantillonnage effectué pour cette espèce est petit.

Les ruminants peuvent être des réservoirs de *Leptospira* et excréter la bactérie dans l'environnement [380, 458, 510]. La contamination des animaux d'élevage se fait autour des points d'eau, naturels ou artificiels, dont l'environnement direct est humide et favorise la survie de *Leptospira*. De plus, les points d'eau sont des lieux de rassemblement des animaux permettant la transmission (directe ou indirecte) entre les individus [511-513]. L'introduction d'un animal infecté au sein d'un élevage est un facteur de risque d'introduction de la leptospirose dans une exploitation. De plus, le type d'élevage (allaitant ou laitier, intensif ou extensif...), la présence d'animaux sauvages dans les alentours de l'élevage, et les conditions environnementales sont des facteurs déterminants pour la dissémination de l'infection [514].

Les rongeurs (et autres micromammifères) vivant dans l'élevage et en périphérie sont des réservoirs de leptospires pour le troupeau [380], de même que les chiens errants [356, 515], et probablement aussi les chats (cf. notre étude). De plus, l'élevage constitue une source permanente de recontamination pour ces hôtes réservoirs, permettant ainsi le maintien du cycle.

La littérature montre qu'il reste très difficile de mettre en évidence des facteurs de risque épidémiologiques d'infection par *Leptospira* au sein des exploitations, et que ces facteurs de risques sont très variables en fonction du type d'étude, des pratiques d'élevage et de la localité [377, 385, 516].

Pour des raisons principalement techniques, nous n'avons pas étudié l'excrétion urinaire chez les animaux de rente. Néanmoins, la présence de leptospires au niveau rénal est considérée comme un témoin de l'excrétion urinaire (intermittente ou continue).

2.1.4.1. Bovins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau VIII)

Séroprévalence : 30/87 (34,5%)

Prévalence du portage rénal : 14/76 (18,4%)

Charge bactérienne rénale : $8,8 \times 10^2$ ($\pm 1,2 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

En France les bovins ne sont pas vaccinés, les anticorps détectés dans notre étude résultent par conséquent d'infection naturelle. Nous montrons que lors de l'abattage 34,5% des bovins abattus à l'abattoir de Saint-Pierre sont séropositifs pour *Leptospira* et que 18,2% d'entre eux sont porteurs de leptospires au niveau rénal, sans qu'ils présentent de symptômes cliniques.

Ces résultats montrent que la leptospirose est une maladie qui circule de façon intense au sein du cheptel bovin réunionnais.

En 2003, H. Gares [77] montrait que Sejroe était le sérotype prédominant en élevage bovin laitier à La Réunion et qu'il était responsable d'avortements dans cette filière. En 2009, ce sérotype est retrouvé chez 56,6% (17/30) des bovins séropositifs à des titres compris entre 100 et 3200, et presque la moitié de ces animaux (8/30) présentaient un titre ≥ 800 pour le sérotype Sejroe. Nous considérons qu'un titre ≥ 800 chez des animaux non vaccinés témoigne d'une infection récente ou en cours. Les autres sérotypes identifiés par

MAT chez les bovins (à des titres ≤ 400) étaient Canicola (1/30), Panama (2/30), Pyrogenes (2/30), Tarassovi (1/30) et Ballum (1/30) ; 20% (6/30) des bovins présentaient des agglutinations pour plusieurs sérogroupes.

Sejroe a aussi été retrouvé chez le rat noir et le rat surmulot. Les autres sérogroupes identifiés chez les bovins ont aussi été retrouvés chez les chiens, les chats, les rats. Il est possible que ces espèces soient des réservoirs de leptospires et des sources de contamination (et de recontamination) pour les élevages bovins. Ils peuvent aussi transporter les leptospires entre des élevages et disséminer ainsi la maladie.

Le séroroupe Sejroe est l'un des quatre sérogroupes les plus fréquemment identifié par MAT chez les patients à La Réunion [412] et on peut suspecter que les bovins, réservoirs principaux de ce séroroupe sur l'île, sont impliqués dans la contamination humaine [517-519].

La séroprévalence en élevage bovin est très variable en fonction des pays (et dans un même pays en fonction des zones géographiques [520-522]), du type de production, du type d'enquête et du seuil de positivité choisi. C'est pourquoi, une comparaison de notre séroprévalence avec celles présentées dans d'autres régions du monde chez les bovins ne serait pas pertinente. Néanmoins, nous présentons ici quelques résultats d'études sérologiques conduites en zones tropicales qui permettent de mieux cerner l'importance et l'impact potentiel de la leptospirose chez les bovins dans d'autres régions, ainsi que les sérogroupes circulant. Comme à La Réunion, dans la majorité des pays, le séroroupe Sejroe reste généralement le séroroupe prédominant dans l'espèce bovine :

Au Sri Lanka, une étude montre une séroprévalence de 20,3% ($n=113$) dans des petits élevages laitiers, avec une prédominance du séroroupe Sejroe (73,9% des séropositifs) [380]. A Trinidad, 21,5% ($n=590$) des bovins sont séropositifs, Icterohaemorrhagiae étant le séroroupe dominant [389] ; en Tanzanie, Schoonman et Swai [385] rapportent une séroprévalence de 30,3% ($n=654$) et le sérovar Hardjo (séroroupe Sejroe) représente 49,5% des séropositifs ; au Mexique, dans la vallée de Toluca, la séroprévalence de la leptospirose chez les bovins laitiers a été estimée à 10,3% et les sérogroupes majoritairement retrouvés étaient Sejroe et Canicola [514]. Au Brésil, une enquête sur 2343 sérums bovins a montré une séroprévalence de 16% pour le sérovar Hardjo (séroroupe Sejroe) [516], tandis qu'une autre enquête montre une séroprévalence de 46,9% ($n=379$) dans les élevages laitiers d'une autre

région de ce pays [383], et qu'une troisième enquête rapporte une séroprévalence de 47,6% ($n=464$) dans une autre zone [523]. En Iran, la séroprévalence de la leptospirose chez les bovins prélevés à l'abattoir a été évaluée à 37,8% ($n=98$) [524]. Enfin, une étude au Texas a montré que 44% ($n=106$) des bovins abattus à l'abattoir excrétaient des leptospires dans leurs urines [510].

Chez les ruminants, l'infection par *Leptospira* provoque des pertes primaires au niveau de l'élevage puisqu'elle est responsable d'une diminution des performances de reproduction (voir **Chapitre IV**).

Les pertes économiques engendrées par la maladie en élevages laitiers et allaitants et le manque à gagner des éleveurs sont probablement sous-estimés sur l'île [525]. Il est aujourd'hui très important d'informer les éleveurs et de diagnostiquer la maladie de façon systématique dans les élevages afin de mettre en place des mesures de lutte appropriées.

Il faut noter que l'infection chez les bovins est le plus souvent chronique, et lors d'avortement, on observe rarement une augmentation du titre en anticorps, au contraire, ce titre chute dans la majorité des cas [9]. Ainsi, la mise en évidence de *Leptospira* comme facteur d'infertilité ou d'avortement est difficile au niveau individuel et doit se faire à l'échelle du troupeau.

Compte-tenu de l'importance du cheptel réunionnais (32 000 animaux allaitants et 3 700 vaches laitières), compte-tenu du volume urinaire théorique d'un bovin (18 litres/24h [526]), de la prévalence importante du portage rénal (18,4%) et de la charge bactérienne rénale ($8,8 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^3$ copies de génome/mg de rein), et même si l'excrétion urinaire est intermittente, nos résultats démontrent que les bovins contribuent de façon importante à la contamination de l'environnement (notamment des zones rurales) par *Leptospira*.

Comme nous le montrons à La Réunion, deux études rapportent qu'au Brésil les jeunes bovins (< 7 mois) ont moins de chance d'avoir été en contact avec *Leptospira* que les bovins plus âgés [516, 520]. En Tanzanie, l'âge à partir duquel le risque de séropositivité est significativement plus élevé chez les bovins est 6 ans [385]. Ainsi, dans les élevages bovins, le risque d'infection augmente avec l'âge de l'animal.

Nous observons que les bovins allaitants réunionnais sont plus touchés par la maladie que les élevages laitiers, ce qui confirme les observations de Prescott *et al.* [527] en Ontario (Canada). D'autres études montrent cependant l'inverse, avec une contamination plus importante des élevages laitiers par rapport aux élevages allaitants [377, 528]. Nous pensons que ces résultats sont très dépendants du protocole de l'étude, de la zone étudiée, des facteurs d'élevage, mais aussi des méthodes d'investigation de la maladie et d'analyse statistique.

Notre étude rapporte qu'un bovin a 5,37 (OR) fois plus de chance d'être séropositif s'il est porteur rénal et *vice versa* ($p = 0,008$; IC 95% [1,54 - 21,99]). Les hypothèses liées à cette observation sont les suivantes :

- la persistance des anticorps est très longue et co-existe avec l'infection rénale ;
- et/ou les recontaminations sont fréquentes : à partir de l'environnement (étable, pâture, salle de traite [528], auge, aliments) ou directement par contacts [481], notamment lorsque la densité animale est très importante ou lors de la monte naturelle (mâle reproducteur, porteur de *Leptospira* provenant d'un autre élevage, ou présent au sein même de l'élevage et permettant le maintien de la maladie dans le troupeau). Ces ré-infections stimulent de façon continue le système immunitaire et la synthèse d'anticorps.

L'insémination artificielle compte pour 95% des fécondations en élevage laitier à La Réunion (environ 5% de saillies naturelles) [529], c'est l'inverse en élevage allaitant où la saillie naturelle est de règle. La législation sanitaire française en matière de reproduction animale s'appuie sur la législation européenne (Directive 88/407/CEE) qui définit notamment les règles sanitaires et d'hygiène à respecter dans la préparation et le stockage des semences. Les paillettes utilisées à La Réunion proviennent de l'Union Européenne où elles sont obtenues dans des centres de collecte de semence agréés. Il n'y a pas d'exigence additionnelle pour l'introduction à La Réunion. Les antibiotiques énumérés ci-après doivent être ajoutés pour l'obtention dans le sperme après dilution finale des concentrations suivantes : (au minimum) 500 µg de streptomycine par ml de dilution finale, 500 UI de pénicilline par ml de dilution finale, 150 µg de lincomycine par ml de dilution finale, 300 µg de spectinomycine par ml de dilution finale. Une combinaison différente d'antibiotiques ayant un effet équivalent contre *Campylobacter*, *Leptospira* et *Mycoplasma* peut être utilisée.

L'ajout d'antibiotiques dans le sperme utilisé en insémination artificielle garantit la non transmission de la leptospirose par ce mode de reproduction. Néanmoins, en élevage allaitant

à La Réunion, le risque de transmission de la maladie par la monte naturelle et de son maintien dans le troupeau notamment par le biais du taureau reproducteur est non négligeable.

En conclusion, il semble que l'origine de la contamination des bovins soit multiple :

- Contamination directe intra-élevage par les urines [458],
- Contamination indirecte [513] par l'environnement, dans le bâtiment si présence de zones humides, ou dans les pâturages au niveau des points d'eau, des retenues d'eau ou par le sol humide [385], ou si la pâture est partagée avec d'autres espèces, notamment des porcs [383],
- Contamination directe et indirecte par les rats, réservoirs potentiels du sérotype Sejroe, et circulant dans l'élevage et entre les élevages, mais aussi par les carnivores domestiques ou errants [186],
- Contamination directe par la monte naturelle [397, 530].

2.1.4.2. Caprins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau IX)

Séroprévalence : 36/60 (60%)

Prévalence du portage rénal : 13/49 (26,5%)

Charge bactérienne rénale : $9,2 \times 10^2$ ($\pm 7,8 \times 10^2$) copies de génome/mg de rein

L'élevage caprin représente une filière importante (culturellement et numériquement) à La Réunion et la consommation de "cabri", en viande fraîche ou congelée est courante sur l'île. Notamment associée aux fêtes, cette viande, de coût modéré, est consommée régulièrement dans les familles créoles. L'élevage caprin est surtout familial. Tous les animaux ne sont pas déclarés, et certains élevages atteignent plusieurs centaines de têtes. La production d'animaux pour le sacrifice est aussi relativement importante. L'élevage caprin laitier est par contre très peu développé sur l'île.

Notre étude montre une séroprévalence très élevée (60%) en élevage caprin et une prévalence du portage rénal de 26,5%, démontrant que les chèvres sont des réservoirs de leptospires, comme l'ont montré précédemment des recherches dans d'autres régions du monde [138, 531].

Des études expérimentales ont prouvé que la majorité des infections par *Leptospira* était asymptomatique chez les chèvres [532, 533].

Par conséquent, il semble que la leptospirose soit une maladie majeure, asymptomatique, chez ces petits ruminants à La Réunion.

Nous montrons que le sérotype Panama est largement prédominant chez les caprins à La Réunion, représentant 69,4% des animaux séropositifs, suivi du sérotype Pyrogenes (25% des séropositifs). Un seul animal était séropositif contre le sérotype Autumnalis; ce sérotype ayant été mis en évidence uniquement chez cet animal parmi toutes les espèces étudiées, nous pensons que cette réaction d'agglutination est non spécifique. Enfin, 11,1% des caprins présentaient une agglutination pour plusieurs sérotypes. Parmi les autres animaux de notre échantillonnage, Panama a aussi été retrouvé chez le rat surmulot, le chien, le chat, les bovins, le cerf, et le porc, tandis que Pyrogenes, non retrouvé chez les micromammifères ou les carnivores errants, ne circule que chez les animaux de rente.

Nos résultats suggèrent que les caprins sont réservoirs des sérotypes Panama et Pyrogenes à La Réunion.

L'introduction de leptospires dans un élevage peut se faire par l'introduction d'un caprin infecté de façon chronique (et non testé à l'introduction et sans respect d'une période de quarantaine) ou par l'intermédiaire des animaux sauvages ou errants. Par ailleurs, la littérature rapporte qu'il existe une différence significative de risque d'infection par *Leptospira* entre les élevages mixtes, c'est-à-dire présentant plusieurs espèces (caprins, bovins, porcins) et les élevages n'ayant qu'un seul type de production [534]. Il semble donc que les élevages multi-espèces doivent faire l'objet d'une surveillance et de mesures de prévention accrues.

La séroprévalence en élevage caprin à La Réunion est très élevée par rapport aux séroprévalences rapportées chez les chèvres dans d'autres régions du monde : A Trinidad, la séroprévalence chez les caprins est faible, avec 3,3% ($n=180$) d'animaux séropositifs [389]. Dans la région du sud du Tyrol en Italie, la prévalence chez les caprins a été estimée à 2,1% ($n=95$) [400]. Une enquête sérologique dans différentes îles situées dans la mer des Antilles (St-Martin, St-Kitts, Nevis, Antigua, Montserrat, Guadeloupe, Dominique, Martinique, Ste-Lucie, St-Vincent, Grenade, Caniacou, et La Barbade) montre que 7,2% ($n=579$) des caprins présentent des anticorps contre *Leptospira* (à un titre ≥ 100). La plus forte séroprévalence a été retrouvée à St-Vincent, où 23% ($n=48$) des caprins étaient séropositifs. Dans ces îles, les sérotypes circulant majoritairement chez les caprins sont Autumnalis, Grippytyphosa,

Cynopteri et Icterohaemorrhagiae [535]. Au Brésil, Lilenbaum *et al.* [401] montrent une séroprévalence de 20,9% ($n=248$) en élevage caprin, tandis qu'une autre étude rapporte une séroprévalence de 31,3% ($n=230$) dans une autre région du pays. En Jamaïque, néanmoins, la séroprévalence de la leptospirose en élevage caprin a été estimée à 62% [536], proche de celle observée à La Réunion.

Comme chez les bovins, l'infection par *Leptospira* est une cause d'avortement chez les caprins [537]. Il n'existe pas de vaccin ayant une AMM en France et la prophylaxie doit passer obligatoirement par des mesures de prévention sanitaires. Considérant le fort taux de portage rénal (26,5%), les pertes économiques liées à la leptospirose sont probablement importantes dans l'élevage caprin réunionnais [525]. Une étude portant sur les facteurs d'infertilité dans les exploitations caprines serait intéressante car elle permettrait d'identifier la proportion d'avortements liés à la leptospirose et de les différencier des épisodes abortifs liés à d'autres maladies circulant dans les élevages caprins de l'île, notamment fièvre Q et chlamyphilose. De plus, la leptospirose peut se transmettre par la semence [401], et les échanges de boucs reproducteurs entre élevages, pratique courante à La Réunion, constituent un risque d'introduction de la maladie dans un troupeau.

Nous n'avons pas cherché à démontrer l'excrétion urinaire de leptospires dans l'espèce caprine, mais la littérature rapporte que les caprins infectés par *Leptospira* sont excréteurs de la bactérie dans leurs urines [138]. De plus, le contact avec des caprins a été déterminé comme étant un facteur de risque d'infection par la leptospirose chez les patients atteints [538]. Par conséquent, la contribution des caprins à la contamination environnementale n'est pas négligeable, en particulier en zone rurale.

<p>Du fait de l'importance numérique des petits élevages caprins familiaux à La Réunion et du manque de suivi sanitaire dans ces élevages, la leptospirose caprine en tant que zoonose doit être prise en considération dans la lutte contre la maladie chez l'Homme.</p>

Comme dans l'étude de Dos Santos *et al.* [534], nous ne démontrons pas de différence significative d'infection ou de portage rénal entre les mâles et les femelles. Nous avons effectué des prélèvements uniquement sur des animaux adultes et n'avons pas pu vérifier l'influence du facteur âge sur le statut des animaux vis-à-vis de la leptospirose mais au Brésil,

l'âge a une influence sur le statut sérologique des caprins, et les animaux adultes ont plus de chance d'être séropositifs que les jeunes.

2.1.4.3. Cerfs Rusa

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau XI)

Séroprévalence : 21/34 (61,8%)

Prévalence du portage rénal : 6/32 (18,7%)

Charge bactérienne rénale : $2,9 \times 10^3$ ($\pm 3,7 \times 10^3$) copies de génome/mg de rein

A la différence des élevages bovins et caprins, l'élevage de cerfs Rusa est peu développé sur l'île. Par ailleurs, il existe peu d'animaux à l'état sauvage.

Avec une séroprévalence de 61,8%, les cerfs sont l'espèce de rente ayant le taux de séropositivité le plus élevé sur l'île.

Le sérotype Panama représente 38,1% (8/21) des réactions séropositives chez le cerf Rusa, tandis que Pyrogenes compte pour 23,8% (5/21). Les autres sérotypes circulant chez les cerfs sont Icterohaemorrhagiae et Mini, représentant 9,5% (2/21) et 4,8% (1/21) des sérologies positives respectivement. Chez les cervidés, nous avons observé que 23,8% (5/21) des réactions sérologiques positives étaient dirigées contre plusieurs sérotypes. Les titres en anticorps restent relativement faibles dans cette espèce avec un titre maximum de 800 retrouvé contre le sérotype Mini, témoin d'une infection aiguë ou assez récente, alors que les titres en anticorps dirigés contre Pyrogenes ne dépassent pas 100, ceux contre Panama restent ≤ 200 , et ceux dirigés contre Icterohaemorrhagiae ≤ 400 .

Nous avons montré une séroprévalence très élevée dans notre échantillon et l'absence de réaction sérologique envers le sérotype Sejroe chez le cerf Rusa alors que les cervidés sont généralement considérés comme réservoir de ce sérotype [539-542]. Nos résultats sont très différents de ceux rapportés par d'autres études sur cette espèce : la séroprévalence de la leptospirose chez le cerf Rusa en Australie a été estimée à 25% ($n=12$) avec des titres en anticorps allant de 128 à 1024, principalement dirigés contre le sérovar Hardjo (sérotype Sejroe) [539]. Chez les cervidés en Nouvelle-Zélande, la séroprévalence a été évaluée à 31,1% [541] et Hardjobovis est le sérovar prédominant chez les cervidés dans ce pays [541, 542], suivi de Icterohaemorrhagiae [541]. En Nouvelle-Calédonie, le cerf Rusa est considéré comme réservoir de *L. borgpetersenii* sérotype Sejroe sérovar Hardjobovis [540].

Chez les cerfs la séropositivité n'est pas corrélée au portage rénal et, bien que la séroprévalence soit élevée (61,8%) les titres en anticorps sont faibles (100 à 200 pour la majorité des animaux). Par conséquent :

- Soit les réinfections ne sont pas fréquentes chez ces animaux et les faibles taux d'anticorps sont le reflet d'infections anciennes ;
- Soit le taux d'anticorps baisse rapidement après l'infection.

Le taux de portage rénal est faible (18,8%) ce qui suggère que les animaux contaminés éliminent la bactérie et qu'elle ne persiste pas dans le rein (les recontaminations étant probablement peu fréquentes, l'installation au niveau rénal n'est pas renouvelée).

Les principaux sérogroupes circulant chez les cerfs sont Panama et Pyrogenes. Les titres faibles associés à une prévalence du portage rénal de 18,8% montrent que *Leptospira* circule probablement à bas bruit dans les élevages de cervidés.

Nous avons investigué deux exploitations pour notre étude : l'élevage du Tampon (situé au 23^{ème} km) au sein duquel l'élevage de cervidés est conduit de façon semi-extensive, et l'élevage de Saint-Leu où l'élevage peut être qualifié d'intensif (en bâtiment). L'analyse statistique nous montre qu'un animal élevé au 23^{ème} km a plus de chance d'être séropositif qu'un animal élevé à Saint-Leu ($p = 0,008$; $OR = 7,20$; $IC\ 95\% [1,64 - 37,87]$). Saint-Leu présente un climat plus sec que le 23^{ème} km, et l'environnement des cerfs est par conséquent moins favorable à la survie de *Leptospira* que l'environnement des animaux élevés au 23^{ème} km (qui est une région pluvieuse). Par conséquent, si l'élevage intensif favorise la transmission directe des leptospires au sein du troupeau, l'élevage semi-extensif de plein air favorise plutôt la contamination indirecte *via* l'environnement.

Néanmoins, comme nous l'avons exposé précédemment, des facteurs zootechniques peuvent, en plus du facteur climatique ou type d'élevage, rentrer en jeu pour expliquer cette différence. Enfin, il faut noter que le facteur de risque "élevage" n'est pas significatif dans la recherche des facteurs de risque de portage rénal chez les cervidés.

2.1.4.4. Porcins

Rappel des résultats (Annexe I, Tableau XII)

Séroprévalence : 43/89 (48,3%, un seul verrat dans l'échantillon)

Prévalence du portage rénal : 13/83 (15,6%)

Charge bactérienne rénale : $8,6 \times 10^2 (\pm 1,7 \times 10^3)$ copies de génome/mg de rein

Nous montrons qu'à La Réunion 47,7% des truies de reproduction abattues à l'abattoir lors de notre enquête étaient séropositives vis-à-vis de la leptospirose. Le seul verrat testé était lui aussi séropositif et présentait des anticorps contre les sérogroupes Ballum et Panama.

Parmi les truies séropositives, le séro groupe Panama est celui le plus fréquemment mis en évidence par MAT, avec 38,1% (16/42) des réactions positives, tandis que Pyrogenes représente 26,2% des réactions positives. D'autres sérogroupes sont mis en évidence chez les truies : Icterohaemorrhagiae, Cynopteri et Mini représentant chacun 4,8% (2/42) des séropositifs, et Ballum, comptant pour 2,4% (1/42) des sérologies positives. De plus, 19% (8/42) des truies séropositives ont des anticorps dirigés contre plus d'un séro groupe, témoignant d'infections multiples et/ou de réactions croisées.

Enfin, nous notons que les titres en anticorps déterminés par MAT sont assez faibles puisque tous compris entre 100 et 400, avec 25/42 (59,5%) animaux positifs au titre 100.

Ces résultats montrent que la leptospirose est endémique chez les truies de reproduction à La Réunion.

La séroprévalence de la leptospirose porcine est extrêmement variable en fonction des études. Une enquête sérologique conduite en Thaïlande en 2004-2005 a montré que 10% des truies échantillonnées ($n=400$) présentaient une réaction sérologique positive envers *Leptospira* et *Grippytyphosa* représentait 55% des réactions positives [543]. Dans la municipalité de Morogoro (Tanzanie), la séroprévalence de la maladie a été estimée, dans les petits élevages et élevages familiaux, à 4,4% ($n=385$). Ni l'âge ni le sexe de l'animal n'ont pu être mis en évidence comme facteurs de risque de séropositivité [404]. Au Belize, 28% ($n=71$) des porcs testés par MAT étaient séropositifs au seuil de 1:100, Australis étant le séro groupe prédominant, suivi d'Autumnalis et Icterohaemorrhagiae [544]. Au Vietnam, Boqvist *et al.* [405] rapportent une séroprévalence de 73% ($n=424$) chez les truies de reproduction, avec un seuil de séropositivité de 1:100 et Bratislava était le sérovar majoritaire [405]. En Malaisie, pays voisin du Vietnam, Bahaman *et al.* [545] rapportent une séroprévalence de 16,1% ($n=139$) chez les porcs à l'engrais et le séro groupe Pomona est le

plus fréquemment retrouvé. A Trinidad, la séroprévalence chez les porcs est de 5,5% ($n=200$) [389]. Par ailleurs, il semble que la séroprévalence soit variable chez les porcs, en fonction des années, et au cours d'une même année [545], notamment si les animaux sont élevés en plein air [546].

Nous rapportons une prévalence du portage rénal de 15,6% chez les truies de réforme, ce qui est faible comparé à d'autres études dans cette espèce : au Vietnam 69% ($n=32$) des porcs abattus à l'abattoir étaient porteurs de leptospires au niveau rénal [547] et dans le nord-est de la Sicile (Italie), la prévalence du portage rénal chez des porcs élevés en plein air a été estimée par PCR à 33% ($n=90$) [548]. Cependant, ces études présentent des résultats sur des porcs à l'engrais ou élevés en plein air, ce qui est très différent épidémiologiquement des truies que nous avons étudiées.

Ces résultats, associés aux faibles titres d'anticorps, montrent que, si presque la moitié des animaux a été en contact avec *Leptospira*, l'infection est probablement ancienne (ces animaux sont en moyenne âgés de 5 ans) et le portage rénal très probablement chronique.

A la Réunion, les pertes économiques liées à *Leptospira* sont très certainement sous-estimées en élevage porcin. Les troubles de la reproduction sont des pathologies souvent chroniques chez les porcs, circulant à bas-bruit et pouvant avoir des étiologies très diverses. La mise en évidence d'une séroprévalence et d'un portage rénal de *Leptospira* élevés chez les truies de reproduction réunionnaise (à l'étage de production) devrait permettre une prise de conscience de l'importance de cette maladie en élevage porcin.

A La Réunion, les truies de réforme abattues à l'abattoir de Saint-Pierre proviennent majoritairement d'élevages naisseurs-engraisseurs hors sol (et non d'élevages familiaux) et ces truies sont élevées en bâtiments. Ces deux critères peuvent expliquer que le taux de contamination des animaux soit moins important à La Réunion que celui rapporté dans d'autres études. En effet, au Vietnam, les truies élevées dans des petits élevages ont plus de chance d'être séropositives que celles élevées dans les grands élevages (probablement car les animaux des petits élevages ont plus d'interactions avec des d'autres espèces animales et avec l'environnement que les animaux des plus grandes fermes) [405]. De plus, le contact direct entre les truies favorise la contamination directe *via* les urines entre les animaux [405].

2.1.4.5. Discussion sur les sérogroupe Panama et Pyrogenes

Ces deux sérogroupe sont les plus fréquemment identifiés chez les caprins, cerfs et porcins de La Réunion.

Le sérogroupe Panama regroupe deux souches appartenant à une seule espèce génomique (*L. noguchii*, sérovar Cristobali souche 1996 K et sérovar Panama souche CZ 214K), toutes deux isolées chez des opossums à Panama [9].

Panama est peu retrouvé chez les patients à La Réunion (un seul patient entre 1998 et 2009 ayant un MAT positif pour ce sérogroupe [412] et trois patientes positives pour ce sérogroupe dans l'enquête épidémiologique conduite en 1987 par Duval *et al.* [202]). Ce sérogroupe est responsable de la majorité des cas cliniques au Cambodge (déterminé par MAT) [549], et probablement à l'origine de nombreuses formes subcliniques [549]. Ce sérogroupe est aussi retrouvé fréquemment chez les patients au Mexique, avec comme sources supposées d'infection, les rongeurs, les chiens et les porcs [232], ainsi que dans la région du Mekong (Vietnam) où il représente 15,2% des séropositifs (263 personnes ont été trouvées séropositives sur les 1400 testées) [550], et dans les quartiers pauvres de Rio de Janeiro (Brésil) où 3,1% des personnes testées (n=259) présentaient des anticorps contre le sérogroupe Panama [201].

Nous montrons que le sérogroupe Panama est le sérogroupe majoritaire circulant chez les ruminants d'élevage (autres que bovins), les caprins et les cerfs, ainsi que chez les truies de reproduction, alors qu'il est peu retrouvé chez les patients réunionnais.

Le sérogroupe Pyrogenes contient des souches d'au moins cinq espèces génomiques (**Tableau 40**) [9]. Ce sérogroupe est par conséquent très divergent et il a été isolé sur diverses espèces mammaliennes, dont l'Homme. Il est probable que les réservoirs soient variables d'une région à l'autre.

Tableau 40 : Espèces génomiques, sérovars, souches de référence et origine des souches de *Leptospira* appartenant au séro groupe Pyrogenes (d'après [9]).

Espèce	Sérovar	Souche de référence	Source	Origine géographique
<i>L. borgpetersenii</i>	Hamptoni	Hampton	Humain	Malaisie
<i>L. borgpetersenii</i>	Kwale	Julu	Humain	Kenya
<i>L. interrogans</i>	Abramis	Abraham	Humain	Malaisie
<i>L. interrogans</i>	Biggis	Biggis	Humain	Malaisie
<i>L. interrogans</i>	Camlo	LT 64-67	Humain	Vietnam
<i>L. interrogans</i>	Guaratuba	An7705	?	?
<i>L. interrogans</i>	Manilae	LT398	Rat	Philippines
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem	Humain	Indonésie
<i>L. interrogans</i>	Robinsoni	Robinson	Humain	Australie
<i>L. interrogans</i>	Zanoni	Zanoni	Humain	Australie
<i>L. noguchii</i>	Myocastoris	LSU1551	Tatou	Etats-Unis
<i>L. santarosai</i>	Alexi	HS-616	Humain	Porto Rico
<i>L. santarosai</i>	Alexi	Linaires	Humain	Panama
<i>L. santarosai</i>	Bagua	MW-12	Opossum	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Cenepa	MW 2	Opossum	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Princeton	TRVL112499	Humain	Trinidad
<i>L. santarosai</i>	Pyrogenes	Northrup	Humain	Trinidad
<i>L. santarosai</i>	Sanmartini	CT63	Bovin	Pérou
<i>L. santarosai</i>	Varela	1019	Opossum	Nicaragua
<i>L. weilii</i>	Menglian	S621	Humain	Chine
Espèce incertaine	Nigeria	Vv3JA	?	?

La plupart des souches de référence pour le séro groupe Pyrogenes ont été isolées à partir d'humains et d'animaux sauvages [386], mais les isolements à partir d'animaux domestiques sont peu nombreux. Les réservoirs pour ce séro groupe sont actuellement inconnus, bien qu'il semble circuler en Afrique, notamment chez les bovins [386]. Pyrogenes est le séro groupe majoritaire identifié chez les patients par MAT au Sri Lanka [440] et il a été impliqué dans une épidémie de leptospirose en Martinique [212]. Ce séro groupe est aussi responsable de 10% des cas cliniques diagnostiqués à Mayotte [74]. Le sérovar Zanoni est responsable de nombreux cas humains en Australie [551] où il est associé à la maladie des coupeurs de canne à sucre. Ce sérovar est très commun dans la région nord du Queensland et les principaux hôtes réservoirs sont des marsupiaux (principalement les bandicoots, famille des Peramelidae). Sa circulation a aussi été démontrée chez les bovins laitiers australiens et de nombreux éleveurs laitiers ont été infectés (<http://www.health.qld.gov.au/qhcss/qhss/lepto/documents/zanoni.pdf>). Le sérovar Robinsoni,

isolé pour la première fois en 1951 chez un coupeur de canne australien [551], est moins courant sur le continent australien, mais le nombre de cas de leptospirose humaine dus à ce sérovar est en augmentation. Les sources probables d'infection sont les bandicoots, les rats et les porcs sauvages (<http://www.health.qld.gov.au/qhcss/qhss/lepto/documents/robinsoni.pdf>).

Chez les animaux, le sérotype Pyrogenes a été isolé par culture à partir de rein et de sang de rats en Egypte [351]. Il a été identifié la première fois aux Etats-Unis (sérovar Zanoni) à partir de rein de ragondin (*Myocastor coypu*) [552]. Il a aussi été isolé chez des bovins au Zimbabwe [553] et en Australie [554], ainsi que chez différents micromammifères australiens (*Isoodon macrourus*, *Melomys lutilus*, *Uromys caudimaculatus*, *Rattus sordidus conatus*, *R. assimilis*, *R. rattus*, *R. norvegicus*, *M. musculus*) [555]. Par MAT, Pyrogenes a été identifié comme circulant dans les population de chiens en Afrique du Sud [339, 556], au Japon [507], au Mexique [515]... Pyrogenes circule aussi chez les porcs au Mexique bien qu'il ne soit pas le sérotype dominant [557], il est aussi le sérotype principalement identifié par MAT chez les rongeurs et les musaraignes (*S. murinus*) en Thaïlande [443]. En Pologne, il est le sérotype majoritaire retrouvé dans les élevages caprins [437]. Une étude au Portugal rapporte que Pyrogenes est un des sérotypes majeurs identifiés par MAT chez les chèvres (10,7% des séropositifs) et les chevaux (11,4% des séropositifs) [558].

L'importance de ce sérotype identifiée par MAT à La Réunion, notamment chez les caprins, cervidés et porcins, pose la question de sa pathogénicité chez ces espèces.

2.1.5. Petit Molosse de La Réunion (*Mormopterus francoismoutoui*)

M. francoismoutoui est une chauve-souris de la famille des Molossidae, endémique de l'île de La Réunion [428]. L'île abrite une autre espèce de chauve-souris insectivore, retrouvée aussi à l'île Maurice, *Taphozous mauritianus*, famille des Emballonuridae, que nous n'avons pas étudiée.

Seuls trois prélèvements poolés d'urines de *M. francoismoutoui* étaient analysables par qPCR (les autres contenaient des inhibiteurs) et tous trois étaient négatifs pour la présence de *Leptospira*. Ce fort taux d'inhibiteurs (80% des échantillons) montre que la technique d'échantillonnage sur bêche plastique n'était pas optimale et que des contaminations ont eu lieu. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence l'excrétion urinaire de *Leptospira* chez

deux individus de *M. francoismoutoui*, à partir de prélèvements individuels d'urine, effectués directement au niveau du méat urinaire.

Pour la mise en évidence de *Leptospira* dans les urines de chiroptères, le prélèvement individuel direct au niveau du méat urinaire est à préférer au prélèvement poolé sur bêche.

Le rôle épidémiologique des chauves-souris dans la transmission et le maintien de la leptospirose est peu documenté. Les études se focalisent principalement sur les animaux domestiques ou les espèces de rongeurs commensaux de l'Homme, mais les chauves-souris peuvent être des sources potentielles d'infection [559] notamment du fait de leur abondance et de leur proximité avec les animaux domestiques et sauvages, mais aussi l'Homme [560, 561]. Des études au Pérou ont montré que les microchiroptères pouvaient, comme les autres mammifères, être des réservoirs de *Leptospira* [560, 561] et l'étude de Matthias *et al.* [561] rapporte une prévalence du portage rénal de 3,4% ($n=589$) toutes espèces confondues. Cette prévalence diffère en fonction des espèces, mais l'étude montre que *Promops nasutus*, de la famille des Molossidés (comme *M. francoismoutoui*) peut être porteur de *Leptospira* [561]. On peut supposer qu'il existe à La Réunion un cycle de transmission chauves-souris/rongeurs permettant le maintien de *Leptospira* dans les milieux où ces deux espèces cohabitent [561].

Par conséquent, à La Réunion, *M. francoismoutoui* peut être considéré comme un réservoir de maintien et une source de transmission de *Leptospira*.

Il nous est difficile d'évaluer le risque de transmission de la leptospirose liée à *M. francoismoutoui* du fait de la faible taille de l'échantillonnage et du peu de prélèvements analysables par PCR. Néanmoins, même si la prévalence du portage rénal est faible, nous montrons que le risque de transmission existe et que *M. francoismoutoui* est probablement impliqué dans le maintien d'un cycle sylvatique, mais aussi rural et urbain car cette espèce, d'effectif important, occupe des habitats variés. De plus, on retrouve des colonies dans les écoles, les maisons, derrière des volets, les kiosques de pique-nique (*observation personnelle*)... ces gîtes, pouvant être proches de l'Homme représentent un risque zoonotique de transmission de la leptospirose.

A la grotte de Trois Bassins qui compte plusieurs milliers d'individus de *M. francoismoutoui* (*Lydie Héré, communication personnelle*), des maraîchers viennent prélever du guano pour l'utiliser comme engrais. Il est difficile de dire si la manipulation du

guano présente un risque de contamination par *Leptospira*, néanmoins, le petit Molosse de La Réunion étant un excréteur potentiel de leptospires, il convient de prendre des précautions de base pour la manipulation de leurs excréments (port de gants, bottes et lunettes). Enfin, un des moyens de défense de ces animaux lorsqu'ils sont au sein de la colonie est d'uriner sur les intrus (*observation personnelle*) ce qui peut représenter un moyen de contamination pour les chiroptérologues ou les personnes qui utilisent le guano, notamment par pénétration *via* la muqueuse oculaire.

Les personnes en contact avec les chiroptères doivent être informées du risque de contamination par *Leptospira*.

2.2. Charge bactérienne rénale

Nous avons montré qu'il n'existe pas de différence significative dans la charge bactérienne rénale moyenne entre le rat noir, la souris, le rat surmulot, le chien, le chat, le cerf, la chèvre, le bovin, le porc, et la musaraigne. Aucune étude antérieure n'a comparé les charges bactériennes rénales entre plusieurs espèces animales, par conséquent, nous ne disposons à ce jour d'aucune donnée bibliographique suggérant l'existence d'une différence dans les capacités de fixation rénale de *Leptospira* entre les animaux hôtes. Cependant, nos résultats soulèvent la question de la capacité des reins à tolérer la colonisation par *Leptospira* :

- Le rat noir et la souris, en tant qu'hôtes privilégiés, ont-ils une tolérance rénale supérieure à la colonisation par la bactérie (que nous n'avons pas pu mettre en évidence ici) ?
- La capacité de colonisation du rein par *Leptospira* est-elle la même quelle que soit l'espèce ?
- S'il existe une différence dans les capacités rénales des réservoirs, cela induit-il une différence dans la contribution de ces espèces à la contamination de l'environnement ?

Nous montrons aussi qu'il existe une corrélation positive entre le poids et la charge bactérienne rénale chez les jeunes rats noirs naturellement infectés (et pas chez les adultes). L'existence d'une corrélation positive entre les variations de la charge bactérienne rénale et le

poids chez les jeunes rats noirs laisse penser que l'âge des animaux peut avoir une influence sur la charge bactérienne rénale chez les animaux infectés naturellement.

La dynamique de l'infection par *Leptospira* a été peu étudiée [289, 325, 480, 489, 562-564]. Toutes les expérimentations sur animaux utilisent la voie intra-péritonéale comme voie d'infection [289, 325, 480, 489, 563] exceptée l'étude de Lourdault *et al.* [562] qui teste aussi l'inoculation par voies conjonctivale et sous-cutanée. Les modèles d'inoculation par voie intra-péritonéale ou sous-cutanée ne reflètent pas les conditions de pénétration de la bactérie lors d'infection naturelle où *Leptospira* pénètre par une brèche cutanée ou en traversant une muqueuse [9]. De plus, ces voies d'infection expérimentales induisent un biais en surestimant probablement la charge en pathogènes dans les tissus et en diminuant le temps de dissémination de la bactérie dans l'organisme [489].

Nos données de quantification de charge bactérienne rénale sont les premières rapportées sur des animaux infectés naturellement. Nous ne connaissons pas :

- l'antériorité de la contamination (alors qu'elle est toujours connue dans les modèles expérimentaux dans lesquels l'infection est étudiée sur une durée courte),
- la fréquence des réinfections,
- les possibilités de co-infection d'un animal par plusieurs souches de *Leptospira*,
- l'influence des facteurs individuels et environnementaux sur la charge bactérienne rénale.

Les expérimentations sur *R. norvegicus* rapportent l'absence de lésions histopathologiques au niveau des reins lors d'infection par *Leptospira* [289, 325, 480, 489]. L'inoculum minimal (par injection intra-péritonéale) permettant la colonisation rénale a été estimé à 10^4 leptospires [489]. Lors d'infection expérimentale, la concentration des leptospires dans les urines atteint 10^7 organismes/ml [289], ce qui laisse supposer qu'en milieu naturel l'exposition à de fortes concentrations de leptospires est fréquente (et atteint donc probablement l'inoculum minimal induisant la colonisation rénale).

De plus, ces études de laboratoire montrent que la charge rénale maximale en leptospires est observée dans les reins à 4-6 jours post-inoculation chez les animaux, qu'ils soient sensibles comme le cochon d'Inde [562] ou résistants comme le rat surmulot [489]. Thiermann [325] a montré que, infecté par le sérovar Icterohaemorrhagiae *R. norvegicus*

pouvait excréter des leptospires pendant au moins 220 jours, ce qui prouve que la durée de la colonisation rénale est au minimum égale à cette période chez le rat surmulot infecté par ce sérovar. L'observation par microscopie électronique à balayage de sections rénales collectées 28 jours post-infection chez *R. norvegicus* montre la très forte densité en leptospires dans la lumière des tubules rénaux (**Figure 30**).

Thiermann [325] montre aussi qu'il existe des différences dans la capacité de colonisation des reins entre les souches de *Leptospira* [325]. De plus, cette capacité est dépendante de l'hôte : Nally *et al.* [289] rapportent que les jeunes rats surmulots infectés par le sérovar Copenhageni n'excrètent que pendant 72 jours ; ils émettent l'hypothèse que les variations dans la quantification des leptospires excrétés par voie urinaire sont liées à l'âge des animaux.

La charge bactérienne rénale varie donc en fonction :

- de l'antériorité de la contamination,
- de la dose infectante,
- de la souche infectante,
- de l'âge de l'animal infecté.

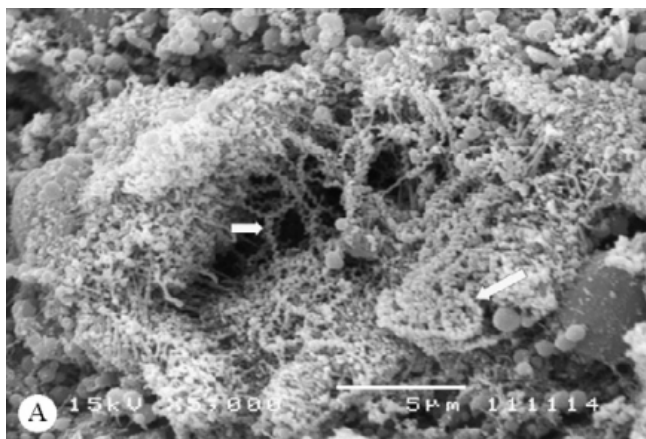


Figure 30 : Observation au microscope électronique à balayage d'une section de tissu rénal de *R. norvegicus* 28 jours après infection par 108 leptospires (grossissement x5000).

La photographie présente la lumière d'un tubule rénal (centre de l'image) contenant une forte densité de leptospires présentant la morphologie spiralée typique. La petite flèche pointe un leptospire dans la lumière tubulaire. La grande flèche indique un leptospire attaché à la surface tubulaire interne, exposée à cause d'une rupture tissulaire. La zone autour des tubules rompus montre les surfaces tissulaires de l'hôte, sans leptospire visible, et présentant des corps sphériques, témoins de lésions non spécifiques des cellules adjacentes [489].

Compte-tenu des données bibliographiques d'infections expérimentales, nous posons l'hypothèse que, chez les animaux jeunes, en croissance, la charge rénale est dépendante du volume du rein et de la surface "colonisable". Chez l'adulte, en effet, on peut supposer qu'une taille maximale des reins est atteinte et avec elle, la charge maximale en leptospires.

Hypothèse 1 : La concentration en leptospires dans les reins est proportionnelle à la surface tissulaire colonisable.

Chez les jeunes, certains points sont en-dehors de la droite de régression. Même en supposant que l'hypothèse 1 soit vérifiée, (**Figure 29**), il apparaît que d'autres facteurs influencent cette charge, par exemple l'antériorité de la contamination et la souche infectante.

Hypothèse 2 : La charge bactérienne rénale chez un animal infecté naturellement est proportionnelle à l'antériorité de la contamination.

Hypothèse 3 : La charge bactérienne rénale (et la durée de l'infection) chez un animal infecté naturellement est dépendante de la souche infectante.

Enfin, d'autres facteurs, tels que des facteurs individuels (par exemple un facteur génétique) peuvent influencer la résistance de l'animal à la colonisation par *Leptospira*.

2.3. Etude des paramètres urinaires

L'analyse statistique démontre qu'il existe un lien significatif entre la présence de protéines dans les urines et l'infection rénale par *Leptospira* chez les chiens, chats et rats noirs échantillonnés pour cette étude²¹ (aucun tenrec n'était porteur de leptospires au niveau rénal).

Dans un rein fonctionnant normalement, les protéines de faible poids moléculaire sont filtrées puis entrent dans le tubule proximal où elles sont réabsorbées en quasi-totalité et catabolisées par les cellules tubulaires. En fonction de la localisation des lésions rénales (glomérulaires ou tubulaires), on observe un profil particulier de protéines urinaires [565]. La

²¹ Nous considérons toutes les espèces simultanément car le nombre d'animaux par espèce était insuffisant pour une analyse statistique par espèce.

protéinurie est un signe décrit chez les patients humains atteints de leptospirose, elle est généralement associée à une hématurie [566]. La protéinurie est aussi décrite chez le chien atteint de leptospirose [565].

Lors d'infection leptospirosique, plusieurs facteurs peuvent être associés à l'atteinte rénale aigüe : l'action néphrotoxique directe des leptospires, une hyperbilirubinémie, un phénomène de rhabdomyolyse, et une hypovolémie [567].

Zaragora *et al.* [565] ont montré l'excrétion urinaire d'IgG et d'IgA chez des chiens atteints de leptospirose alors que ces protéines ne sont pas présentes chez des animaux sains. L'étude montre une augmentation de 36,7% de l'excrétion des protéines de faible poids moléculaire chez les chiens infectés. Ces résultats montrent que la leptospirose canine est principalement caractérisée par une néphrite interstitielle [565]. Cependant, Ortega-Pacheco *et al.* [337] ont démontré que chez le chien, l'atteinte rénale la plus fréquente est la glomérulonéphrite mésangio-proliférative, la seconde lésion la plus fréquemment observée dans cette étude étant la néphrite interstitielle. Chez certains chats infectés naturellement, une néphrite interstitielle et une glomérulonéphrite sont aussi décrites [502].

La pathogenèse de l'infection naturelle par *Leptospira* chez les rats n'a été que très peu étudiée. Récemment, de Faria *et al.* [568] ont montré que dans une population de rats sauvages ayant une prévalence élevée de portage rénal, l'observation d'une néphrite interstitielle ne pouvait être attribuée à la maladie car l'inflammation est observée à la même fréquence chez les animaux infectés ou non infectés. Ainsi, l'étude de l'infection naturelle est complexe car de nombreux facteurs environnementaux (y compris d'autres infections) peuvent induire des pathologies rénales chez les rats sauvages qui ne peuvent être différenciées de la pathologie induite par *Leptospira* [568].

Par conséquent, la protéinurie observée chez les rats, chiens et chats porteurs de leptospires au niveau rénal est probablement directement liée à la présence de la bactérie au niveau des tubules contournés proximaux et à l'excrétion des IgG dirigées contre la bactérie. Néanmoins, chez ces animaux sauvages, nous ne pouvons négliger la probable présence d'infections concomitantes qui pourraient être responsables d'une augmentation de l'excrétion urinaire de protéines.

Enfin, l'analyse statistique montre que la présence de corps cétoniques est plus fréquente chez les animaux porteurs de *Leptospira* que chez les animaux sains. Or, la présence de corps cétoniques dans les urines peut être le résultat d'un régime alimentaire

déséquilibré ou d'une famine chez les carnivores [433] et le rat [569], biaisant alors le lien statistique établi avec la maladie. De plus, la présence de bilirubine, marqueur de souffrance hépatique, peut causer des résultats faussement positifs.

2.4. Transmission de la leptospirose de l'animal à L'Homme à La Réunion

La contamination *via* l'environnement est majoritaire chez l'Homme, en particulier en zone tropicale [570] car l'environnement y est favorable à la survie et au maintien des leptospires [13]. De plus, la saison des pluies induit une saisonnalité de la maladie (**Article 1**). A La Réunion la persistance et la transmission de la bactérie sont probablement plus avantageées à l'est qu'à l'ouest de l'île, car favorisées par l'abondance de la pluviométrie de cette région [157, 194]. Notre étude n'a pas mis en évidence de différence significative entre l'est et l'ouest dans séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les petits mammifères sauvages et les carnivores errants.

La séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les micromammifères sauvages et les carnivores errants ne semblent pas dépendre de la zone géographique et la transmission se fait donc probablement préférentiellement par voie directe. Le climat pluvieux de l'est de La Réunion favorise le maintien de la bactérie dans l'environnement et par conséquent la transmission indirecte de *Leptospira* à l'Homme [75, 88, 202].

La **Figure 31** et la **Figure 32** permettent de comparer les différents sérogroupes mis en évidence par MAT chez les animaux (toutes espèces confondues, données de 2009) et l'Homme (données sérologiques compilées de 1998 à 2009 [412]). Le séroroupe Icterohaemorrhagiae est le séroroupe responsable de 59,3% des cas cliniques chez l'Homme à La Réunion ; chez les animaux, il représente 20,2% des sérogroupes retrouvés chez les animaux. Les rats (et probablement les souris et les musaraignes) sont les sources principales de l'infection humaine (directe et indirecte) par le séroroupe Icterohaemorrhagiae à La Réunion.

Le séroroupe Canicola est rapporté dans 12,1% des infections animales et c'est le deuxième séroroupe d'importance chez l'Homme (17,5% des infections humaines). Le réservoir principal de ce séroroupe semble être le chien, mais les rats jouent aussi très

probablement le rôle de réservoir. Sejroe est responsable de 12,1% des infections chez les animaux et de 5,4% des infections chez les patients réunionnais. Ce séro groupe est principalement hébergé par l'espèce bovine qui en est le principal réservoir, mais les rats et le chien peuvent aussi servir d'hôtes.

Panama et Pyrogenes sont principalement retrouvés chez trois espèces d'animaux de rente : les caprins, les cerfs Rusa et les porcins. Ces deux sérogroupe sont responsables respectivement de 32,4% et 13,9% des infections chez les animaux. Or, chez l'Homme, ils ne comptent que pour 0,2% et 1,4% des infections. Il y a donc un déséquilibre entre la prévalence des sérogroupe Panama et Pyrogenes chez les animaux et chez les patients. Deux hypothèses peuvent expliquer ce déséquilibre : 1/ la fréquence de transmission à l'Homme de *Leptospira* par les caprins, porcins et cervidés est très faible ; 2/ les infections de l'Homme par les sérogroupe Panama et Pyrogenes induisent des formes asymptomatiques et ne sont pas diagnostiquées, comme cela est décrit au Cambodge et au Mexique [232, 549].

Les sérogroupe Cynopteri et Tarassovi sont retrouvés chez les animaux, chacun à hauteur de 1,7% des sérogroupe circulant identifiés par MAT. Cynopteri circule chez le rat noir et le porc, tandis que Tarassovi circule chez les chiens et les bovins. Chez l'Homme, ces deux sérogroupe représentent respectivement 0,7% et 5% des sérogroupe retrouvés lors de formes cliniques.

Quatre animaux (2,3%) ont été trouvés séropositifs pour les sérogroupe Mini et Ballum. Le séro groupe Ballum ne fait pas partie du panel d'antigènes utilisé pour le diagnostic des cas humains ; au contraire, Mini est utilisé en routine au laboratoire de diagnostic, mais la souche que nous avons utilisée pour la recherche d'anticorps chez les animaux était différente de celle utilisée en médecine humaine. *Mus musculus* est généralement réservoir du séro groupe Ballum [281, 483, 492, 571, 572] qui peut aussi être retrouvé chez les rats [483, 492, 572]. Nos résultats ne permettent pas d'affirmer que les sérogroupe Ballum et Mini circulent à La Réunion. Mais si tel était le cas, ces sérogroupe semblent avoir une importance mineure.

Les sérogroupe Autumnalis et Bataviae sont retrouvés chacun chez un animal et ne sont jamais diagnostiqués comme responsable de l'infection chez l'Homme. Les titres en anticorps retrouvés chez les animaux sont faibles (100) pour ces sérogroupe et résultent probablement de réactions non spécifiques.

Le séro groupe Wolfii (4,7% des réactions séropositives chez les patients) n'était pas inclus dans notre panel d'antigènes. Aucun animal n'a été trouvé séropositif pour les sérogroupe Hebdomadis, Australis, Pomona, Wolfii et Grippotyphosa alors qu'ils semblent

circuler chez l'Homme, néanmoins, chez les animaux ayant un résultat sérologique "non déterminé" des anticorps contre les sérogroupes Hebdomadis, Australis, Pomona et Grippytyphosa ont été retrouvés. Nous pensons que les agglutinations retrouvées chez les patients et les animaux contre ces sérogroupes minoritaires sont des réactions non spécifiques plutôt que le reflet d'infection par ces sérogroupes.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur les réservoirs potentiels des sérogroupes mineurs sur l'île. En ce qui concerne les sérogroupes principaux circulant à La Réunion (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Sejroe) nos résultats permettent d'identifier les espèces réservoirs, sources de contamination pour l'Homme.

A La Réunion, il existe un cycle de transmission rural (**Figure 33**), un cycle de transmission urbain (**Figure 35**) et un cycle sylvatique (**Figure 34**). Ces trois schémas épidémiologiques font intervenir des espèces différentes dont la contribution à la contamination environnementale (et donc à la contamination potentielle de l'Homme) varie en fonction de la densité de ces populations dans les différents écosystèmes, des souches impliquées, de la prévalence du portage rénal de *Leptospira* et de la charge bactérienne rénale retrouvée chez ces espèces.

A La Réunion, comme dans de nombreuses autres régions du monde, on observe une fragmentation des habitats naturels qui conduit à l'intrusion des hommes et de leurs espèces animales domestiques (chevaux, bovins, chiens, chats) dans des écosystèmes autrefois sauvages. Ces changements écologiques favorisent l'émergence des maladies infectieuses en mettant les humains en contact avec de nouveaux réservoirs ou agents infectieux. Les chauves-souris [573], les rats [574] et autres micromammifères [575] répondent très bien aux modifications, à la perte, et à la fragmentation de leur habitat, leur dynamique spatiale et temporelle sont particulièrement sensibles aux changements d'activités anthropiques. Les conséquences de l'altération de la dynamique spatiale et temporelle sur l'écologie de la leptospirose et les probabilités de transmission à l'Homme sont peu connues. Néanmoins, les activités humaines dans des aires non perturbées au préalable peuvent augmenter directement ou indirectement le risque d'infection par de nouveau sérovars.

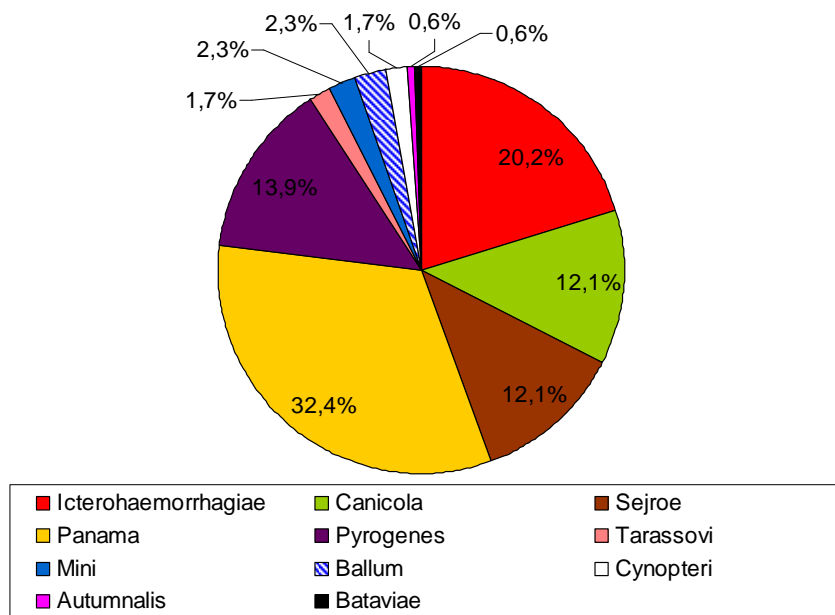


Figure 31 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 173 animaux séropositifs à La Réunion (prélèvements faits en 2009).

Le graphique représente les sérogroupes circulant chez l'ensemble des espèces étudiées par sérologie : rat noir, rat surmulot, tenrec, chat, chien, bovin, caprin, cerf Rusa, porc. Dans notre étude, 51 animaux étaient séropositifs pour plusieurs sérogroupes et ne sont pas représentés sur ce graphique.

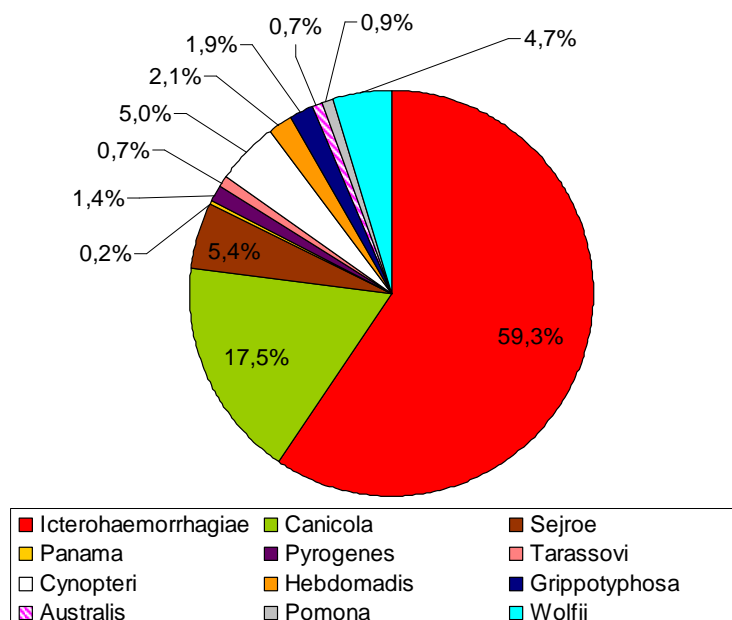


Figure 32 : Pourcentages relatifs des sérogroupes mis en évidence par MAT chez 423 patients diagnostiqués à La Réunion entre 1998 et 2009 (données du CNRL).

Pour cette même période, 253 autres cas ont été diagnostiqués par PCR ou par MAT, avec des agglutinations pour plusieurs sérogroupes ne permettant pas de définir le séro-groupe infectant.

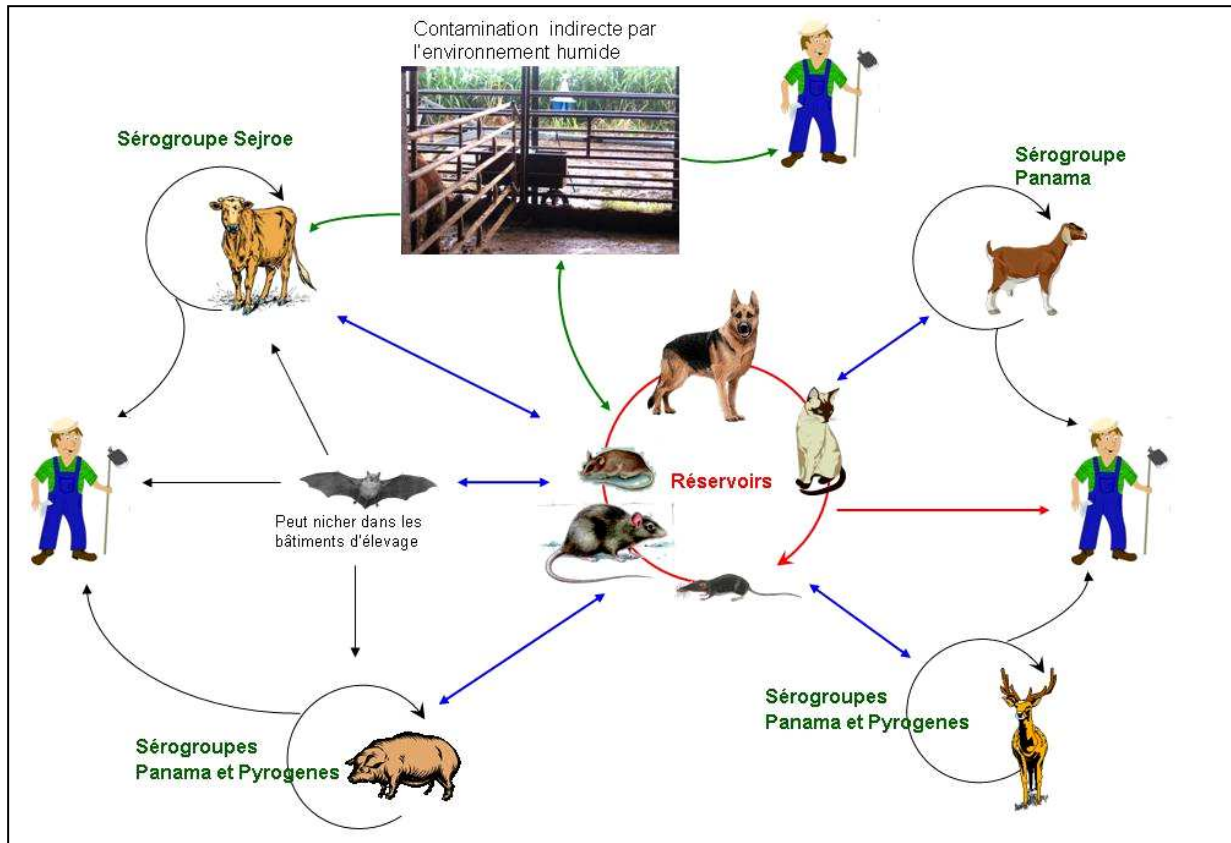


Figure 33 : Voies présumées de transmission rurale de *Leptospira* à La Réunion.

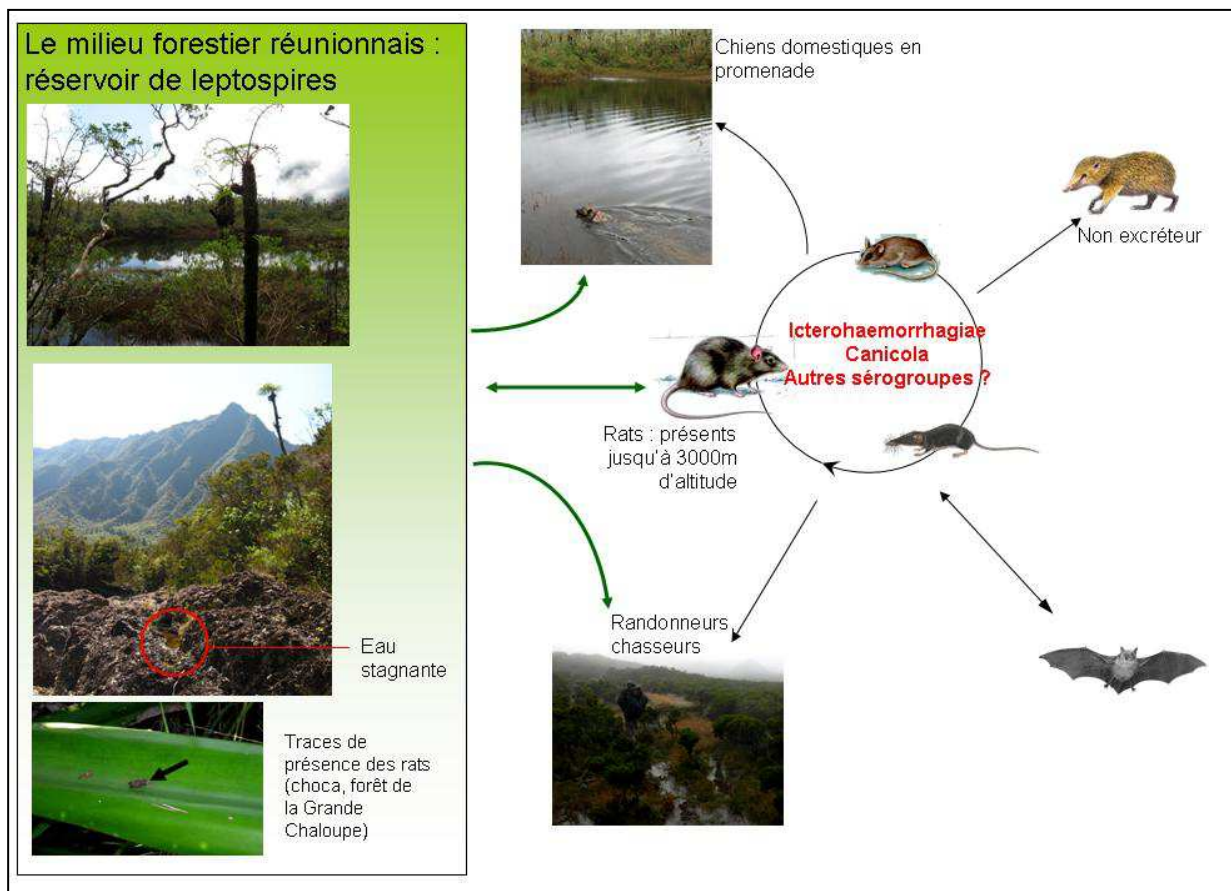


Figure 34 : Voies présumées de transmission sylvatique de *Leptospira* à La Réunion.

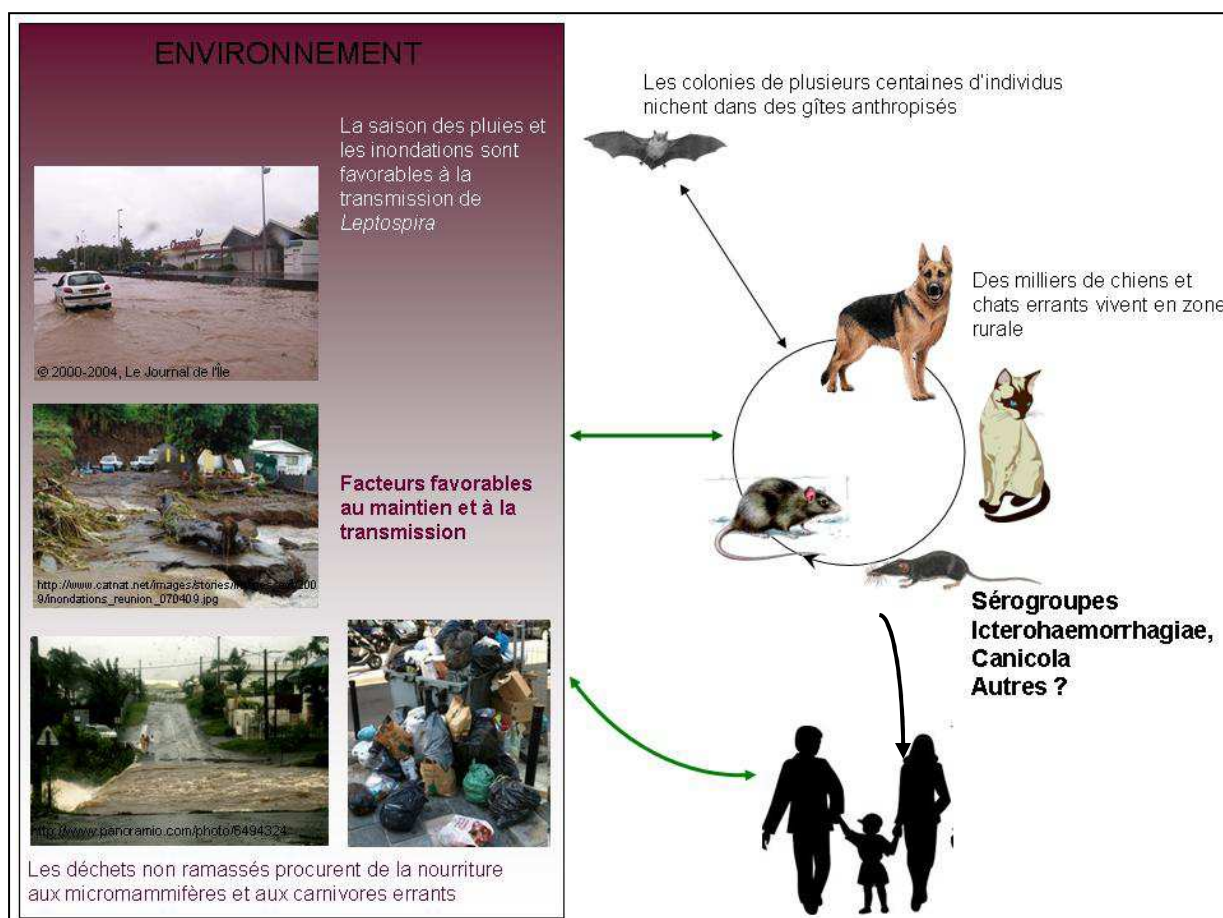


Figure 35 : Voies présumées de transmission urbaine de *Leptospira* à La Réunion.

3. Publication des résultats

Article 4 : Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A. 2012. Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). *Epidemiology and Infection* (soumis).



Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean)

Journal:	<i>Epidemiology and Infection</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	DESVARIS, Amélie; CIRAD, UMR CMAEE; GHSR/CHD, Laboratoire de parasitologie-virologie-bactériologie-hygiène Naze, Florence; GHSR/CHD, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène Benneveau, Aurore; CIRAD, UR HortSys Cardinale, Eric; CIRAD, UMR CMAEE; CRVOI, Michault, Alain; GHSR/CHD, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène
Keyword:	Leptospirosis, Epidemiology, Zoonoses, Veterinary epidemiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island
(Indian Ocean)**

A. DESVARS^{1,2,3}, F. NAZE³, A. BENNEVEAU⁴, E. CARDINALE^{1,2}, A. MICHAULT³

¹UMR CMAEE, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Sainte-Clotilde, Reunion Island, France

²Centre Régional de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, Reunion Island, France

³Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint-Pierre, Reunion Island, France

⁴UR HortSys, CIRAD, Saint-Pierre, Reunion Island, France.

*Corresponding author: amel.desvars@gmail.com

Phone: (+ 33)692 72 35 20; Fax: (+33) 262 49 92 95

Address: CIRAD Station La Bretagne, BP 20, 97408 Saint-Denis Messageries Cedex 9

Running head: Animal leptospirosis in Reunion Island

SUMMARY

Leptospirosis is the most important infectious disease in humans in Reunion Island but nothing is known about the animal reservoir. A wide-ranging survey was conducted that analyzed samples from 574 animals belonging to 12 species. Results showed that the seroprevalence of leptospirosis and prevalence of the renal carriage were unexpectedly high and varied greatly regarding species. The origins of the island colonization could explain that circulating serogroups found in each species were similar to that found in Europe. We quantified for the first time the concentration of leptospire in the kidney of naturally infected mammals and showed that the average renal leptospiral loads were not significantly different between ten carrier species. Results suggest that rodents are likely the most important reservoirs in Reunion Island. The link between animal reservoir and human infections is discussed, but besides the zoonotic importance of leptospirosis, our study is of veterinary and economical significance.

Keywords: Leptospirosis, Reunion Island, zoonosis, quantitative qPCR, epidemiology

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Leptospirosis has been reported in more than 150 mammalian species [1]. The disease is maintained by the persistent colonization of the proximal renal tubules of carrier animals. A reservoir animal can remain symptom-free and shed infectious *Leptospira* in its urine for a transient period or for its entire lifetime [2, 3]. Human contamination results from contact, either direct or *via* the environment, with infected animal urine and the prevalence of the different strains of *Leptospira* in a human population depends strongly on the reservoir hosts locally present and the strains they carry, as well as contacts between humans and fauna, ecological conditions, and cultural and agronomical practices [4].

Reunion Island is a French tropical overseas department located in the Indian Ocean. With an annual incidence rate 27 times more than that observed in metropolitan France [5], leptospirosis is an understudied major public health problem in this developed island.

The only native mammals are bats but since the start of the human colonization, settlers progressively introduced from Europe farm animals (cattle, goat, pig, sheep), horses, and game such as the Rusa deer or the tenrec, but domestic species such as dogs and cats are also present. The ship rat, the Norway rat, the mouse, and the shrew were accidentally introduced by boat. Locally, preventive measures against leptospirosis focus on rat control only and the existence of other potential reservoirs remains unknown and consequently neglected. The last data on animal leptospirosis on Reunion Island date from the 80s [6, 7], thus one of the aims of this work was to conduct a field-to-laboratory survey in order to update data relating to animal leptospirosis on Reunion Island. To achieve this, we firstly conducted a transversal survey to estimate the seroprevalence of leptospirosis and the circulating serogroups in ten animal species. Secondly, we used quantitative PCR to study the prevalence of the renal infection at the time of the sampling. As far as we know, this is the first quantification of the concentration of leptospire in kidney tissue of naturally infested animals. Data detailing the

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK³

1
2
3 leptospiral status of the animal species living close to humans represent the first step in
4
5 planning effective control measures to protect humans and therefore, these data need to be
6
7 regularly updated to adapt preventive measures to potential epidemiological changes.
8
9
10

11 12 13 METHODS

14 15 16 Field methods

17
18 Animal captures were conducted between 12th February and 20th August 2009 on Reunion
19
20 Island. Black rats (*Rattus rattus*), Norway rats (*R. norvegicus*), mice (*Mus musculus*) and
21
22 shrews (*Suncus murinus*) were trapped in the field using baited-live traps laid overnight
23
24 (Manufrance[®] traps for rats and INRA[®] traps for mice and shrews). Tenrecs (*Tenrec*
25
26 *ecaudatus*) were captured by local hunters during the official hunting period (prefectural
27
28 decree n°1268 dated 30th May 2008). Small mammals (rats, shrews, mice, and tenrecs) were
29
30 euthanized by injection of pentobarbital, following the recommended procedure [8] and blood
31
32 was collected by cardiac puncture. Stray dogs and cats were captured by employees from the
33
34 pound, euthanized by the veterinary services using an intravenous pentobarbital overdose
35
36 (Doléthal[®]), and blood was sampled from the cephalic vein. Cattle, goats, deer (*Rusa*
37
38 *timorensis*), and sows, were blood-sampled at the carotid artery when bleeding and kidney
39
40 samples were collected at the evisceration and inspection area of the slaughterhouse. Kidneys
41
42 were removed aseptically after capsule removal and immediately after death.
43
44
45 Free-tailed bats (*Mormopterus francoismoutoui*) were trapped at nightfall using black nylon
46
47 japanese mist net (Bonardi, 110D, mesh of 16 mm, 12 m long, 2.4 m high, five pockets), and
48
49 released immediately after urinary sampling. Blood sampling was not carried out on bats as
50
51 the individual blood quantity required for MAT would be lethal. Bat urine was collected
52
53 directly after capture at the urethral opening using a sterile rayon swab.
54
55
56
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁴

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Just after sampling, blood was centrifuged and serum was conserved at -80°C. Urines were neutralized with an approximately equivalent volume of phosphate-buffered saline (PBS) [9] and frozen at -80°C. Rayon swabs with urine samples were placed into transport media, and vortexed before being frozen at -80°C.

Microscopic agglutination test

Sera were tested for the presence of anti-leptospiral antibodies using microscopic agglutination test (MAT) following standard procedures [10]. Seventeen reference strains belonging to fifteen serogroups were used as antigens in MAT (**Table 1**). We considered 1:100 the cut-point to positive sera. The serogroup with the highest titre was considered to be the presumptive infecting serogroup and serum with this result was classified as being infected with a single *Leptospira* serogroup. However, if two or more serogroups induced equally high titres, the animal was considered to be co-infected and the infecting serogroups were considered as "not determined".

Positive control and standard DNA construction

We cloned the 242-bp fragment of the *lipL32* gene of *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Wijnberg into the pGEM®-T Easy Vector (Promega) following the manufacturer's recommendations and using the primers LipL32-45F/LipL32-286R (**Table 2**) [11]. A 2-fold dilution series of the plasmid DNA was prepared to 10⁻¹² to test analytical sensitivity (determined by the number of plasmid copies that was detected 10 times out of 10 repetitions) of the real-time quantitative PCR (qPCR) and to construct the standard curve for DNA quantification of positive samples. DNA content was quantified using the QuantIt™ PicoGreen® kit (Invitrogen) using the LightCycler 2.0 System (Roche Diagnostics) following the manufacturer's recommendations. The *lipL32*-plasmid also served also as a positive control for each run.

1
2
3 The Fisher-Snedecor's test was used to compare the variances of the bacterial kidney load
4
5 between species. Data analysis was performed using the R statistical software [12].
6
7

8 **Internal control construction**

9
10 In order to control for the DNA extraction step and to detect the presence of PCR inhibitors in
11 the biological samples, an internal control (IC) was chosen regarding the following criteria:
12 the IC should be usable in the thirteen different studied animal species, the IC DNA sequence
13
14 should not match a pathogen which can infect animals, and the IC DNA sequence should not
15
16 share similarities with a *Leptospira* DNA sequence. Thus, the IC was constructed using the
17
18 63-bp sequence of the DNA polymerase gene of Varicella-Zoster Virus (VZV) isolated from a
19
20 human VZV-positive clinical sample and cloned into the pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)
21
22 using the primers VZV UP/VZV DP (**Table 2**) [13]. To identify the optimal concentration for
23
24 use in the qPCR, a 10-fold dilutions series of the IC ranging from undiluted till a 10⁻¹² fold
25
26 dilution were tested by qPCR. The optimal IC concentration was established on the criterion
27
28 that a reliable IC amplicon was always detected in the samples.
29
30
31
32
33

34 **Total DNA extraction**

35
36 DNA was extracted from 20-25 mg of cortex kidney tissue using the Dneasy[®] Blood and
37
38 Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. When adding the proteinase K,
39
40 we added 10 µl of the IC plasmid, at the optimal IC concentration. Thus, the IC was co-
41
42 purified with the sample DNA and can be detected as a positive control for the extraction
43
44 process.
45
46
47

48 **Gene amplifications by qPCR**

49
50 All real-time PCR were performed using the LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics). Detection
51
52 of *Leptospira* DNA was performed by a Taqman targeting the *lipL32* gene as previously
53
54 described by Stoddard *et al.*[11] (**Table 2**). Detection of amplifiable DNA (IC) in each sample
55
56
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁶

1
2
3 was performed in a separate qPCR using primers VZV UP/VZV DP, associated to the
4
5 hydrolysis probe VZV P (Table 2) [13].
6

7 **Sampling authorization and ethics statement**

8
9 Rats, mice and shrews are introduced invasive mammals on Reunion Island, thus no particular
10
11 authorization is required for their capture and study. Euthanasia of animals was conducted
12
13 following the recommended procedures of the Parliament and the Council of the European
14
15 Union [8]. This research adhered to the French legal requirements: articles R.214-93 and
16
17 R.214-99 to R.214-102 of the French Rural Code and Order dated 19th April 1988, giving the
18
19 authorization to experiment on living animals.
20
21

22
23 In France, the pound controls stray dog and cat populations. Euthanasia of stray dogs and cats,
24
25 and euthanasia of livestock (cattle, goat, sheep, deer, and swine), were conducted by the
26
27 veterinarians of the pound, and by the employees of the slaughterhouse, respectively, under
28
29 the responsibility and control of the local Veterinary Services. Livestock animals and stray
30
31 dogs and cats sampled were not euthanized for purposes of the study only. Euthanasia of stray
32
33 carnivores was conducted ethically and with respect of the French law n°99-5 dated January
34
35 6th, 1999 concerning "*dangerous and stray animals and protection of animals*". At the
36
37 slaughterhouse, a veterinary inspector controls that each animal that will be slaughtered is in
38
39 good health. Treatment of livestock respects the European Regulation n°1099/2009 dated
40
41 September 24th, 2009 and the French Order dated December 12th, 1997 defining "*the ethical*
42
43 *procedures concerning welfare, protection, immobilization, stunning, and euthanasia of*
44
45 *livestock animals at the slaughterhouse*". Our sampling was performed immediately after
46
47 death of animals. Our study received the agreement of the Health Veterinary Inspector, the
48
49 Director of the Veterinary Services of Reunion Island, the Director of the pound, and the
50
51 Director of the slaughterhouse of Saint-Pierre.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁷

1
2
3 Capture and sampling of the protected bat *M. francoismoutoui* required official authorization
4
5 (order dated February 17th, 1989 listing the protected species on Reunion Island). Thus, we
6
7 obtained an "Autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins
8
9 scientifiques de *Mormopterus francoismoutoui*", delivered on March 10th, 2009 from the
10
11 *Direction Régionale de l'Environnement* (DIREN) of Reunion Island. Sampling of the game
12
13 species *Tenrec ecaudatus* required official authorization of the *Direction de l'Agriculture et*
14
15 *de la Forêt* (DAF) and the agreement of the Hunting Federation of Reunion Island, that we
16
17 obtained on January 13th, 2009 (post n°BD/BF/012).
18
19
20
21

22 RESULTS

23 Animal data

24
25 A total of 574 animals belonging to twelve species were sampled. Ten individual urine
26
27 samples were collected in a small colony of free-tailed bats (*M. francoismoutoui*) located in a
28
29 house. Results of trapping showed that the three species of rodents are sympatric, but black rat
30
31 was the most common rodent caught, representing 85.1% of all sampled rodents, while mouse
32
33 counted for 9.9%, and the Norway rat for 4.9%. All but one of the pigs slaughtered during our
34
35 survey were 5 to 6-year-old reproductive sows. We analysed 462 sera by MAT, and 546
36
37 kidneys and 10 bat urine samples were screened for presence of leptospiral DNA. Mice,
38
39 shrews and bats were not blood sampled.
40
41
42
43
44
45

46 Serological results

47
48 None of the animals sampled was vaccinated against leptospirosis, thus, agglutinating
49
50 antibodies resulted from natural infection. We found that the seroprevalence varied
51
52 considerably depending of the species (**Figure 1**): the seroprevalence was the highest in
53
54 (Norway and black) rats with $79.5 \pm 9.3\%$ (58/73) of animal testing seropositive; followed by
55
56 the Rusa deer: $61.7 \pm 16,3\%$ (21/34); goats: $60.0 \pm 12,4\%$ (36/60); swine: $47.2 \pm 10.4\%$
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁸

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(43/89); stray dogs: $46.0 \pm 13.8\%$ (23/50); cattle: $34.0 \pm 9.9\%$ (30/88); stray cats: $26.6 \pm 15.8\%$ (8/30); and tenrecs: $15.7 \pm 11.6\%$ (5/38).

Serological results by species are summarized in **Tables 3 and 4**. Serogroup

Icterohaemorrhagiae represented 39.7% of all seropositive reactions in Norway and black rats (titres 100 to 3,200); serogroup Canicola was the second main serogroup in rats representing 15.5% of the seropositive reactions (titres 100-400). In tenrecs, the main circulating serogroup was Icterohaemorrhagiae (titres 200-800) but serogroups Canicola and Bataviae were also reported. Stray cats were more frequently seropositive to several serogroups (87.5%) and all antibody titres were low (≤ 400). Canicola was the most prevalent serogroup in stray dogs representing 43.5% of the seropositive animals (titres 100-800), while Icterohaemorrhagiae counted for 21.7% (titres 100-1,600). In cattle, 56.6% of positive animals had antibodies to serogroup Sejroe and titres reached 3,200. Panama was the main serogroup found in goats, Rusa deer, and pigs counting for 69.4%, 38.1%, and 37.2% of the seropositive reactions respectively. Pyrogenes was the second major serogroup found in these species, representing 16.6%, 23.8%, and 25.6% of the seropositive goats, Rusa deer, and pigs respectively. Antibody titres to *Leptospira* were low in goats, Rusa deer, and pigs (≤ 400) except two goats which presented titres equal to 800 and 1,600 to serogroup Pyrogenes.

Renal carriage

The sensitivity of our qPCR assay was 7,400 copies per ml. Since one leptospire contains an average of five genome equivalents [14], our analytical sensitivity was evaluated to 1-2 bacteria per μl (2.5-5 bacteria per reaction). From 541 kidney samples, 78 had inhibitors, thus, 463 kidneys were considered for the study of prevalence (**Figure 2**). None of the kidneys showed histological lesions. The renal carriage of *Leptospira* was most common in mice with $84.6 \pm 19.6\%$ (11/13) of positive animals; followed by rats: $65.9 \pm 10.3\%$ (54/82); shrews: $31.2 \pm 13.1\%$ (15/48); stray dogs: $29.2 \pm 19.3\%$ (7/24); stray cats: $28.6 \pm 18.2\%$ (6/21); goats:

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁹

1
2
3 26.5 ± 12.4% (13/49); Rusa deer: 18.8 ± 13.5% (6/32); cattle: 18.2 ± 8.7% (14/77); and sows:
4
5 15.6 ± 7.8% (13/83). No leptospiral DNA was detected in tenrec kidneys.
6
7

8 **Urinary shedding in bats (*M. francoismoutouï*)**

9
10 Eight out of ten individual urine samples of bat urine contained PCR inhibitors but the two
11
12 amplifiable urine samples were positive for presence of *Leptospira* DNA.
13
14

15 **Concentrations of leptospires in animal kidney tissue**

16
17 For one positive dog, and one positive mouse sample, leptospiral DNA concentration could
18
19 not be estimated, as it fell outside of the linear region of the standard curve. Mean
20
21 concentrations of leptospires in kidney tissue for each species are presented in **Table 5**. The
22
23 Fisher-Snedecor's test showed no species effect on the concentration of leptospires in kidney
24
25 tissue (p-value >0.05).
26
27
28
29
30
31

32 **DISCUSSION**

33 Often neglected, descriptive epidemiology is the first step prior to in-depth studies of
34
35 leptospirosis (i.e. molecular epidemiology, phylogenetic classification...). The aim of this
36
37 study was to update data on animal leptospirosis on Reunion Island. The epidemiological
38
39 investigation of 12 mammal species out of the 16 living on Reunion Island contributes to the
40
41 global knowledge of the disease at the international scale. Our results indicate that
42
43 leptospirosis is unexpectedly common among all wild and domestic mammals on Reunion
44
45 Island (**Figures 1 and 2**).
46
47

48 In the present study, the PCR-based detection of leptospiral DNA in a kidney or urine sample
49
50 was accepted as the final indicator of carrier or infectious status [15]. Because leptospires do
51
52 not colonize the kidneys of non carrier species [16], the detection of leptospires in kidney
53
54 samples is expected to be minimal if the species is not a carrier (~ 1%). Within a species, the
55
56 identification of more than 10% of animal with leptospiral DNA in their kidneys suggests that
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK¹⁰

1
2
3 this species is a reservoir host [17]. All mammals except tenrecs were found to be renal carrier
4
5 of *Leptospira* (**Figure 2**). The absence of leptospiral DNA in tenrecs' kidney and the low
6
7 seroprevalence (compared to other species) may indicate either that tenrecs are less exposed
8
9 than other species, or that they may be susceptible to infection but are probably not chronic
10
11 reservoirs of *Leptospira*. In contrast, our results showed that shrew could be renal carrier and
12
13 corroborated other studies reporting that this insectivore could act as a maintenance host for
14
15 *Leptospira* [18, 19]. We proved that stray carnivores could be renal carrier of *Leptospira*. If
16
17 dogs are known to be a zoonotic reservoir host of leptospirosis [20], the possibility of
18
19 persistent renal infection in cats by *Leptospira* is contentious [21-23]. Nevertheless, our
20
21 results showed unambiguously that cats could be renal carrier of leptospirosis and probably a
22
23 potential source of infection to humans. We suggest that stray dogs and cats may be exposed
24
25 to *Leptospira* via consumption of small infected mammals (rodents and shrews) which are
26
27 proven to be *Leptospira* carrier, and also by roaming in contaminated environments. The
28
29 observed significant prevalence of renal carriage in livestock (**Figure 2**) showed probably that
30
31 these animals are chronically infected and is of concern due to the zoonotic nature of the
32
33 disease. Widespread circulation of leptospirosis in livestock also has financial implications as
34
35 it may result in a decrease of milk quality and quantity, abortions, higher culling rates,
36
37 stillbirths, and deaths [24-26]. Productive and economical results in dairy and meat
38
39 production remain low in Reunion Island and the leptospirosis status of farm animals is rarely
40
41 or never explored. Here, we showed that this disease should be seriously taken into
42
43 consideration.

44
45
46 Considering that the bat *M. francoismoutoui* is a protected species, we chose to conduct non-
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
invasive sampling. The number of non-amplifiable bat urine samples (2/10) may indicate that
our technique of sampling used on bats was sub-optimal and that contamination by PCR
inhibitors occurred. Nevertheless, two bats were shown to be urinary shedder of *Leptospira*.

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK¹

1
2
3 Because of their abundance, and close contact with both domestic and wild animals and
4
5 humans, bats may be involved in the maintenance and transmission of leptospires on Reunion
6
7 Island [15, 27].
8

9
10 The carrier state was reported in 65.9% of rats which is close to that reported in Metro Manila
11
12 in Philippines (63%, n = 56) [28] but superior to that found in Madagascar in *R. rattus*
13
14 (30.8%, n=55) and *R. norvegicus* (48.9%, n=94) [19]. We reported a very high prevalence of
15
16 renal carriage in mice (84.6%) but such a prevalence have previously been reported in
17
18 Norway rats in Salvador, Brazil (80.3% of renal carrier, n = 142) [29]. Although our sample
19
20 size was limited, we believe that rats and mice are sources of leptospirosis transmission in
21
22 Reunion Island.
23

24
25
26
27 MAT is a serogroup- rather than a serovar-specific assay and because of the high degree of
28
29 cross-reaction that occurs between different serogroups, serological data should be used at the
30
31 population level rather than at an individual level [30]. We reported a high seroprevalence in
32
33 all of the studied species (**Figure 1**) suggesting that contacts with *Leptospira* are frequent. We
34
35 reported a higher seroprevalence of leptospirosis amongst rats than that reported commonly
36
37 [31, 32], except in the Philippines, where 92% of rats showed antibodies to *Leptospira* [28].
38
39 The presence of *Leptospira* antibodies has rarely been reported in cats [33, 34], but we
40
41 showed a seroprevalence of 26.6% among stray cats in Reunion Island. Most of seropositive
42
43 cats had antibodies to several serogroups showing that exposure to multiple strains is frequent
44
45 in this species. Icterohaemorrhagiae and Canicola were the main serogroups circulating in rats
46
47 and dogs. Our results corroborated recent findings reporting that rats could act as a reservoir
48
49 for serogroup Canicola [19, 35]. Interestingly, we observed that seroreactivity against
50
51 incidental serogroups, as Sejroe, Mini, or Cynopteri in rats, and Sejroe, Panama, Tarassovi or
52
53 Ballum in dogs (**Tables 3 and 4**) were less frequent and/or concentrated at low titres, which
54
55
56
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK¹²

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

suggests exposure rather than infection. Antibodies to serogroup Sejroe were most commonly found in cattle; other serogroups found in cattle were less frequent and presented low antibodies titres, suggesting that they resulted from past infections. Eight out of 17 seropositive cattle to serogroup Sejroe had antibody titres ≥ 800 showing probable recent infection [36]. Panama was found to be the most prevalent serogroup circulating in Rusa deer, goats, and pigs, whereas Pyrogenes was the second major serogroup in these species (**Table 3**) but titres were most commonly low (≤ 400) suggesting chronic or previous infection. High animal density and humid breeding conditions could explain the high seroprevalence of leptospirosis in farm animals and supposes early contamination.

Between 1998 and 2009, serogroup Icterohaemorrhagiae was reported in 59.3% of the human diagnosed cases on Reunion Island, serogroup Canicola was involved in 17.5% of them, Sejroe was involved in 5.4%, while Panama and Pyrogenes were reported in 0.2% and 1.4% of human infections respectively [5]. Considering our results, we considered that rats and stray dogs are probably the reservoir hosts for serogroups Icterohaemorrhagiae and Canicola, while cattle could be the major maintenance host for Sejroe. Two hypotheses could explain the unevenness between frequencies of these serogroups in humans and animals: either the frequency of transmission from pigs, goats, and deer to humans is low; or infections of humans by serogroup Pyrogenes and Panama are asymptomatic, as has been previously observed in Cambodia and Mexico [37, 38] and are therefore rarely diagnosed at the laboratory level. The main serogroups found in cattle (Sejroe), rats (Icterohaemorrhagiae), and dogs (Canicola) are also reported to infect the same European species. All of the farm and wild species living on Reunion Island originated from Europe [39], furthermore the introduced black rat is genetically similar to that found in Europe [40]. In consequence, considering that leptospires were most probably introduced on Reunion Island with the first

1
2
3 introduced animal hosts, it seems not surprising to find the same epidemiological patterns of
4
5 the disease than that reported in Europe.
6
7

8
9
10 To the authors' knowledge, the current study is the first which reports the quantification of
11
12 *Leptospira* in kidneys of non-laboratory mammals. We showed that the concentration of
13
14 leptospires in the kidney of carrier animals presented high inter-individual variations
15
16 (standard errors are shown in **Table 5**). High variations in the concentration of leptospires in
17
18 the urines of experimentally infected rats are described [41] as well as in those of naturally
19
20 infected deer [42]. Such variations could be related to variations in the concentration of
21
22 leptospires in the kidney tissue. Different factors could impact the renal concentration of
23
24 leptospires: the age of the infected animal [43], the anteriority of the infection, the infecting
25
26 strain [2], factors inherent in the host [43]. Statistical analysis showed that the average
27
28 concentration of leptospires in kidney tissue was not different among the ten carrier species
29
30 suggesting that the capacity of *Leptospira* to colonize kidney tissue may be similar for all the
31
32 species considered. Rats are resistant to *Leptospira* infection [2], our results suggest that
33
34 naturally infected animal belonging to different species have the same capacity to harbour
35
36 leptospires in their kidneys. These preliminary results constitute the first step to further
37
38 studies that will aim to evaluate the contribution of each species to environmental
39
40 contamination by *Leptospira* in the field. At the herd level, the quantification of leptospires in
41
42 kidneys of slaughtered animals could be correlated to indicators of herd productivity and
43
44 could help in the elaboration of veterinary control programs.
45
46
47
48
49
50

51
52 Reunion Island's relatively high incidence of leptospirosis may be related to several factors,
53
54 including its tropical climate, relatively high rainfall, and abundance of non native small-
55
56 mammal reservoir species with a lack of natural predators. Preventive measures should
57
58
59
60

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK⁴

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

include a collective fight against rodents and the control of animal roaming. Economically, knowledge of seroprevalence and carrier status of leptospirosis in livestock may be useful to improve sanitation and biosecurity on farms, thus to minimizing the exposure of livestock to reservoirs of infection such as dogs, cats, rodents or insectivorous mammals. On this tropical island, the environmental risk of transmission is very high, and risk of transmission should be considered at the ecosystem level rather than at the individual level. Knowledge on animal reservoir hosts involve in leptospirosis transmission at a small geographical scale contributes to a better understanding of the disease at a more global scale.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to I. Sanchez, S. Candat, T. Hue, T. Duval, B. Warren (University of Reunion Island), S. Boyer (IRD), E. Buffard (BNOI/ONCFS), S. Roué, J.-M. Probst (Parc National), R. Baronce (FDC974), and the hunters of the FDC974, for their help during the sampling in the field. We are also grateful to the veterinary services of Reunion Island, Pôle de Protection des Plantes (CIRAD Saint-Pierre), Pôle Elevage (CIRAD Saint-Pierre), the dog pound of Tampon, the slaughterhouse of Saint-Pierre and the slaughterhouse workers for their collaboration, and C. Goarant (Pasteur Institute of Noumea) for his helpful advices. We thank Pasteur Institute of Paris for providing reference strains for MAT, G. Bertil, M. Picard, J. Souprayen, G. Hoarau, and J. Gigan (GHSR) for technical support, and Frédéric Chiroleu for statistical support.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK¹⁵

- 1
2
3 (1) Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era
4 for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009; **7**: 736-747.
- 5
6 (2) Thiermann AB. The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira*
7 *icterohaemorrhagiae*. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 39-43.
- 8
9 (3) Leonard FC, *et al.* Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or
10 experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Veterinary Record* 1992;
11 **131**: 435-439.
- 12
13 (4) Bharti AR, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet*
14 *Infectious Diseases* 2003; **3**: 757-771.
- 15
16 (5) Epidémiologie de la leptospirose en France
17 (<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/LeptospiraF.html>). Accessed 17 November 2011.
- 18
19 (6) Moutou F. Enquête sur la faune murine dans le département de la Réunion: Rapport
20 DDASS; 1980.
- 21
22 (7) Debarbat F, Mollaret, H.H., Mailloux, M. Leptospiroses in the island of Reunion. II.
23 Animal leptospiroses [in French]. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1983; **76**:
24 736-743.
- 25
26 (8) Parliament and the Council of the European Union. *Directive 2010/63/UE of the*
27 *European Parliament and Council of 22th September, 2010 relative to the protection of*
28 *animals used for scientific purposes*. In: Union E, ed.: Official Journal, 2010: L 276/233-L
29 276/279.
- 30
31 (9) Lucchesi PMA, *et al.* Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by
32 PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004; **37**: 131-134.
- 33
34 (10) Faine S, *et al.* *Leptospira and leptospirosis*. Second ed. Melbourne, Australia:
35 MediSci, 1999: 296.
- 36
37 (11) Stoddard RA, *et al.* Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan
38 polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious*
39 *Disease* 2009; **64**: 247-255.
- 40
41 (12) R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*.
42 Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing, 2006.
- 43
44 (13) Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT. Rapid detection of Herpes Simplex virus
45 and Varicella-Zoster virus infections by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*
46 2003; **41**: 1565-1568.
- 47
48 (14) Bourhy P, *et al.* Comparison of real-time PCR assays for the detection of pathogenic
49 *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of*
50 *Clinical Microbiology* 2011; **49**: 2154-2160.
- 51
52 (15) Tulsiani SM, *et al.* The role of fruit bats in the transmission of pathogenic leptospire
53 in Australia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2011; **105**: 71-84.
- 54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- (16) Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Leptospirosis in wild animals. *Veterinary Quarterly* 1996; **18**: S149-150.
- (17) Cox TE, Smythe LD, Leung LKP. Flying foxes as carrier of pathogenic *Leptospira* species. *Journal of Wildlife Diseases* 2005; **41**: 753-757.
- (18) Kundin WD, *et al.* Suncus as a potential reservoir of leptospirosis: the blaming of the shrew. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1970; **1**: 270-274.
- (19) Rahelinirina S, *et al.* First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 2010; **5**: e14111.
- (20) Jimenez-Coello M, *et al.* Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in Southern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; **10**: 135-141.
- (21) Everard CO, *et al.* Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad: West Indies. *International Journal of Zoonoses* 1979; **6**: 33-40.
- (22) Fukushima H, *et al.* Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Leptospira* spp.) simultaneously in dogs and cats. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale B, Hygiene* 1985; **181**: 430-440.
- (23) Felt SA, *et al.* Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **84**: 420-425.
- (24) Langoni H, *et al.* Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 1999; **40**: 271-275.
- (25) Martins G, *et al.* Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2011; [Epub ahead of print].
- (26) Ramos ACF, Souza GN, Lilenbaum W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology* 2006; **66**: 1021-1025.
- (27) Bunnell JE, *et al.* Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **63**: 255-258.
- (28) Villanueva SYAM, *et al.* Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **82**: 889-898.
- (29) de Faria MT, *et al.* Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 2008; **108**: 1-5.
- (30) Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14**: 296-326.
- (31) Desvars A, Cardinale E, Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiology and Infection* 2011; **139**: 167-188.

- 1
2
3 (32) Collares-Pereira M, *et al.* Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira Island
4 (Azores). *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 1151-1157.
5
6 (33) Millan J, *et al.* Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in
7 Andalusia, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; **9**: 549-554.
8
9 (34) Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in
10 Scotland. *Journal of Small Animal Practice* 1996; **37**: 126-129.
11
12 (35) Doungchawee G, *et al.* Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand.
13 *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2005; **36**: 1516-1522.
14
15 (36) Adesiyun AA, *et al.* Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars,
16 implications for vaccination and public health. *Journal of Veterinary Medicine B* 2006; **53**:
17 91-99.
18
19 (37) Berlioz-Arthaud A, *et al.* Hospital-based active surveillance of human leptospirosis in
20 Cambodia [in French]. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 2010; **103**: 111-118.
21
22 (38) Vado-Solis I, *et al.* Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and
23 reservoirs in Yucatán, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2002;
24 **44**: 335-340.
25
26 (39) Cheke A. The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western
27 Indian Ocean oceanic islands. *Phelsuma* 2010; **18**: 38-69.
28
29 (40) Tollenaere C, *et al.* Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the
30 western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar.
31 *Journal of Biogeography* 2010; **37**: 398-410.
32
33 (41) Monahan AM, Callanan JJ, Nally J. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed
34 in urine of chronically infected hosts. *Infection and Immunity* 2008; **76**: 4952-4958.
35
36 (42) Subharat S, *et al.* Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to
37 detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand
38 farmed deer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011; **23**: 743-752.
39
40 (43) Nally JE, *et al.* Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus
41 chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infection and Immunity* 2005; **73**: 3251-3260.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLES

Table 1. Strains used as capture antigens in the MAT.

Species	Serogroups	Serovars	Reference strains
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van tinen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrech 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. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjo (hardjobovis)	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. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M 84
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun
<i>L. kirschneri</i>	Mini	?	Mayotte 2008/01925 ^a

^a Strains provided by the Pasteur Institute from Paris isolated from a patient in Mayotte.

Table 2. Primers and probes used for qPCR assays.

Target	Primer or hydrolysis probe ^a	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>Leptospira lipL32</i> gene	LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	
	LipL32-286R	GAACTCCCATTTTCAGCGATT	[11]
	LipL32-189P	AAAGCCAGGACAAGCGCCG	
<i>VZV DNA polymerase</i> gene ^b	VZV UP	CGGCATGGCCCGTCTAT	
	VZV DP	TCGCGTGCTGCGGC	[13]
	VZV P	ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC	

^a All probes were labelled with FAM at the 3' end and with TAMRA at the 5' end.

^b Gene bank accession no. AB059828-31 and X04370.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 3. Results of MAT conducted on animal sera from Reunion Island.

	Black rats	Norway rats	Tenrecs	Cats	Dogs	Cattle	Goats	Rusa deer	Pigs	Total
Icterohaemorrhagiae	22	1	3	0	5	0	0	2	2	35
Canicola	7	2	1	0	10	1	0	0	0	21
Sejroe	2	1	0	0	1	17	0	0	0	21
Panama	0	1	0	1	3	2	25	8	16	56
Pyrogenes	0	0	0	0	0	2	6	5	11	24
Tarassovi	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Mini	1	0	0	0	0	0	0	1	2	4
Ballum	0	0	0	0	2	1	0	0	1	4
Cynopteri	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3
Autumnalis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Bataviae	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Not determined ^a	19	1	0	7	0	6	4	5	9	51
Negative	14	1	33	22	27	58	24	13	46	238
Total	66	7	38	30	50	88	60	34	89	462

^a A serum showing agglutinations for more than one serogroup with no serogroup presenting a highest titre.

Table 4. Titres observed by MAT by species and serogroup. Minimum and maximum titres are presented. If one or two animals were seropositive to a serogroup, the titres are presented. Seropositive reactions to more than one serogroups are not included.

	Black rats	Norway rats	Tenrecs	Cats	Dogs	Cattle	Goats	Rusa deer	Pigs
Icterohaemorrhagiae	100-3,200	400	200-800	/	100-1,600	/	/	400	200, 400
Canicola	100-400	200, 400	100	/	100-800	200	/	/	/
Sejroe	100, 400	200	/	/	400	100-3,200	/	/	/
Panama	/	100	/	100	100	100	100-400	100-200	100-400
Pyrogenes	/	/	/	/	/	100	100-1,600	100	100-400
Tarassovi	/	/	/	/	200, 400	400	/	/	/
Mini	100	/	/	/	/	/	/	800	100, 400
Ballum	/	/	/	/	100	100	/	/	100
Cynopteri	3,200	/	/	/	/	/	/	/	100, 100
Autumnalis	/	/	/	/	/	/	200	/	/
Bataviae	/	/	100	/	/	/	/	/	/

Table 5. Mean leptospiral load in kidney tissue by species. The concentration of leptospire in kidney tissue was assessed by qPCR targeting *lipL32* gene in each carrier animal.

Species	Mean bacterial load \pm standard error (genome copies/mg kidney tissue)
Black rat	$5.7 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^7$
Norway rat	$7.8 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^3$
Mouse	$6.4 \times 10^6 \pm 8.5 \times 10^3$
Shrew	$2.1 \times 10^3 \pm 3.2 \times 10^3$
Stray dog	$1.9 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^3$
Stray cat	$4.3 \times 10^2 \pm 4.7 \times 10^2$
Cattle	$8.8 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^3$
Goat	$9.2 \times 10^2 \pm 7.8 \times 10^2$
Rusa deer	$2.9 \times 10^3 \pm 3.7 \times 10^3$
Swine	$8.6 \times 10^2 \pm 1.7 \times 10^3$

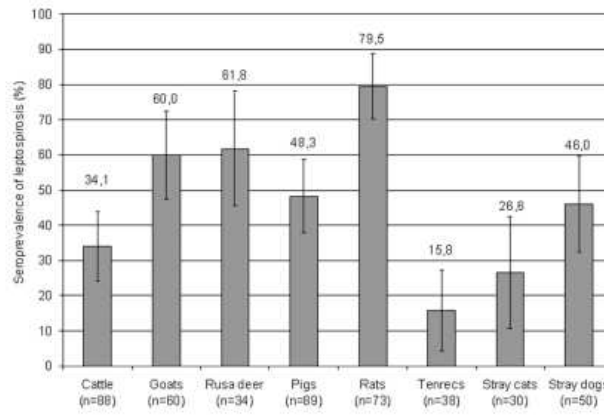
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Seroprevalence of leptospirosis (and standard error). Seroprevalence was assessed by MAT on eight animal species from Reunion Island.

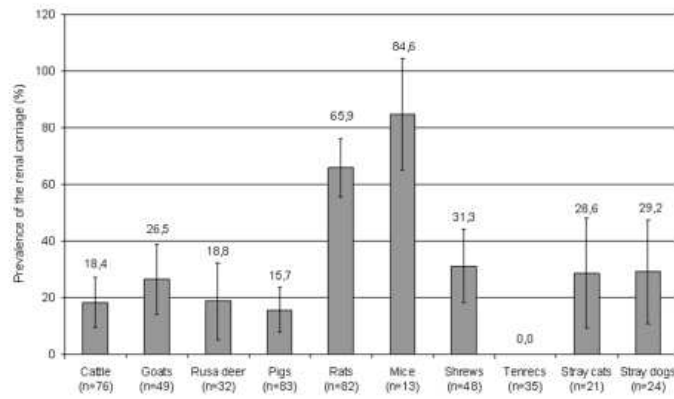
Figure 2. Prevalence of the renal carriage (and standard error). Presence of leptospire in kidney tissue was assessed by qPCR targeting *lipL32* gene on ten animal species from Reunion Island.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Seroprevalence of leptospirosis (and standard error). Seroprevalence was assessed by MAT on eight animal species from Reunion Island.
309x196mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Prevalence of the renal carriage (and standard error). Presence of leptospire in kidney tissue was assessed by qPCR targeting lipL32 gene on ten animal species from Reunion Island
309x196mm (72 x 72 DPI)



**CHAPITRE VII : EPIDEMIOLOGIE ET ECOLOGIE DE LA
LEPTOSPIROSE ANIMALE A MAYOTTE**



1. Rappel de la problématique

Le premier objectif de notre travail à Mayotte était de déterminer l'existence d'un lien entre les cas humains de leptospirose et un (ou plusieurs) animal (animaux) réservoir(s). Nous avons étudié pour la première fois à Mayotte la séroprévalence de la leptospirose chez quatre espèces animales pouvant vivre proche de l'Homme (rat noir, chien, lémur brun et roussette) par la méthode du MAT, en utilisant comme antigènes des souches isolées localement chez des patients (**Tableau 8**) [74, 229]. De plus, nous avons recherché la présence d'ADN de leptospires pathogènes dans les reins du réservoir le plus probable, le rat noir, par PCR quantitative en temps réel et avons comparé les séquences d'ADN des *Leptospira* présents chez ces rats avec celles des souches isolées chez les patients [74, 229].

Les données concernant le statut des animaux, réservoirs potentiels de la bactérie, sont un préalable essentiel à la mise en place de mesures de contrôle sanitaire efficaces à Mayotte où la maladie connaît une incidence élevée et présente chez l'Homme une épidémiologie très particulière. Les données de biologie moléculaire apportent un éclairage nouveau sur l'épidémiologie de la maladie sur cette île tropicale.

2. Résultats

1.1. Bilan des captures

Au total, 292 échantillons d'animaux (156 rats noirs, 50 lémurs bruns, 49 roussettes, 29 chiens domestiques et 8 chiens errants), prélevés entre le 29 mars et le 13 mai 2007²², ont été traités. Les analyses sérologiques ont été conduites en 2010 lors d'un stage à l'Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur de Paris (IPP), les qPCR ont été conduites en 2010-2011 à l'IPP et au GHSR de Saint-Pierre.

Pour 31 rats noirs, nous n'avons pas pu obtenir de prélèvement sanguin. Le rat surmulot est absent de Mayotte.

Les informations relevées pour chaque animal sont résumées dans le **Tableau 41**.

²² Projet de recherche ChikAni (INRA).

Pour les chiens domestiques, les motifs de consultation chez le vétérinaire sont résumés dans le **Tableau 42**. Parmi les chiens domestiques, 22/29 animaux présentaient une vaccination anti-leptospirosique à jour (primo-vaccination ou injection de rappel datant de moins d'un an). Pour sept chiens domestiques soit la vaccination n'était pas à jour, soit les animaux n'avaient jamais reçu de vaccin contre la leptospirose. La moyenne d'âge des chiens domestiques échantillonnés était de 4 ans.

Nous n'avons pas l'âge exact pour les autres espèces, mais seulement une estimation "adulte" ou "jeune".

Aucun animal prélevé ne présentait de signes cliniques susceptibles d'évoquer une infection en cours.

Les sites de capture sont cartographiés sur la **Figure 36**. La **Figure 37** illustre les captures de lémurs bruns et de roussettes.

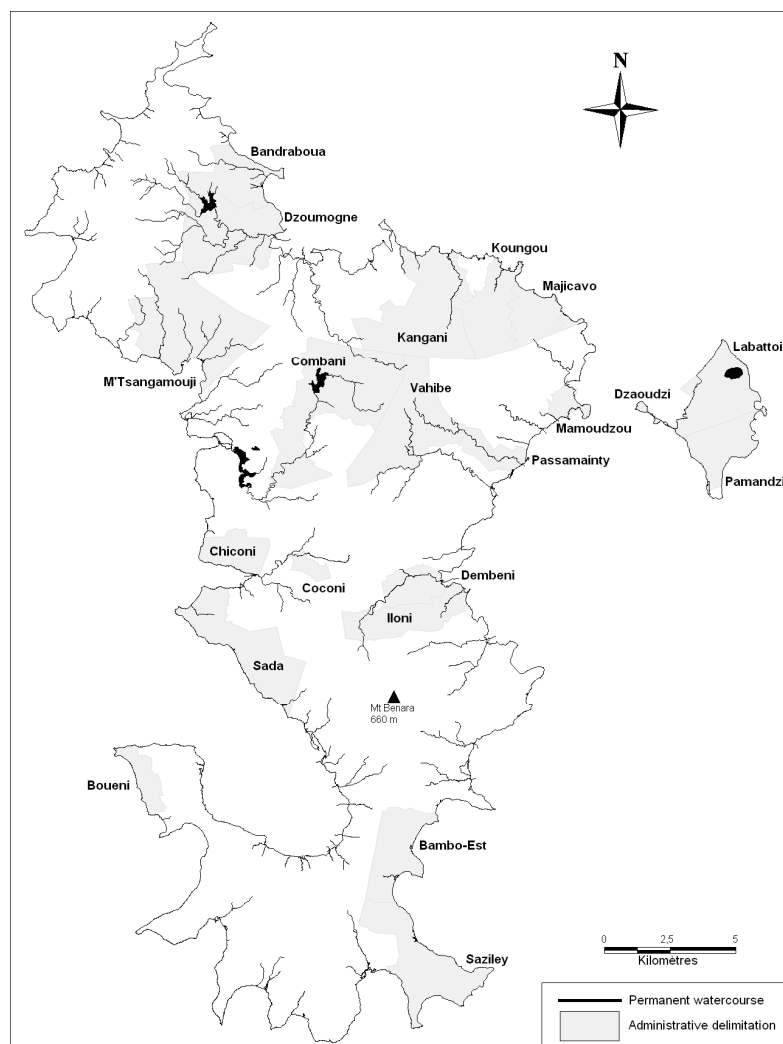


Figure 36 : Cartographie de Mayotte présentant les lieux de capture des animaux (Carte S. Girard, ADEM-GESAM/CIRAD).

Tableau 41 : Animaux prélevés à Mayotte en 2007.

Espèce	Nb total capturés	Nb femelles	Nb mâles	Sexe nd	Adultes	Juvéniles	Age nd	Poids moyen (±écart-type)	Poids min-max	Longueur corps (±écart-type)	Long. corps min-max (mm)	Lieu de capture (animaux sauvages) / Lieu de résidence (chiens domestiques)
Roussette	49	31	18	0	30	18	1	372,9 ± 116,8 g	161,0 - 629,0 g	na	na	Coconi (45), Saziley (4)
Lémur brun	50	25	25	0	41	8	1	1935,2 ± 399,9 g	950 - 2750 g	na	na	Coconi (28), Dzoumogne (5), Jimaweni (8), Mtsangamouji (2), Sada (1), Saziley (6)
Chien	37	12	15	10	34	3	8	na	na	na	na	Kangani (1), Boueni (3), Chiconi (1), Combani (1), Dembeni (1), Dzaoudzi (2), Dzoumogne (1), Iloni (1), Kangani (1), Koungou (3), Labattoir (5), Mamoudzou (6)
Rat noir	156	87	68	1	92	64	0	112,65 ± 36,46 g	25,0 - 216,0 g	170,0 ± 21,76 mm	99,0 - 210,0 mm	Bandraboua (16), Coconi (37), Bambo Est (46), M'Tsangamouji (22), Mamoudzou (1), Sada (1), Saziley (33)

Tableau 42 : Motif de la consultation vétérinaire pour les chiens domestiques échantillonnés à Mayotte en 2007 (données fournies par les vétérinaires).

Motif de la consultation	Nombre de chiens domestiques
Adoption	2
Anorexie	1
Certificat de bonne santé	5
Sérologie brucellose	3
Stérilisation	3
Sterilisation et vaccination	2
Dermatite suppurée	1
Tatouage et stérilisation	2
Vaccination	7
Pas d'information	3
Total	29



Figure 37 : Capture et prélèvements sur lémurs bruns et roussettes à Mayotte (ChikAni, 2007).

1.2. Résultats sérologiques

L'Annexe J présente les tableaux des résultats de sérologie par espèce, et de qPCR sur tissu rénal pour les rats noirs. Pour chaque espèce les résultats sont détaillés en fonction du sexe, de l'âge et, pour les chiens, du type d'animal (domestique ou errant) et du statut vaccinal.

Les résultats de séroprévalence sont résumés dans le **Tableau 43** et la **Figure 38**.

Tableau 43 : Séroprévalence de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte et intervalle de confiance à 95% (IC95%).

	N	N positifs	Séroprévalence (%)	IC95% de la séroprévalence
Rats noirs	125	14	11,2	5,7 – 16,7
Lémurs bruns	50	1	2,0	0,0 – 5,9
Roussettes	49	5	10,2	1,7 – 18,7
Chiens domestiques	29	27	93,1	83,9 – 100,0
Chiens errants	8	7	87,5	64,6 – 100,0

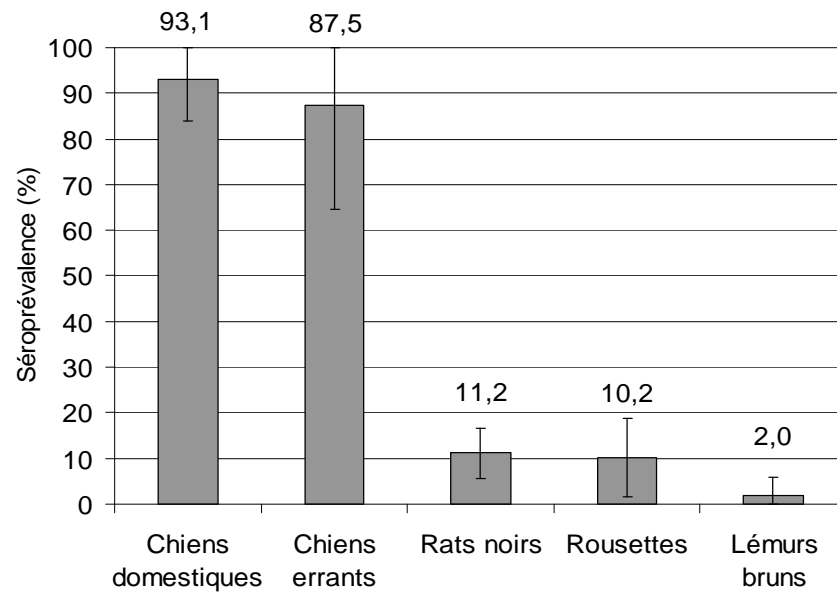


Figure 38 : Séroprévalence (et intervalle de confiance à 95%) de la leptospirose chez les animaux étudiés à Mayotte.

Le **Tableau 44** présente les résultats du MAT pour chaque espèce ou catégorie (vacciné/non vacciné, domestique/errant) d'animaux, tandis que la **Figure 39** représente graphiquement les résultats par séro groupe et par espèce.

Tableau 44 : Résultats du MAT et titres observés (entre parenthèses) chez les animaux de Mayotte.

Sérogroupe	Rats noirs (n = 125)	Roussettes (n = 49)	Lémurs bruns (n = 50)	Chiens domestiques vaccinés ¹ (n = 22)	Chiens domestiques non vaccinés (n = 7)	Chiens errants non vaccinés (n = 8)
Mini	7 (100-400)	-	-	-	2 (200, 800)	4 (200-6400)
Pyrogenes	1 (200)	4 (200-400)	1 (200-400)	-	-	1 (400)
Grippotyphosa	3 (100-1600)	1 (200)	-	-	-	-
Icterohaemorrhagiae	-	-	-	10 (100-12800)	1 (800)	-
Canicola	nd	nd	nd	1 (200)	1 (100)	2 (100)
Non déterminé ²	3	-	-	10	2	
Nombre total de séropositifs (%)	14 (11,2%)	5 (10,2%)	1 (2%)	21 (95,5%)	6 (85,7%)	7 (87,5%)

¹ Vaccination à jour (< un an).

² Animaux séropositifs à plusieurs sérogroupe sans que le titre pour un sérogroupe soit significativement supérieur aux autres titres (c'est-à-dire différent de deux dilutions au moins).

nd: non déterminé (non testé).

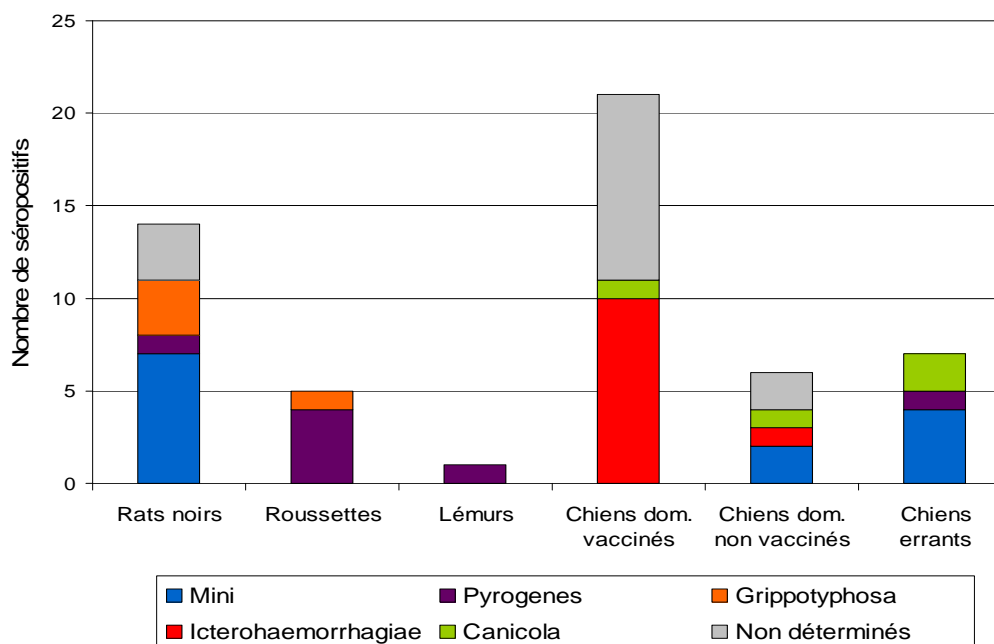


Figure 39 : Proportion des différents sérogroupes (déterminés par MAT) par espèce et catégorie chez les animaux étudiés à Mayotte.

Cinq *Pteropus* (10,2%) présentaient des anticorps anti-*Leptospira*, quatre étaient séropositives pour la souche 200901489, appartenant au séroroupe Pyrogenes (titres 200 à 400) ; une était séropositive pour la souche 201001128, appartenant au séroroupe Grippytyphosa, au titre 200.

Un seul lémur brun adulte était séropositif (2%), il présentait des agglutinations contre les souches 201001125 et 200901489 appartenant toutes deux au séroroupe Pyrogenes (titres 200 et 400 respectivement).

Sur les 22 chiens domestiques présentant une vaccination anti-leptospirose à jour :

- un seul entre eux était séronégatif ;
- dix animaux (45,5%) étaient séropositifs pour plus d'un séroroupe. Parmi ceux-là, huit étaient séropositifs pour les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola et deux animaux étaient séropositifs pour les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Mini simultanément : l'un de ces chiens présentait un titre en anticorps égal à 1600 contre Icterohaemorrhagiae et Mini (souches 200701203 et 200803703) ; l'autre chien avait aussi des anticorps contre le séroroupe Icterohaemorrhagiae et Mini mais à des titres inférieurs (400 et 800 respectivement) ;

- dix chiens étaient séropositifs pour le séro groupe Icterohaemorrhagiae avec des titres faibles (100) à élevés (12800) ;
- un seul était séropositif pour le séro groupe Canicola (titre 200).

La vaccination explique la forte séroprévalence et les titres élevés en anticorps observés chez ces chiens (le vaccin canin disponible sur le marché français contient les valences Icterohaemorrhagiae et Canicola).

Parmi les sept chiens domestiques jamais vaccinés ou dont la vaccination datait de plus d'un an, six chiens (85,7%) étaient séropositifs. Les réactions séropositives étaient dirigées contre les sérogroupe Icterohaemorrhagiae (1/6) au titre 800, Canicola (1/6) au titre 100 et Mini (2/6) aux titres 200 (souche 200701203) et 800 (souche 200803703).

Nous avons capturé huit chiens errants, parmi eux, sept étaient séropositifs (87,5%). Quatre chiens errants présentaient des anticorps contre le séro groupe Mini (souches 200701203 et 200803703) à des titres compris entre 200 et 6400, un était séropositif contre le séro groupe Pyrogenes (souche 201001127, au titre 400) et deux étaient séropositifs pour le séro groupe Canicola (titre 100).

Au total, 14/125 rats (11,2%) présentaient des anticorps contre *Leptospira*, parmi lesquels, trois (21,4%) avaient des anticorps pour plus d'un séro groupe :

- l'un d'eux avait des anticorps contre les sérogroupe Pyrogenes (souche 201001127) et Grippytyphosa (souche 200801774) à des titres de 100 ;
- le second avait des anticorps contre les sérogroupe Mini (souche 200701203) et Pyrogenes (souches 201001127 et 201001125) ;
- le troisième avait des anticorps contre les sérogroupe Mini (souche 200701203) et Grippytyphosa (souche 200801774) avec des titres de 400 et 800 respectivement.

Le principal séro groupe retrouvé chez les rats noirs était Mini (souches 200701203 et 200803703) avec 7/14 rats séropositifs, et des titres compris entre 100 et 400. Des anticorps contre le séro groupe Grippytyphosa (souches 201001128 et 200801774) ont été retrouvés chez trois rats (titres 100 à 1600) et un rat était séropositif pour le séro groupe Pyrogenes (souches 200901122 et 201001125, au titre 200).

1.3. Résultats de prévalence du portage rénal chez *R. rattus*

Quinze échantillons de tissu rénal n'ont pu être amplifiés par qPCR (pas d'amplification du contrôle GADPH dû à la présence d'inhibiteurs). La détection par qPCR a permis de montrer que 42/141 ($29,8 \pm 7,5\%$) des rats hébergeaient des leptospires pathogènes dans leurs reins. Tous les Cq étaient compris entre 31,5 et 39,7 cycles.

1.4. Résultats du séquençage

Vingt séquences (parmi les 42 reins de rats positifs pour la détection de la présence de *Leptospira* par qPCR) ont pu être amplifiées par PCR nichée. L'alignement des produits de séquençage avec des séquences connues (notamment des souches isolées chez des patients à Mayotte et typées [229]) ont permis d'identifier quatre espèces génomiques de *Leptospira* pouvant infecter les rats noirs : *L. borgpetersenii* (9/20 échantillons), *L. borgpetersenii* groupe B (2/20), *L. interrogans* (7/20), et *L. kirschneri* (2/20). L'alignement des séquences partielles de l'ARNr 16S des *Leptospira* identifiés chez *R. rattus* montre un fort pourcentage d'homologie avec les séquences des souches de *Leptospira* isolées chez les patients mahorais. L'arbre phylogénique construit avec les séquences partielles de l'ARNr 16S montre que les souches de *Leptospira* identifiées chez *R. rattus* sont génétiquement proches de celles isolées chez les patients mahorais (**Figure 40**).

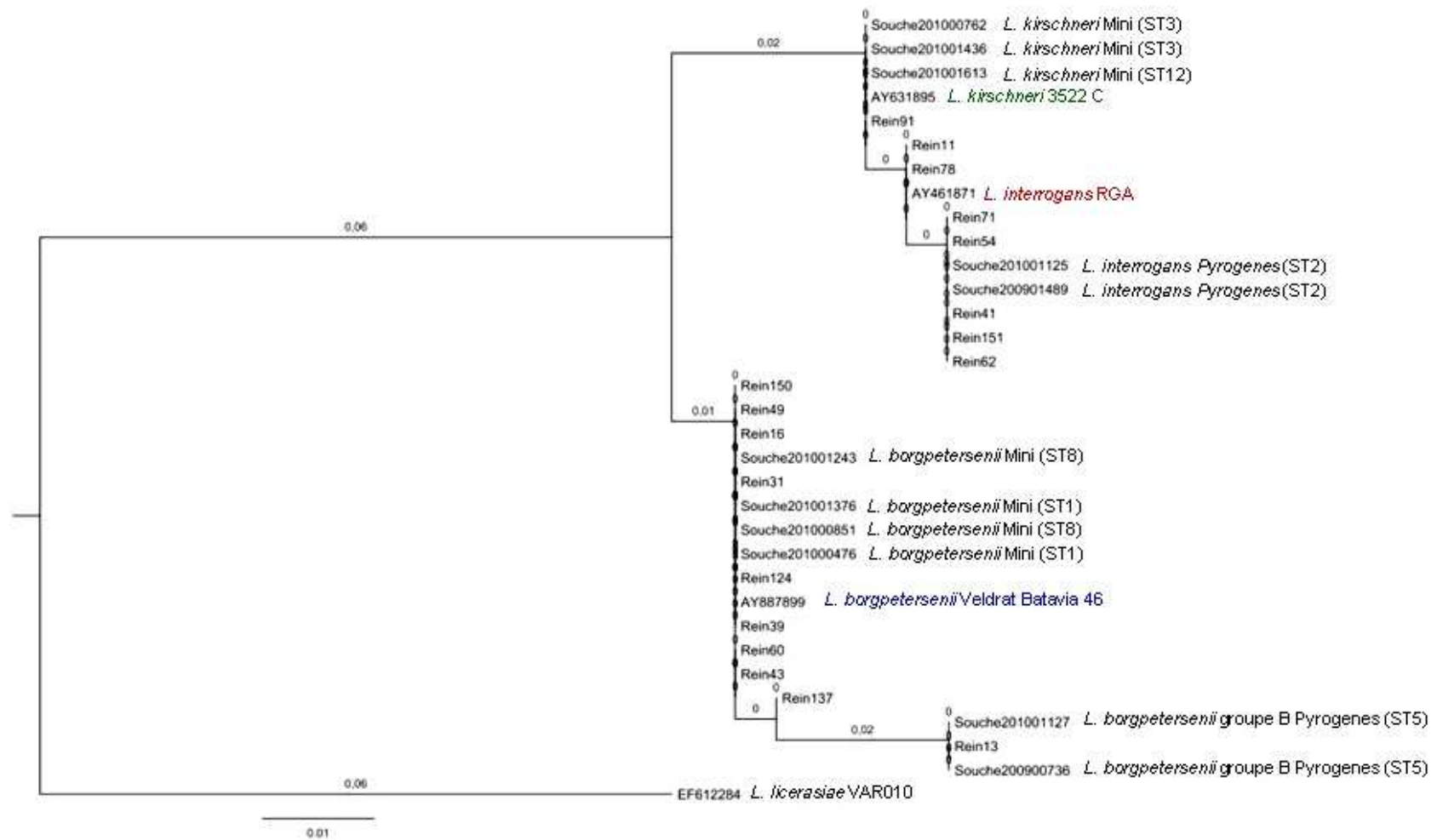


Figure 40 : Arbre enraciné sur *L. licerasiae* montrant les relations phylogénétiques entre des souches de références de *Leptospira* (en couleur), des souches isolées chez les patients mahorais (Souche X) et des souches identifiées chez les rats noirs à Mayotte (Rein Y).

3. Discussion

3.1. Animaux réservoirs

3.1.1. Populations animales étudiées, partage des écosystèmes

Les espèces animales étudiées ont été choisies parce qu'elles sont numériquement importantes à Mayotte et qu'elles vivent à proximité de l'Homme. S'il n'existe pas de données chiffrées sur la densité de la population de rats noirs sur l'île, on sait néanmoins que cette population est extrêmement importante.

La population de chiens est estimée entre 10 000 et 20 000 animaux (*Franck Charlier, communication personnelle*) ; lors de la campagne de prélèvements de 2007, nous avons pu observer que les chiens errants vivent en meute, dans la périphérie des villages, mais aussi en plein cœur de Mamoudzou, près de la décharge à ciel ouvert de Kaweni qui constitue une source de nourriture ; ils sont aussi présents sur les plages où ils peuvent se nourrir d'œufs de tortues marines.

Les lémuriers colonisent tous les milieux à Mayotte : 11% vivent en forêt non perturbée, 75% dans des forêts exploitées par l'Homme et 14% dans les zones agricoles. La population de lémons bruns, estimée entre 42 000 et 72 000 sur Grande Terre en 1999 [576], est aujourd'hui de l'ordre de 26 000 individus notamment à cause de la perte de l'habitat naturel dû à l'urbanisation grandissante de l'île [577].

Enfin, il n'existe pas de données quantitatives concernant le nombre de roussettes mais cet animal est très présent à Mayotte (*observations personnelles*), dans tous les milieux, même anthropisés, et son activité connaît un pic à la tombée de la nuit.

Le rat noir partage l'habitat du chien errant dans les zones urbaines et péri-urbaines. Les rats, les lémuriers et les roussettes se partagent l'habitat forestier et les zones agricoles, notamment les vergers où les trois espèces se nourrissent sur les arbres fruitiers. Les chiens domestiques peuvent avoir des contacts avec les rats ou d'autres chiens errants. Ainsi, s'il n'existe pas de relations trophiques entre ces quatre espèces sauvages (sauf peut être entre les chiens errants et les rats, les premiers se nourrissant très certainement des seconds), ils sont sympatriques dans la plupart des écosystèmes mahorais.

Ces quatre espèces animales vivent à proximité de l'Homme. Le rat noir est un commensal de l'Homme depuis le VIII^{ème} siècle à Mayotte [426], les lémuriens peuvent aussi être considérés comme des commensaux de l'Homme à Mayotte puisqu'ils rentrent dans les jardins, les habitations, peuvent se nourrir dans les poubelles...

3.1.2. Roussettes (*Pteropus seychellensis*)

Voir Annexe J, Tableau I.

Nos résultats montrent une séroprévalence de 10,2% (5/49) chez les roussettes ; les individus positifs présentaient des anticorps contre les sérogroupes Pyrogenes (4/5 séropositifs) et Grippytyphosa (1/5). Smythe *et al.* [578] rapportent une séroprévalence supérieure chez les quatre espèces de *Pteropus* d'Australie (*P. alecto*, *P. conspicillatus*, *P. scapulatus* et *P. poliocephalus*), avec 28% ($n=271$) de séropositifs chez les quatre espèces confondues. Australis était le séro groupe majeur, présent chez 75% des séropositifs. Toujours chez ces quatre espèces endémiques australiennes, Cox *et al.* [328] ont démontré que la prévalence du portage rénal était de 11% ($n=173$) tandis que l'excrétion urinaire a été démontrée chez 39% ($n=46$) des animaux. L'étude rapporte aussi que le pourcentage d'animaux porteurs de leptospires varie en fonction de l'espèce considérée : 16% chez *P. alecto*, 4% chez *P. conspicillatus*, 5% chez *P. poliocephalus* et 29% chez *P. scapulatus* [328].

La contamination des chauves-souris frugivores peut être directe, notamment au sein de la colonie, ces dernières pouvant contenir de fortes densités d'individus (10 à 5000 individus selon l'espèce de *Pteropus* considérée [579]) ; de plus, au sein de la colonie, les roussettes urinent sur leurs ailes et leur corps et se lèchent ensuite ; ce comportement, perçu soit comme un système de thermorégulation favorisant l'évaporation de la chaleur corporelle [579], soit comme un système de toilettage [578], peut aussi favoriser la contamination directe entre les individus. Une quantité assez importante d'urine peut s'accumuler sous les colonies, comme les leptospires sont capables de survivre plusieurs semaines dans un environnement humide, le sol sous la colonie peut être contaminé durablement [580]. Une étude récente de Tulsiani *et al.* [580] montre l'existence probable d'une voie de transmission de la leptospirose entre les chauves-souris frugivores et les rongeurs, *via* les contacts des rongeurs avec les urines de roussettes. Les contacts directs entre les Hommes et les chauves-souris frugivores sont rares, mais les *Pteropus* ne nichent pas seulement dans des sites

sauvages (arbres, grottes) mais peuvent aussi nicher dans des bâtiments au cœur des villages [579]. Par ailleurs, les roussettes se nourrissent pour une grande part sur des arbres fruitiers cultivés pour la consommation humaine, par exemple papayers, bananiers, goyaviers, arbres à pain, manguiers [579]. La proximité des roussettes et des Hommes peut constituer un facteur de risque de transmission à l'Homme.

Les chauves-souris de l'ordre des Pteropodidae sont des réservoirs naturels de maladies émergentes ou ré-émergentes [581, 582]. Elles sont notamment les hôtes réservoirs du virus Ebola en Afrique [583] ou des Henipavirus en Malaisie et en Australie [584]. La séroprévalence de la leptospirose est faible chez les roussettes à Mayotte. Néanmoins, le statut sérologique des roussettes n'est pas corrélé avec le statut de porteur rénal ou d'excréteur urinaire et une chauve-souris séronégative peut héberger des leptospires au niveau rénal [328]. Les roussettes peuvent constituer à Mayotte un réservoir privilégié pour *Leptospira* et participer au cycle épidémiologique de la bactérie [328]. Elles peuvent être des hôtes de choix pour le maintien de l'endémie et de la diversité génétique des leptospires sur l'île.

L'isolement de leptospires à partir d'urines ou de reins de *Pteropus* n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé et le rôle de ces animaux en tant qu'hôtes réservoirs de leptospires reste encore à explorer, aussi bien à Mayotte que dans les autres régions où le genre *Pteropus* est présent et où la leptospirose est une maladie d'importance sanitaire (Nouvelle-Calédonie, Australie, Seychelles, Thaïlande).

3.1.3. Lémurs bruns (*Eulemur fulvus*)

Voir Annexe J, Tableau II.

La possibilité d'une transmission de la leptospirose entre des primates non humains et l'Homme est actuellement inconnue. Notre étude est la seconde qui étudie la séroprévalence de la leptospirose dans une population de primates à l'état sauvage [585], les autres études sur les primates portaient en effet sur des animaux vivant en captivité [586-589] ou présentaient les résultats d'expérimentations animales [563, 590]. La seroprévalence rapportée chez les lémuriens de Mayotte dans notre étude est faible (1/50, soit 2%) comparée à celle rapportée chez les grivets (*Cercopithecus aethiops*) vivant à l'état sauvage à la Barbade (29,9% de séropositifs, $n=646$) [585]. Néanmoins, il semble que chez les primates non humains (lors d'infections expérimentales) la sensibilité à l'infection par *Leptospira* varie

selon l'espèce considérée : les capucins (*Cebus* sp.²³), le patas (*Cercopithecus/Erythrocebus patas*), le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et le vervet (*Cercopithecus aethiops*) ne montrent pas de signes cliniques [590], alors que le singe écureuil (*Saimiri sciureus*) et le marmoset (*Callithrix jacchus*) présentent les signes cliniques d'une atteinte aigüe, avec ictère et syndrome hémorragique [563, 587, 590]. Szonyi *et al.* [589] ont décrit une épidémie de leptospirose chez des capucins en captivité (le sapajou appelé *Cebus apella*, le capucin à front blanc *C. albifrons* et le capucin moine *C. capucinus*) et ont détecté par PCR la présence de leptospires dans le sang chez les animaux symptomatiques ; l'étude rapporte qu'en captivité ces singes sont plus exposés aux rats (source de contamination) qu'ils ne le seraient dans la nature. Baulu *et al.* [585] décrivent que la durée de vie des anticorps peut être longue, jusqu'à 2,5 ans chez les grivets infectés naturellement. Au contraire, à partir d'infections expérimentales, Minette *et al.* [590] ont décrit un déclin rapide des anticorps après la contamination.

A notre connaissance, notre étude est la première à explorer le statut du lémur brun vis-à-vis de la leptospirose, nous ne disposons par conséquent d'aucune donnée quant à la sensibilité de cette espèce à la maladie. Le lémur brun est une espèce principalement arboricole mais ils peuvent descendre au sol pour boire ou ramasser des fruits [591].

Nous pensons que la faible séroprévalence chez les lémuriens de Mayotte peut être, en partie, expliquée par le mode de vie majoritairement arboricole de ces animaux et le peu de contacts qu'ils ont avec l'eau ou le sol contaminé.

Par ailleurs, il est aussi possible que cette espèce soit sensible à l'infection par *Leptospira* et que l'infection soit létale chez les individus infectés.

La source primaire de l'infection chez les lémuriens est probablement le rat, mais une transmission entre lémuriens pourrait contribuer au maintien de la maladie dans cette population [585, 589], et pourquoi pas entre lémuriens et roussettes qui partagent l'écosystème forestier et peuvent s'alimenter sur les mêmes arbres fruitiers.

Cette étude préliminaire sur la leptospirose chez les lémuriens de Mayotte nécessite des recherches supplémentaires, il faut notamment évaluer la sensibilité de ces animaux à la

²³ Le nom de l'espèce n'est pas précisé dans l'article.

maladie (noter les mortalités inexplicables en milieu naturel par exemple, faire des autopsies, voire des prélèvements sur les cadavres), rechercher la présence de leptospires dans les urines, et faire une étude de séroprévalence à plus large échelle.

L'étude du lémur brun et de la roussette de Mayotte reste difficile, d'abord parce que la capture de ces animaux sur le terrain nécessite des compétences humaines et des moyens matériels spécifiques, ensuite, parce qu'étant des espèces protégées, la capture des lémuriens et des roussettes est soumise à l'obtention d'une autorisation et l'exportation des prélèvements de leur pays d'origine vers leur pays d'importation ne peut se faire sans les permis officiels de la CITES.

3.1.4. Chiens

Voir Annexe J, Tableau III.

Les chiens errants sont considérés comme non vaccinés, les anticorps mis en évidence résultent donc d'infection naturelle. Au contraire, 22 chiens étaient vaccinés contre la leptospirose. Sept chiens domestiques n'étaient pas vaccinés.

Le vaccin canin disponible en France induit une immunité contre les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola. Presque tous les chiens domestiques vaccinés (21/22, soit 95,5%) étaient séropositifs. La vaccination explique que huit d'entre eux étaient séropositifs pour les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola. Les taux d'anticorps observés chez les chiens vaccinés sont très élevés, avec des titres pouvant atteindre 12800 contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae. Après la vaccination (annuelle voire biannuelle chez les chiens les plus exposés) le taux d'anticorps peut rester à un niveau élevé (> 1600), notamment si l'animal est régulièrement exposé à des souches sauvages de *Leptospira* qui stimulent son système immunitaire [227, 320, 321]. De plus, des réactions d'agglutination croisée sont décrites suite à la vaccination, pour des sérogroupes non inclus dans le vaccin [227].

Deux animaux vaccinés étaient séropositifs pour les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Mini. L'un de ces chiens présentait des titres en anticorps de 1600 contre les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Mini, l'autre chien présentait des titres en anticorps moins élevés (400 et 800 respectivement). Ces deux animaux ayant une vaccination à jour, deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats sérologiques :

1/ Ils ont été infectés par une souche du séro groupe Mini et ont développé une réponse immunitaire spécifique contre ce séro groupe ;

2/ La vaccination a induit une augmentation des anticorps contre le séro groupe Mini par réaction croisée.

Etant donné que ces animaux sont les deux seuls parmi les 22 chiens vaccinés à présenter une sérologie positive simultanément pour les séro groupes Icterohaemorrhagiae et Mini, nous pensons qu'ils ont été infectés naturellement (et probablement récemment en ce qui concerne le chien présentant des titres de 1600) par le séro groupe Mini. Ces animaux, s'ils sont restés asymptomatiques (nous n'avons pas cette donnée dans les commémoratifs collectés), ont pu excréter (transitoirement ou de façon chronique) des leptospires et par conséquent représenter une source de contamination pour leurs propriétaires [318].

Les résultats sérologiques obtenus sur les chiens vaccinés ne nous permettent de conclure sur la fréquence de l'infection par *Leptospira* dans cette population d'animaux, ni sur les séro groupes circulant puisque les résultats sont biaisés par la présence d'anticorps vaccinaux.

Nous montrons que 85,7% des chiens domestiques non vaccinés présentaient des anticorps anti-*Leptospira* tandis que la séroprévalence chez les chiens errants est de 87,5%. Ces séroprévalences élevées montrent que les contacts avec des leptospires sont fréquents chez les chiens (domestiques non vaccinés et errants).

Un des chiens domestiques "non vaccinés" présentait des anticorps contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae à un titre égal à 800. D'après les commémoratifs, ce chien était un animal qui avait été adopté à l'âge adulte et nous pensons qu'il avait probablement été vacciné avant l'adoption, par un autre vétérinaire, et que ces données n'étaient pas connues par le praticien qui a fait le prélèvement sanguin. C'est pourquoi nous retrouvons une sérologie positive au séro groupe Icterohaemorrhagiae chez un chien identifié comme "non vacciné".

Nous supposons que le séro groupe Canicola circule dans la population de chiens non vaccinés à Mayotte puisque un animal domestique non vacciné et deux chiens errants présentaient des anticorps contre ce séro groupe, bien que les taux soient faibles (100).

Mini est le principal séro groupe identifié chez les chiens errants et chez les chiens domestiques non-vaccinés. Un chien errant présentait un taux d'anticorps élevé (6400) pour ce séro groupe, ce qui suggère une infection récente. Un chien errant était séropositif pour le séro groupe Pyrogenes (titre 400), mais le faible nombre d'animaux errants étudiés ne nous

permet pas de dire si les infections par ce sérotype sont fréquentes chez les chiens errants ou pas.

La présence chez les chiens d'anticorps dirigés contre les souches 200701203 et 200803703 isolées chez les patients mahorais et appartenant au sérotype Mini qui est le sérotype majoritairement responsable des cas cliniques humains sur l'île, laisse penser que les chiens pourraient être une source de contamination pour l'Homme.

Les chiens errants peuvent se nourrir de petits mammifères qui sont des réservoirs majeurs de leptospires [9], mais ils peuvent aussi être infectés *via* l'environnement contaminé (voir la discussion **Chapitre VI, section 3.1.3.**). Les chiens domestiques peuvent avoir des contacts directs avec les chiens errants (par exemple s'ils fuguent, lors des promenades ou tout simplement si l'habitation des propriétaires n'est pas clôturée) et ils partagent le même environnement (urbain ou péri-urbain). La vaccination des chiens domestiques empêche l'expression de signes cliniques de la maladie chez ces animaux, néanmoins, en cas de contamination par une souche de leptospire non incluse dans le vaccin, l'animal peut devenir excréteur et représenter un risque zoonotique [227].

La connaissance des sérotypes circulant localement permet d'évaluer l'intérêt de la vaccination dans une population. A Mayotte, l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae et la prédominance du sérotype Mini dans la population de chiens errants posent la question de l'utilisation du vaccin bivalent protégeant contre les souches Icterohaemorrhagiae et Canicola.

Il n'est pas possible de déterminer à partir des résultats sérologiques si les chiens sont des porteurs chroniques et des réservoirs de leptospires. Le nombre de chiens errants à Mayotte est très important, par conséquent, si ces animaux étaient des réservoirs, excréteurs, de leptospires, leur contribution à la contamination du milieu serait non négligeable. Le rôle de réservoir de *Leptospira* des chiens errants à Mayotte reste donc à explorer. Notamment, des prélèvements de tissus rénaux et d'urines sur les animaux capturés par les services de régulation de population de chiens errants pourraient être envisagés afin de déterminer la prévalence du portage rénal d'une part et de démontrer l'excrétion urinaire d'autre part. L'identification des souches de *Leptospira* infectant le chien permettrait d'évaluer si ces animaux jouent un rôle dans la contamination de l'Homme à Mayotte.

3.1.5. Rats noirs

Voir Annexe J, Tableaux IV et V.

Notre étude a estimé la séroprévalence de la leptospirose à 11,2% (14/125) chez le rat noir à Mayotte. Le séro groupe Icterohaemorrhagiae n'est pas retrouvé chez *R. rattus* à Mayotte tandis que le séro groupe Mini est le séro groupe majoritairement circulant dans cette espèce, avec des titres faibles, compris entre 100 et 400, qui témoignent d'une infection ancienne ou chronique. Les séro groupes Pyrogenes et Grippytyphosa ont aussi étaient identifiés par examen sérologique, respectivement chez un et trois rats. Un rat présentait un titre en anticorps de 1600 pour le séro groupe Grippytyphosa qui peut révéler une infection récente ou en cours car cet animal n'était pas porteur de leptospires au niveau rénal.

Aucune souche appartenant au séro groupe Icterohaemorrhagiae ne semble infecter les rats noirs à Mayotte. Si Mini est le séro groupe majoritaire circulant chez les rats noirs à Mayotte, ces derniers peuvent aussi être infectés par des souches des séro groupes Grippytyphosa et Pyrogenes.

Nous avons détecté la présence de *Leptospira* dans les reins de 29,8% (42/141) des rats échantillonnés.

Ce chiffre, associé au données sérologiques, suggère fortement que le rat noir est un réservoir de leptospires à Mayotte [328] et par conséquent, qu'il participe à la contamination du milieu, donc de l'Homme.

La prévalence du portage rénal chez *R. rattus*, évaluée dans notre échantillon, est faible comparée à celle rapportée à La Réunion pour la même espèce (62,5%) ou à celles rapportées dans d'autres études chez *Rattus* sp. [294, 322, 323, 485, 487] (voir **Chapitre VI, section 3.1.1.**)

Les différents travaux qui ont étudié les *Leptospira* circulant chez les rats au sein d'une zone géographique rapportent une faible diversité génétique au sein de ces souches, comme par exemple à Tokyo où les 22 isolats obtenus à partir de rats étaient identiques et correspondaient à *L. interrogans* sérovar Copenhageni ou Icterohaemorrhagiae [592] ; sur les îles Amami (Japon), où les sept isolats étaient identiques et appartenaient à l'espèce *L. borgpetersenii* [593] ; aux Philippines où quatre génotypes, appartenant à deux espèces

génomiques, ont été identifiées chez les rats : *L. interrogans* (sérovars Manilae, Losbanos et Javanica) et *L. borgpetersenii* (sérovar Javanica) [294] ; en Argentine où les 24 isolats obtenus étaient similaires et correspondaient à *L. interrogans* sérotype Icterohaemorrhagiae [594] ; ou enfin dans les Açores (Portugal) où les isolats obtenus à partir de prélèvements sur rats, appartenaient à une seule espèce génomique *L. interrogans* et à deux sérotypes (Icterohaemorrhagiae et Ballum) [492]. Dans l'île voisine de Madagascar, les dix isolats obtenus chez *Rattus* sp. ont tous été identifiés comme *L. interrogans* sérotype Canicola sérovar Kuwait [485].

Ces études montrent aussi que *Rattus* sp. est l'hôte préférentiel de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* [64, 294, 323, 485, 593, 594].

Nous démontrons que la situation épidémiologique à Mayotte est unique puisque (au moins) quatre espèces génomiques de *Leptospira* circulent au sein de la population de rats noirs : *L. borgpetersenii*, *L. borgpetersenii* groupe B, *L. interrogans*, et *L. kirschneri*.

Nous avons identifié pour la première fois le rat noir comme réservoir de l'espèce *L. kirschneri*. De plus, l'espèce récemment décrite *L. borgpetersenii* groupe B a aussi été mise en évidence dans les reins de rats, prouvant l'originalité de ce réservoir à Mayotte.

3.2. Epidémiologie de la leptospirose humaine à Mayotte

3.2.1. Risque lié au réservoir animal

Nous montrons que le sérotype Icterohaemorrhagiae ne circule pas chez les animaux à Mayotte, ce qui confirme les observations rapportées chez l'Homme [229] et indique probablement qu'aucune souche appartenant à ce sérotype n'est présente sur l'île.

Bourhy *et al.* [229] ont montré que les souches de leptospires responsables des cas humains à Mayotte appartenaient aux espèces *L. borgpetersenii* (52,1% des souches isolées, $n=94$), *L. kirschneri* (23,4%), *L. interrogans* (8,5%), et *L. borgpetersenii* groupe B (15,9%). Nous mettons en évidence que la diversité génétique des souches de *Leptospira* identifiées chez *R. rattus* par le séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 16S est identique à celle identifiée chez les patients [229]. De plus, les séquences amplifiées à partir de tissu rénal de

rats montrent une forte homologie avec les celles amplifiées à partir de souches en culture isolées chez les patients malades [229]. Enfin, les proportions relatives des sérogroupes identifiés par MAT et des espèces génomiques identifiées chez les différentes espèces animales et les patients mahorais [229] sont reportées dans le **Tableau 45**.

Ces données, associées aux résultats de sérologie et à la prévalence du portage rénal chez *R rattus* désignent le rat noir comme le réservoir principal de *Leptospira* à Mayotte et comme source de contamination pour l'Homme.

Nous n'excluons cependant pas l'existence potentielle d'autres réservoirs animaux à Mayotte (**Figure 41**), notamment les chiens errants ou les bovins chez qui la séroprévalence a été estimée à 11,6% (*étude de l'Institut Pasteur de Paris, conduite sur 284 animaux en 2010*). Mini est le séro groupe majoritairement retrouvé chez les patients, il est aussi le séro groupe identifié le plus souvent chez les rats (50% des séropositifs), les chiens non vaccinés (46,2%) et les bovins (36,4% des séropositifs).

Les chiens (errants mais aussi les chiens domestiques, même vaccinés), les bovins et les rats sont probablement des hôtes de maintien et des sources de transmission du séro groupe Mini à Mayotte.

Le pourcentage relatif de *L. interrogans* parmi les souches infectantes identifiées par séquençage est de 35% chez le rat alors qu'il est de 8,5% chez l'Homme [229] (**Tableau 45**). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence :

- L'étude des souches infectantes chez l'Homme a été menée entre 2007 et 2010 et compte 94 souches alors que l'échantillonnage des rats a été conduit sur une période très réduite (six semaines en 2007) et ne compte que 20 séquences ADN. Il est probable que ces 20 souches de *Leptospira* identifiées chez les rats noirs ne soient pas représentatives de l'ensemble des souches circulant chez les rats ;
- Les leptospires de l'espèce *L. interrogans* circulant à Mayotte résistent moins dans le milieu (à cause des conditions environnementales, du type de sol, de son pH...) et leur transmission indirecte s'en trouve diminuée ;
- Les leptospires de l'espèce *L. interrogans* circulant à Mayotte induisent des formes cliniques asymptomatiques ou peu symptomatiques chez l'Homme. Par conséquent, les patients atteints par ces souches ne sont pas hospitalisés et ces

souches ne sont alors pas identifiées. Il s'agirait alors plutôt d'un défaut d'identification plutôt que d'un déséquilibre réel entre le pourcentage de *L. interrogans* circulant chez les rats et responsables de signes cliniques chez les patients.

3.2.2. Risque lié aux conditions de vie

La forte incidence des cas humains à Mayotte (25 cas pour 100 000 habitants par an [229]) est à corrélérer avec les nombreux facteurs de risque que présente l'île et les habitudes de vie locales. A Mayotte, comme dans la plupart des zones tropicales [154-161], l'incidence des cas est liée à la pluviométrie [229]. Au-delà du facteur de risque climatique, Mayotte présente de nombreux facteurs de risque socio-économiques et les conditions sanitaires de vie d'une grande partie de la population l'exposent à la contamination. Plus d'un quart de la population de Mayotte vit sous le seuil relatif de pauvreté²⁴ [419]. Or, nous avons vu dans le **Chapitre II, section 3** qu'avoir un niveau de vie bas ou vivre dans une zone défavorisée (comme un bidonville) sont des facteurs de risque d'infection par *Leptospira* [3, 136, 183, 184]. L'insalubrité du logement est un facteur de risque d'acquisition de la leptospirose [136, 184], or, à Mayotte les logements en dur ne représentent que 57% du parc immobilier mahorais en 2007 et le nombre de logement en tôle ne cesse d'augmenter [419]. A ce jour, seule la commune de Mamoudzou, ainsi que quelques quartiers de différentes communes, sont reliés au réseau d'assainissement collectif de l'eau et l'assainissement de l'eau reste un problème très important à Mayotte [419]. Cette insuffisance est à l'origine des risques sanitaires (insalubrité publique et transmission de pathologies liées à l'eau, notamment la leptospirose) et environnementaux importants (par exemple la dégradation des cours d'eau et de la qualité du lagon). Par ailleurs, l'eau de pluie est très utilisée dans la vie quotidienne, pour la lessive, le bain, la vaisselle... et représente un facteur de risque de contamination pour la population [91, 595]. Marcher pieds-nus, qui est une habitude généralisée pour une grande part de la population à Mayotte (tout comme à La Réunion) représente aussi un facteur de risque d'exposition à *Leptospira* [185, 186].

²⁴ Défini à 60 % de la valeur du niveau de vie médian, soit 1450 euros en 2005.

Le traitement des déchets à Mayotte reste un problème important et l'existence de décharges à ciel ouvert, l'accumulation de déchets aux abords des habitations, qui attirent les populations de rats et de chiens errants, sont des facteurs de risque d'exposition à *Leptospira* [91, 183-185]. Figueiredo *et al.* [596] ont observé que dans la ville de Belo Horizonte (Brésil) les cas apparaissent surtout dans les zones sans infrastructures sanitaires adéquates, présentant des accumulations de déchets et sans système de ramassage des ordures.

Enfin, environ 8% de la population active de Mayotte travaille dans le secteur agricole et de nombreuses familles possèdent un animal (chèvre ou zébu) et/ou cultivent un terrain pour leur consommation personnelle [419]. Ces personnes sont très exposées au risque puisque, élevant des zébus ou des chèvres qui sont des réservoirs potentiels de leptospirose ou travaillant dans les vergers où la population de rats est probablement importante, ils sont très exposés à la bactérie. Les populations urbaines de l'île sont elles aussi exposées au risque lié à la présence de rats et de chiens errants.

Le risque lié aux animaux, associé à l'humidité quasi-permanente du sol et de l'air à Mayotte, aux conditions sanitaires souvent mauvaises, aux fortes pluies et aux inondations survenant au cours de la saison des pluies, font que la quasi-totalité de la population est exposée à *Leptospira* et qu'il est difficile de cibler une population "à risque" lors des campagnes de prévention.

	Sérogroupe de <i>Leptospira</i>				Espèces génomiques de <i>Leptospira</i>			
	Mini	Pyrogenes	Grippotyphosa	Pomona	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. interrogans</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. borgpetersenii</i> groupe B
Lémurs (n = 50) et roussettes (n = 49)	0%	83,3%	16,6%	0%	nd	nd	nd	nd
Chiens non vaccinés ¹ (n = 15)	46,2%	7,7%	0%	0%	nd	nd	nd	nd
Bovins ² (n = 284)	36,4%	15,2%	33,3%	3%	nd	nd	nd	nd
Rats ³	50%	7,1%	21,4%	0%	45%	35%	10%	10%
Humains (n = 94) [229]	70,5%	18%	8,5%	3%	52,1%	8,5%	23,4%	15,9%

¹ Chiens domestiques non vaccinés et chiens errants.

² Etude de l'Institut Pasteur de Paris (2010).

³ MAT: 125 rats, séquences partielles de l'ARNr 16S : 20 rats.

nd : non fait.

Tableau 45 : Proportions relatives des sérogroupe infectant (déterminés par MAT) circulant chez les animaux non vaccinés séropositifs à Mayotte (2007), et proportions relatives des différentes espèces génomiques identifiées par génotypage chez les patients mahorais (2007-2010) et par séquençage chez les rats (2007).

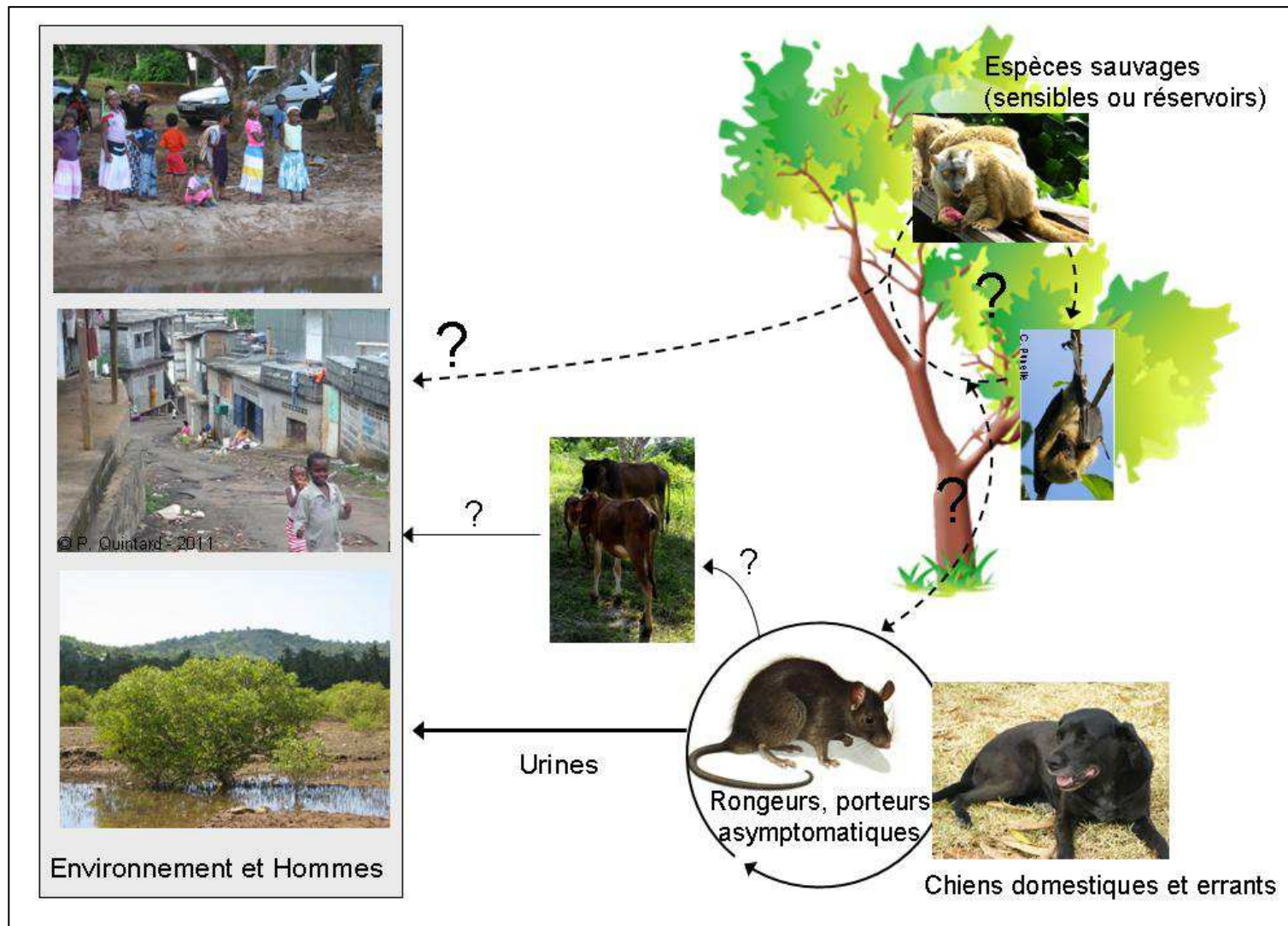


Figure 41 : Voies probables de transmission de *Leptospira* à Mayotte.

4. Publication des résultats

Article 5 : Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean island of Mayotte. Desvars A, Naze F, Vourc'h G, Cardinale E, Picardeau M, Michault A, Bourhy P. 2012. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (soumis).



**Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution
in animals and humans in the Indian Ocean island of
Mayotte**

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Desvars, Amélie; CIRAD, UMR CMAEE; Groupe Hospitalier Sud Réunion / Centre Hospitalier Réunion, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène Naze, Florence; GHSR/CHD, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène Vourc'h, Gwenaél; INRA, UR346 Unité d'Epidémiologie Animale Cardinale, Eric; CIRAD, UMR CMAEE; CRVOI, CRVOI Picardeau, Mathieu; Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes Michault, Alain; GHSR/CHD, Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène Bourhy, Pascale; Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes
Key Words:	Leptospirosis, Emerging Diseases, Epidemiology, Zoonotic Diseases

1
2
3 1 LRH: DESVARS AND OTHERS
4
5 2 RRH: ANIMALS AS RESERVOIRS OF LEPTOSPIROSIS IN MAYOTTE
6
7 3
8
9 4 Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the
10
11 5 Indian Ocean island of Mayotte
12
13 6
14
15 7 Amélie Desvars, Florence Naze, Gwenaël Vourc'h, Eric Cardinale, Mathieu Picardeau,
16
17 8 Alain Michault, and Pascale Bourhy
18
19 9
20
21 10 *Laboratoire de Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud*
22
23 11 *Réunion (GHSR), Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint-Pierre, La Réunion, France;*
24
25 12 *Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes*
26
27 13 *(UMR CMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le*
28
29 14 *Développement (CIRAD), Sainte-Clotilde, La Réunion, France; INRA, UR346 Unité*
30
31 15 *d'Epidémiologie Animale, Saint-Genès Champanelle, France; Centre Régional de Recherche*
32
33 16 *et de Veille sur les Maladies Emergentes de l'Océan Indien (CRVOI), Sainte-Clotilde, La*
34
35 17 *Réunion, La Réunion France; Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes, Centre*
36
37 18 *National de Référence de la Leptospirose, Paris, France.*
38
39 19
40
41 20
42
43 21
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

22 ABSTRACT

23 Our objective was to identify local animal reservoirs of leptospirosis to explain the
24 unusual features of *Leptospira* strains recently described among patients on the island of
25 Mayotte. By means of microscopic agglutination test using local clinical isolates, we found
26 that 11.2% of black rats were seropositive to *Leptospira*, while 10.2% of flying-foxes, 2% of
27 lemurs, 93.1% of domestic dogs, and 87.5% of stray dogs were seropositive. As observed in
28 humans, Mini was the main serogroup circulating in animals, while serogroup
29 Icterohaemorrhagiae was absent. Using qPCR, we also showed that 29.8% of rats carried
30 leptospire in their kidneys. The sequencing of 16S rRNA gene sequences of *Leptospira*
31 found in black rat kidneys identified four genomospecies (*Leptospira borgpetersenii*,
32 *L. interrogans*, *L. kirschneri*, and *L. borgpetersenii* group B) which established black rats as
33 the major source of leptospirosis transmission to humans. The origins of such a genetic
34 diversity in *Leptospira* strains are discussed.

35
36

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

37 INTRODUCTION

38 Leptospirosis is a zoonotic disease that has a significant health impact worldwide,
39 particularly in tropical and developing countries.¹ The disease can be life-threatening, with
40 complications such as Weil's disease or severe pulmonary haemorrhage syndrome. Human
41 infection results from exposure to infected urine of carrier mammals, either directly or *via*
42 contaminated soil or water,² thus shedding animals pose a public health risk.

43 Leptospirosis is endemic in Mayotte. The annual incidence between 1984 and 1989
44 was 3.83 cases per 100,000 inhabitants but since 2007, diagnosis methods have been
45 improved and annual incidence was reported to be higher than 20 cases per 100,000
46 inhabitants.³ Pathogenic *Leptospira* strains responsible for clinical human cases showed a
47 high genetic diversity. Moreover, serogroup Icterohaemorrhagiae has never been reported in
48 humans and a new (probably endemic) strain called *L. borgpetersenii* group B has been
49 described,^{3,4} which makes the epidemiology of leptospirosis in Mayotte unique. The reasons
50 for the occurrence of this strain diversity remain to be uncovered. The main source of
51 diversity originates probably in the animal reservoir hosts that infect human.

52 Mayotte has a surface area of 376 km² and is a French overseas department. It is
53 geographically part of the Comoros archipelago, located between northern Madagascar and
54 northern Mozambique. Mayotte is characterized by a tropical climate which is hot, humid,
55 and rainy during the monsoon season between November and May. The development of
56 sanitary institutions is recent on the island, and self-subsistence agriculture and fishing are the
57 principal sources of household income. The only native terrestrial mammals in Mayotte are
58 Chiroptera (*Chaerephon pumilus*, *Taphozous mauritanus* and the flying fox *Pteropus*
59 *seychellensis*), thus the potential reservoir hosts are mostly introduced mammalian species:
60 small mammals (the domestic mouse *Mus musculus*, the black rat *Rattus rattus*, the shrew
61 *Suncus madagascariensis*, and the tenrec *Tenrec ecaudatus*), wild carnivores (the Indian civet

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

62 *Viverricula indica* and stray dogs), primates (the brown lemur *Eulemur fulvus*), and domestic
63 animal species (cats, dogs, zebus, and goats).

64 The aim of this study was to assess the potential of one endemic species (the flying
65 fox) and three introduced species (the ship rat, domestic and stray dogs, the brown lemur) to
66 be reservoir hosts for leptospirosis in Mayotte. To achieve this objective, we studied firstly
67 the seroprevalence of leptospirosis infection in these four commensal animal species by
68 means of the microscopic agglutination test (MAT) using local clinical isolates.^{3,4} These
69 animal species were chosen because of their large population size and close contact with
70 humans. Secondly, we focused on the main potential reservoir host - black rats - and
71 compared the genetic diversity of the strains identified in this rodent species to those isolated
72 from patients.^{3,4} The origins of this unique genetic diversity among local *Leptospira* strains
73 are discussed in this paper. Molecular data provided new insights into the epidemiology of the
74 disease on this tropical island.

76 MATERIALS AND METHODS

77 **Field Methods:** Flying foxes were trapped in two sites by mist netting at nightfall,
78 following previously described methods,⁵ and one millilitre of blood was sampled from the
79 humeral vein. Haemostasis at the venipuncture site was done by manual compression. Before
80 release, flying foxes were given fruit juice to be fully hydrated.

81 Lemurs were anaesthetized using hypodermic syringes and a combination of
82 tiletamine and zolazepam (Zolétil[®]) at the recommended dosage of 8--10 mg.kg⁻¹.⁶ The entry
83 site of the hypodermic syringe and site of venipuncture were disinfected with povidone
84 iodine. Ocular gel (Ocrygel[®]) was put on the cornea to avoid dehydration. Body temperature,
85 cardiac and respiratory function of each lemur were monitored by veterinarians during
86 anaesthesia. If needed, post-induction supplementation was done *via* hand injection with

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

87 Zolétil® at 4--5 mg.kg⁻¹. Three to 3.5 ml of blood was sampled from the jugular vein and
88 animals were released on the site of capture after complete recovery.

89 Domestic dogs were sampled by private local veterinarians at classical venipuncture
90 sites after oral agreement with the owners. Stray dogs were caught by the Brigade Nature of
91 Mayotte and sampled in the field.

92 Rats were trapped using baited-live traps (Manufrance®) laid overnight. Rats were
93 euthanized by injection of pentobarbital, following the recommended procedure.⁷ For each
94 rat, an intracardiac blood puncture was performed and the kidneys were aseptically removed.

95 All blood samples were centrifuged and sera were collected. Sera and kidneys were
96 frozen at -80°C for conservation until analyses.

97 **Serological Analysis:** Live leptospiral organisms were used for the microscopic
98 agglutination test (MAT) following standard procedure.⁸ In order to link the epidemiology of
99 animal leptospirosis to the human disease, we used nine strains that were locally isolated from
100 infected patients from Mayotte between 2007 and 2010^{3,4} (**Table 1**). Except for strain
101 200803703, which was isolated from an imported case from Madagascar, the other strains
102 were autochthonous. The reference strain Copenhageni from serogroup Icterohaemorrhagiae
103 was included in the panel, and strain Hond Utrecht IV from serogroup Canicola was also
104 included in the panel for dog sera because serogroups Canicola and Icterohaemorrhagiae
105 part of the French vaccine for dogs. All sera showing agglutination underwent further 2-fold
106 dilutions in a range of 1:100 to 1:12,800. We set the cut-off point at 1:100 for positive sera.
107 We considered the serogroup with the highest titer to be the presumptive infecting serogroup
108 and serum with this result was classified as being infected with single *Leptospira* serogroup.
109 However, if two or more serogroups induced the highest titer, then, either the infection was
110 caused by multiple serogroups, or the multiple agglutinations resulted from cross-
111 agglutinations.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

112 **Real-time Quantitative PCR:** DNA was extracted from 20–25 mg of kidney
113 tissue using the Qiagen Dneasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)
114 according to the manufacturer's instructions.

115 To control for DNA extraction and to detect presence of PCR inhibitors in DNA
116 extracts, we amplified a 250-pb fragment of the housekeeping gene *gapdh* using the hamster
117 GAPDH C/D primer pair (**Table 2**) under standard conditions.⁹

118 Detection of *Leptospira* DNA was performed by a Taqman as previously described by
119 Stoddard *et al.* (**Table 2**).¹⁰ Real-time PCR were performed using the LightCycler® 480
120 (Roche Diagnostics, Meylan, France).

121 **Characterization of Isolates by Partial 16S rDNA Gene Sequencing:** A

122 partial sequence of the *rrs* gene from positive kidney tissue samples was amplified by nested-
123 PCR using Taq polymerase (GE Healthcare) and primers A/B, then C/RS4 (**Table 2**)^{11,12}
124 under standard conditions. Sequencing was performed at the Platform Genotyping of
125 Pathogens and Public Health (Institut Pasteur, Paris, France) and sequences were aligned in
126 GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST,
127 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) or using ClustalW2.

128 **Sampling Authorization and Ethics Statement:** The sampling was part of
129 the ChikAni research program managed by the Institut National de Recherche Agronomique
130 (INRA) in which all experimental procedures were approved by the Animal Health Division
131 of INRA. Animal work in Mayotte was legally approved by the Prefect of Mayotte and the
132 Direction of Agriculture and Forestry of Mayotte, by prefectural decrees n°005/CAB/2007
133 and n°029/DAF/sef/2007 for sampling on stray dogs and on wildlife respectively. *Eulemur*
134 *fulvus* is listed in the Appendice I and *Pteropus seychellensis* is listed in Appendice II of the
135 Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES).
136 Permits to import samples from these species in Reunion Island, and then to export them to

1
2
3 137 France were obtained (permits to import n°FR0797400112-I and FR0797400111-I delivered
4
5 138 on 16th April, 2007, and permits to export n°FR0797600003-E and FR0797600004-E
6
7 139 delivered on 16th October, 2007, for lemurs and fruit bats respectively). Rats are introduced
8
9 140 invasive mammals on Mayotte,¹³ thus no particular authorization is required for their capture
10
11 141 and study. Euthanasia of animals was conducted using ethical methods following the
12
13 142 recommended procedures of the Parliament and the Council of the European Union.⁷
14
15 143 Euthanasia of stray carnivores was conducted by ethically by sworn agents of the Brigade
16
17 144 Nature of Mayotte and with respect of the French law n°99-5 dated January 6th, 1999
18
19 145 concerning "*dangerous and stray animals and protection of animals*".
20
21
22
23 146

24 25 147 RESULTS

26
27 148 All samples were collected between 29th March and 13th May 2007 during the warm
28
29 149 and rainy season. A total of 292 animals (156 rats, 50 brown lemurs, 49 flying foxes, 29
30
31 150 domestic dogs, and 8 stray dogs) were sampled principally in rural areas close to human
32
33 151 habitations on Grande Terre (**Figure 1**). Blood was collected for all lemurs, bats, and dogs,
34
35 152 but 31 rats could not be blood sampled. Kidney tissues were sampled in all 156 rats.
36
37

38 153 Five adult flying foxes (10.2%) were found seropositive for *Leptospira* antibodies.
39
40 154 Four gave seropositivity for serogroup Pyrogenes (titers 200 to 400), while one was
41
42 155 seropositive for serogroup Grippotyphosa at titer 200 (**Table 3**).
43
44

45 156 One adult male brown lemur (2%) was seropositive against two strains belonging to
46
47 157 serogroup Pyrogenes (titers 200 and 400) (**Table 3**).
48

49 158 Twenty-two domestic dogs had up-to-date vaccination (< one year) against
50
51 159 leptospirosis, one vaccinated dog was seronegative, and 10 animals had positive titers to more
52
53 160 than one serogroup among which Pomona, and Grippotyphosa (**Table 3**). Ten vaccinated
54
55 161 animals were seropositive to serogroup Icterohaemorrhagiae (titers 100 to 12,800) and one
56
57
58
59
60

1
2
3 162 was seropositive to Canicola (titer 200). Vaccination could explain the high titers found
4
5 163 against these two serogroups as they are included in the bivalent vaccine. Six out of seven
6
7 164 (85.7%) non-vaccinated domestic dogs were seropositive (**Table 3**). Seropositive reactions
8
9 165 were found against serogroups Icterohaemorrhagiae (1/6) at titer 800, Canicola (1/6) at titer
10
11 166 100, Mini (2/6) at titers 200 and 800. Seven out of eight stray dogs (87.5%) were seropositive
12
13 167 against *Leptospira* (**Table 3**). Four stray dogs were seropositive to serogroup Mini (titers 200
14
15 168 to 6,400), one reacted to Pyrogenes (titer 400), and two were positive to Canicola (titer 100).
16
17

18 169 A total of 14/125 rats (11.2%) presented leptospiral antibodies, among which six
19
20 170 presented coagglutinations (**Table 3**). The main serogroup circulating in rat population in
21
22 171 Mayotte was Mini (7/14 seropositive rats and titers comprised between 100 and 400). No
23
24 172 serological reaction was found against serogroup Icterohaemorrhagiae. Antibodies against
25
26 173 serogroup Grippotyphosa were recorded in three rats (titers 100 to 1,600), and one rat was
27
28 174 seropositive to serogroup Pyrogenes (titer 200).
29
30

31 175 No DNA could be amplified from 15 kidney samples because of the presence of
32
33 176 inhibitors (no amplification of the GAPDH control). Using real-time PCR, evidence of
34
35 177 leptospiral infection was found in the kidneys of 42 out of 141 rats (29.8%). All Ct were
36
37 178 found between 31.5 and 39.7 cycles.
38
39

40 179 Among the 42 LipL32-positive kidney samples, 20 were also PCR positive for *rrs*
41
42 180 using nested-PCR. Identification of the *Leptospira* species was achieved *via* sequencing of the
43
44 181 5' variable region of the *rrs* gene and sequence analysis. The product sequence identified four
45
46 182 pathogenic *Leptospira* species (**Table 4**): *L. borgpetersenii* (9/20 samples), *L. interrogans*
47
48 183 (7/20), *L. kirschneri* (2/20), and *L. borgpetersenii* group B (2/20) which was previously found
49
50 184 in clinical isolates belonging to serogroup Mini. Alignment of leptospiral DNA from black rat
51
52 185 kidneys and from humans, showed perfect identity.
53
54
55

56 186
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

187 DISCUSSION

188 We determined the seroprevalence of leptospirosis infection for three introduced and
189 one endemic mammal species in order to establish a link between human cases and potential
190 animal reservoir hosts. None of the sampled animals presented any clinical signs of disease
191 and positive titers reported in non-vaccinated wild species were generally low (≤ 400), which
192 probably reflect earlier infections or continuous exposure to *Leptospira* environmental
193 sources.

194 We reported a seroprevalence of 10.2% in fruit bats (*Pteropus seychellensis*) and
195 identified Pyrogenes and Grippotyphosa as the infecting serogroups in this species. Smythe *et*
196 *al.*¹⁴ found a higher seroprevalence of leptospirosis (28%) in pteropid bats from Australia and
197 leptospiral DNA has been recovered from Australian fruit bat kidney and urine.¹⁵ Direct
198 contacts between fruit bats and humans are rare but *Pteropus* fruit bats can roost in village
199 buildings¹⁶ and may feed on cultivated plants including papaya, banana, guava, bread fruit or
200 mango¹⁶ intended for human consumption. In addition, the grooming behaviour of *Pteropus*
201 which consists in urinating and licking urine through the coat and wings,¹⁶ favours direct
202 contamination between bats. A recent study by Tulsiani *et al.*¹⁷ indicated the existence of a
203 potential pathway for transmission of leptospires from pteropid fruit bats to rodents, *via*
204 rodent contact with infected fruit bat urine.

205 This is the second report of the presence of anti-*Leptospira* antibodies in free-ranging
206 non-human primates¹⁸ but the extent of direct *Leptospira* transmission between non-human
207 primates and humans is unknown. In Barbados, the seroprevalence reported in apparently
208 healthy wild vervet monkeys was 29,9%.¹⁸ When non-human primates are naturally infected
209 with *Leptospira*, either they develop a transient immunity and recover,^{18,19} or they are hyper
210 sensitive and the disease is lethal (dead-end hosts).²⁰⁻²² The low seroprevalence reported in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

211 lemurs (2%) suggests that contaminations are rare in this species, maybe because lemurs are
212 almost completely arboreal and contacts with infected water are infrequent.

213 Our survey reported a seroprevalence of 93.1% in domestic dogs but this result is most
214 likely biased because most of the domestic dogs had up-to-date (< 1 year) vaccination against
215 leptospirosis (the bivalent vaccine available in France induces protection against serogroups
216 Icterohaemorrhagiae and Canicola). We suggest that post-vaccinal titers persisted after annual
217 (sometimes bi-annual) vaccinal injection and remain at high levels (> 1,600) because frequent
218 exposures to field strains occur.²³⁻²⁵ One "non-vaccinated" dog showed seropositivity at titer
219 800 to serogroup Icterohaemorrhagiae. This dog was an adopted adult, thus, we suggest that
220 this animal may have previously been vaccinated. Stray dogs can prey on small mammals
221 which are recognized as the major reservoir host of leptospirosis⁸ but they can also be
222 infected *via* the contaminated environment. We reported a seroprevalence of 85.7% in stray
223 dogs showing that contact with *Leptospira* are frequent in this animal population and Mini
224 was the main serogroup identified in stray and non-vaccinated domestic dogs. High antibody
225 titer (6,400) to Mini serogroup in one stray dog suggests a possible recent infection. The
226 number of stray dogs in Mayotte is very high (10,000 to 20,000 animals) and in consequence
227 these animals may greatly contribute to *Leptospira* infection in humans.²⁶

228 We demonstrated a seroprevalence of 11.2% within the black rat population. We
229 detected the presence of leptospiral DNA in 29.8% of rat kidneys, proving the role of the
230 black rat in environmental contamination. Other studies reported a low genetic diversity
231 among locally circulating *Leptospira* strains within the rat population.²⁷⁻³² Here, we showed
232 that rats in Mayotte carried four genomospecies (**Table 4**) and that the genetic diversity
233 among *Leptospira* strains infecting black rats is unique. *Rattus* sp. is considered as the
234 preferred reservoir host for *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*^{28-30,32-34} but to our

1
2
3 235 knowledge, this is the first report of *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii* group B identification
4
5 236 in *Rattus* sp.
6
7 237 Our serological results corroborate serological observations and molecular data on
8
9 238 human strains and confirmed that field strains from serogroup Icterohaemorrhagiae is absent
10
11 239 on Mayotte.³ Mini was found to be the major serogroup circulating in humans, rats and non-
12
13 240 vaccinated dogs, which suggests that both these species could be a reservoir and transmission
14
15 241 source of *Leptospira* to humans (Table 4). Moreover we reported the perfect alignment
16
17 242 between 16S rDNA partial sequences of *Leptospira* from rat kidneys and those isolated from
18
19 243 infected patients and showed that the relative proportions of strains responsible for clinical
20
21 244 cases in humans³ and those carried in rat kidneys, are similar (Table 4). These data strongly
22
23 245 suggest that the black rat population is the major reservoir and transmission source of
24
25 246 *Leptospira* to humans on Mayotte. The relative percentage of the *L. interrogans* species was
26
27 247 superior in black rats (35%) than in patients (8.5%) (Table 4). The study on human strains
28
29 248 was conducted on 94 isolates sampled over 3 years³ whereas rat sampling (n = 20) was
30
31 249 conducted during a period of 6 weeks in 2007 which could explain the differences observed.
32
33 250 Animal populations of Mayotte have been introduced by settlers since the 8th century,
34
35 251 firstly from East-Africa and then from Madagascar.^{35,36} Tollenaere *et al.*³⁷ showed that
36
37 252 Mayotte presents (at least) three genetic variants of *R. rattus* which are very similar to
38
39 253 Malagasy *R. rattus* genotypes but different from those of East Africa. Moreover, some
40
41 254 *Leptospira* strains reported in Mayotte have previously been described in East Africa:^{3,38,39}
42
43 255 This may be indicative of a two-step colonization pattern: Mayotte was first colonized by the
44
45 256 East African *R. rattus* carrying East-African leptospiral strains, but significant migrations
46
47 257 from Madagascar occurred later. The Malagasy black rats could have driven out earlier East
48
49 258 African occupants.³⁷ Consequently, *Leptospira* species first arrived with the East African
50
51 259 *R. rattus*, and then may have infected introduced Malagasy black rats. The actual strains
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

260 circulating in Mayotte might result from a genetic selection pressure, and a selection by the
261 hosts. The unique diversity of *Leptospira* on Mayotte could result from co-evolution between
262 leptospires and its preferred reservoir host *R. rattus*. The presence of several genotypic
263 variants of *R. rattus* could favour the specific adaptation of each *Leptospira* species to one
264 particular *R. rattus* genotype.

265

266 We highlight the need to genetically characterize animal-infecting strains in order to
267 shed light on the global epidemiological risk for humans. The identification of 20 *Leptospira*
268 sequences related to clinical isolates, the high density of black rats, and the poor sanitary
269 conditions in much of Mayotte make the black rat the likely zoonotic source of leptospires.
270 The black rat is a key element in the transmission cycle of leptospirosis and the reason for the
271 maintenance of a remarkable and unique genetic diversity among *Leptospira* in Mayotte.
272 Other animals are likely to play an important role in the transmission cycle of leptospirosis, in
273 particular the zebus, which were not investigated in this study. Consequently, public health
274 campaigns on preventive measures for the human population, as well as management of
275 rodents and stray dogs are crucial measures in the fight against leptospirosis.

276

277 **Acknowledgements:** The authors would like to thank the Institut National de Recherche
278 Agronomique (INRA) which gave us the authorization to use the biological material sampled
279 in 2007 during the ChikAni research program, Clément Punelle, Thomas Duval, Brigade
280 Nature of Mayotte (Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage), Veterinary Services
281 of Mayotte, and the Veterinary Laboratory of Mayotte (LVAD) for their help with field
282 sampling. We would also like to thank Farida Zinini, Sylvie Brémont, and Annie Landier
283 (Pasteur Institute, Paris) for their help in the laboratory, and Vincent Michault for his help on

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

284 the manuscript. This work was funded by the Institut Pasteur and the French Ministry of
285 Health (InVS).

286

287 **Authors' adresses:** Amélie Desvars, Florence Naze, Alain Michault, Laboratoire de

288 Bactériologie-Parasitologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR),

289 Centre Hospitalier Régional (CHR), Saint Pierre, La Réunion, France, E-mails:

290 amel.desvars@gmail.com, florence.naze@chr-reunion.fr, and alain.michault@chr-reunion.fr.

291 Gwenaël Vourc'h, INRA, UR346 Unité d'Epidémiologie Animale, Saint-Genès Champanelle,

292 France, E-mail: gwenael.vourch@clermont.inra.fr. Eric Cardinale and Amélie Desvars, Unité

293 Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMR

294 CMAEE), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le

295 Développement (CIRAD), Sainte-Clotilde, La Réunion, France, E-mail:

296 eric.cardinale@cirad.fr. Mathieu Picardeau and Pascale Bourhy, Unité de Biologie des

297 Spirochètes, Institut Pasteur, Paris, France, E-mails: mathieu.picardeau@pasteur.fr, and

298 p.bourhy@pasteur.fr.

299

300 REFERENCES

- 301 1. McBride AJA, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI, 2005. Leptospirosis. *Current Opinion*
302 *in Infectious Diseases* 18: 376--386.
- 303 2. Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296--326.
- 304 3. Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, van der Linden H, Thiberge
305 JM, Diancourt L, Brisse S, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M, 2011. Human Leptospira
306 isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular
307 features. *Journal of Clinical Microbiology* [Epub ahead of print].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 308 4. Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M,
309 2010. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in
310 Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis* 4: e724.
- 311 5. Desvars A, Duval T, Punelle C, Pascal M, Vourc'h G, 2009 The flying-fox *Pteropus*
312 *seychellensis* in Mayotte (Comoros): capture and blood sample methods. *J Wildl Dis*
313 45: 870--873.
- 314 6. West G, Heard DJ, Caulkett N, 2007. Zoo animal and wildlife immobilization and
315 anesthesia: Wiley-Blackwell.
- 316 7. Parliament and the Council of the European Union, 2010. Directive 2010/63/UE of the
317 European Parliament and Council of 22th September, 2010 relative to the protection
318 of animals used for scientific purposes. Union E, ed: Official Journal, L 276/33-L
319 276/79.
- 320 8. Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P, 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne,
321 Australia: MediSci.
- 322 9. Kwok-Keung K, Meiyun Wu S, Morin Nissom P, Oh SKW, Choo ABH, 2008.
323 Generation of high-level stable transgene expressing human embryonic stem cell lines
324 using Chinese hamster elongation factor-1alpha promoter system. *Stem Cells Dev* 17:
325 825--836.
- 326 10. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR, 2009. Detection
327 of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting
328 the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64: 247--255.
- 329 11. Mérien F, Amouriaux P, Pérolat P, Baranton G, Saint-Girons I, 1992. Polymerase
330 chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical sample. *Journal of Clinical*
331 *Microbiology* 30: 2219--2224.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

332 12. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P, Baranton G, 2000. Interest of
333 partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira*
334 collections: application to *L. meyeri*. *Research in Microbiology* 151: 333--341.
335 13. Soubeyran Y, 2008. Espèces exotiques envahissantes dans les collectivités françaises
336 d'outre-mer. Etats des lieux et recommandations. Synthèse par collectivité. Paris,
337 France: Comité français de l'UICN.
338 14. Smythe LD, Field HE, Barnett LJ, Smith CS, Dohnt MF, Symonds ML, Moore MR,
339 Rolfe PF, 2002. Leptospiral antibodies in flying foxes in Australia. *J Wildl Dis* 38:
340 182--186.
341 15. Cox TE, Smythe LD, Leung LKP, 2005. Flying foxes as carrier of pathogenic
342 *Leptospira* species. *J Wildl Dis* 41: 753--757.
343 16. O'Brien J, 2011. Bats of the Western Indian Ocean Islands. *Animals* 1: 259--290.
344 17. Tulsiani SM, Cobbold RN, Graham GC, Dohnt MF, Burns M-A, Leung LK-P, Field
345 HE, Smythe LD, Craig SB, 2011. The role of fruit bats in the transmission of
346 pathogenic leptospires in Australia. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 71--84.
347 18. Baulu J, Everard CO, Everard JD, 1987. Leptospires in vervet monkeys
348 (*Cercopithecus aethiops Sabaeus*) on Barbados. *J Wildl Dis* 23: 60--66.
349 19. Minette HP, Shaffer MF, 1968. Experimental leptospirosis in monkeys. *Am J Trop*
350 *Med Hyg* 17: 202--212.
351 20. Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI, 2011. An outbreak of
352 severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *The Veterinary Journal* 188: 237--
353 239.
354 21. Perolat P, Poingt J-P, Vic J-C, Jouaneau C, Baranton G, Gysin J, 1992. Occurrence of
355 severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *Am J Trop Med Hyg*
356 46: 538--545.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 357 22. Pereira MM, Da Silva JJP, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, Lenzi HL,
358 Marchevsky RS, 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix*
359 *jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Trop Med*
360 *Hyg* 72: 13--20.
- 361 23. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE, 2010. 2010
362 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology,
363 treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 25: 1--13.
- 364 24. Levett PN, 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting
365 serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 36: 447--
366 452.
- 367 25. Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt
368 MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwattanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP,
369 Peacock SJ, 2009. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor
370 of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 81: 695--697.
- 371 26. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin OA,
372 2005. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation,
373 molecular characterization and its use in a serological survey. *Revista da Sociedade*
374 *Brasileira de Medicina Tropical* 38: 294--300.
- 375 27. Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N,
376 Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H, 2009. Human leptospirosis cases and the
377 prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan.
378 *Journal of Medical Microbiology* 58: 1227--1230.
- 379 28. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F,
380 Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H, 2006. First record of *Leptospira*

1
2
3 381 borgpetersenii isolation in the Amami Islands, Japan. *Microbiology and Immunology*
4
5 382 50: 429--434.
6
7 383 29. Villanueva SYAM, Ezoe H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, Koizumi N, Fukui
8
9 384 T, Okamoto Y, Masuzawa T, Cavinta LL, Gloriani NG, Yoshida S-i, 2010. Serologic
10
11 385 and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines.
12
13 386 *Am J Trop Med Hyg* 82: 889--898.
14
15 387 30. Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridaó G, Gentile J, Gallicchio O, 2010. Isolation of
16
17 388 *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Rev*
18
19 389 *Argent Microbiol* 42: 126--128.
20
21 390 31. Collares-Pereira M, Korver H, Terpstra WJ, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Mathias
22
23 391 ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci- Fonseca F, 1997. First epidemiological
24
25 392 data on pathogenic leptospires isolated on the Azorean islands. *European Journal of*
26
27 393 *Epidemiology* 13: 435--441.
28
29 394 32. Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C,
30
31 395 Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J-M, Rahalison L, Cornet M, 2010. First
32
33 396 isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of
34
35 397 *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 5: e14111.
36
37 398 33. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W,
38
39 399 Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ,
40
41 400 Day NPJ, Peacock SJ, 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated
42
43 401 with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e56.
44
45 402 34. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira
46
47 403 MM, Ko AI, Reis MG, 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats
48
49 404 from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 108: 1--
50
51 405 5.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

406 35. Cheke A, 2010. The timing of arrival of humans and their commensal animals on
407 Western Indian Ocean oceanic islands. *Phelsuma* 18: 38--69.

408 36. Cheke A, Hume J, 2008. Lost Land of the Dodo. London: T & AD Poyser and A&C
409 Black Publishers.

410 37. Tollenaere C, Brouat C, Duplantier JM, Rahalison L, Rahelinirina S, Pascal M, Moné
411 H, Mouahid G, Leirs H, Cosson JF, 2010. Phylogeography of the introduced species
412 *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization
413 history of Madagascar. *Journal of Biogeography* 37: 398--410.

414 38. Dikken H, Timmer VEA, Njenga R, 1981. Three new leptospiral serovars from
415 Kenya. *Tropical and Geographical Medicine* 33: 343--346.

416 39. Feresu SB, Steigerwalt AG, Brenner DJ, 1999. DNA relatedness of *Leptospira* strains
417 isolated from beef cattle in Zimbabwe. *International Journal of Systematic*
418 *Bacteriology* 49: 1111--1117.

419
420

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49**Table 1.** Species, serogroups, serovars and reference strains of *Leptospira* used as antigens for the MAT in this study.

Strain denomination ⁽¹⁾	Species	Serogroup	Possible serovar (or related serovar)	Sequence type defined by MLST [3]
200701203	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Beye/Mini	ST1
200901118	<i>L. borgpetersenii</i>	Pomona	Mozdok	ST10
201001127	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	Undetermined	ST5
200901122	<i>L. borgpetersenii</i> group B	Pyrogenes	Kenya	ST5
201001125	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Undetermined	ST2
200901489	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes/Camlo/Robinsoni	ST2
Wijnberg ⁽²⁾	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Undetermined
Hond Utrecht IV ⁽²⁾	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Undetermined
200803703	<i>L. kirschneri</i>	Mini	Borincana/Unipertama/Hebdomadis	ST9
201001128	<i>L. kirschneri</i>	Grippityphosa	Undetermined	ST13
200801774	<i>L. kirschneri</i>	Grippityphosa	Grippityphosa	ST6

⁽¹⁾ Denomination from Institut Pasteur, Paris.⁽²⁾ Reference strains.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 2. Primer and probe sequences used in this study.

Primers or probe	Sequences	References
Hamster GAPDH C	5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'	9
Hamster GAPDH D	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	9
LipL32-45F	5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3'	10
LipL32-286R	5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'	10
LipL32-189P (probe)	FAM- 5'-AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3' -BHQ1	10
A	5'-GGCGGCGCTCTTAAACATG-3'	11
B	5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'	11
C	5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3'	11
RS4	5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3'	12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 3. Distribution of serogroup and seroprevalence by animal species. The minimum and maximum MAT titres are indicated in brackets.

	Black rats (<i>Rattus rattus</i> , n = 125)	Flying foxes (<i>Pteropus</i> <i>seychellensis</i> , n = 49)	Brown lemurs (<i>Eulemur fulvus</i> , n = 50)	Vaccinated ⁽¹⁾ domestic dogs (n = 22)	Non-vaccinated domestic dogs (n = 7)	Non-vaccinated stray dogs (n = 8)
Mini	7 (100--400)	-	-	-	2 (200, 800)	4 (200--6,400)
Pyrogenes	1 (200)	4 (200--400)	1 (200--400)	-	-	1 (400)
Grippotyphosa	3 (100--1,600)	1 (200)	-	-	-	-
Icterohaemorrhagiae	-	-	-	10 (100--12,800)	1 (800)	-
Canicola	nd	nd	nd	1 (200)	1 (100)	2 (100)
Co-agglutinins	3	-	-	10	2	-
Total seropositive (%)	14 (11.2%)	5 (10.2%)	1 (2%)	21 (95.5%)	6 (85.7%)	7 (85.7%)

⁽¹⁾ Up-to-date vaccination (< 1 year).

nd: not done

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

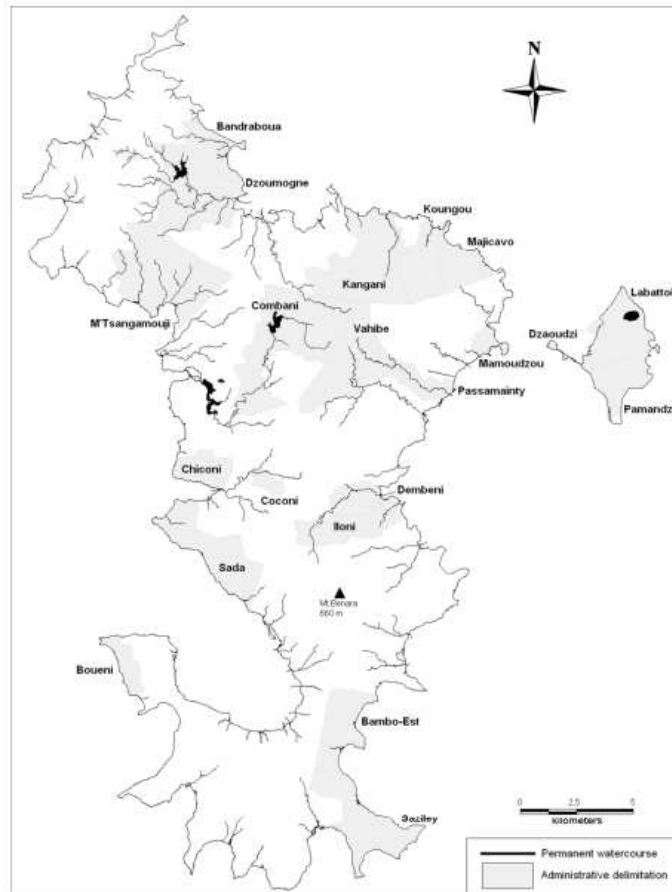
Table 4. Relative proportions of infecting serogroups in patients and wild non-vaccinated animals (MAT), and relative proportions of *Leptospira* species in patients and rats (16S rRNA sequencing of kidneys).

	<i>Leptospira</i> serogroup				<i>Leptospira</i> species			
	Mini	Pyrogenes	Grippityphosa	Pomona	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. interrogans</i>	<i>L. kirschneri</i>	<i>L. borgpetersenii</i> group B
Lemurs (n = 50) and <i>Pteropus</i> bats (n = 49)	0%	83.3%	16.6%	0%	nd	nd	nd	nd
Non- vaccinated dogs (n = 15)	46.2%	7.7%	0%	0%	nd	nd	nd	nd
Rats ⁽¹⁾	50%	7.1%	21.4%	0%	45%	35%	10%	10%
Humans ³ (n = 94)	70.5%	18%	8.5%	3%	52.1%	8.5%	23.4%	15.9%

⁽¹⁾ MAT: 125 rats, 16S partial sequences: 20 rats.

nd: not done.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Cartography of Mayotte and sampling sites (S. Girard, ADEM-GESAM/CIRAD).
107x142mm (300 x 300 DPI)



CHAPITRE VIII : DISCUSSION GENERALE



1. Discussion sur la méthodologie

1.1. Quelle(s) méthode(s) d'investigation ?

Dans notre étude, nous avons employé quatre techniques de recherche de la présence d'une infection (récente ou ancienne) par *Leptospira* chez les mammifères :

- La sérologie par MAT,
- La qPCR sur reins,
- La qPCR sur urines,
- La culture de tissu rénal.

1.1.1. Test de microagglutination (MAT)

Le MAT est le test de référence sérologique pour la détection des anticorps anti-*Leptospira* sanguins et pour montrer une séroconversion chez des patients grâce à des sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence [13, 597]. Le MAT est "spécifique" de sérotype (et non de sérovar) [13]. Il est communément admis que le sérotype pour lequel on observe le plus fort titre d'anticorps lors du MAT est considéré comme le sérotype infectant. Or les réactions croisées entre sérotypes sont fréquentes et il existe de nombreux exemples de réactions paradoxales dans lesquelles des anticorps hétérologues, dirigés contre d'autres sérotypes que le sérotype infectant, apparaissent pendant la phase initiale de la réponse immunitaire [13, 320]. Des études ont montré que la prédiction du sérovar infectant ne se révélait exacte que dans 50% des cas [320]. D'après Levett [320] la sensibilité du MAT pour la prédiction du sérotype infectant (définie comme la proportion d'isolats identifiés par culture dont le sérotype correspond au sérotype prédominant identifié en sérologie) est d'environ 45%, tandis que sa spécificité (définie comme la proportion de patients avec un sérotype prédominant sérologiquement et dont l'isolat appartient au sérovar correspondant) est d'environ 65%. Le risque d'erreur d'identification du sérotype par sérologie est plus élevé lorsque le prélèvement sanguin est effectué en phase aiguë ou en début de convalescence [320, 597]. De plus, pour le diagnostic, le nombre de souches dépasse rarement vingt et ces souches correspondent à celles identifiées ou escomptées être présentes dans la population. Si une souche inconnue dans cette région (car jamais identifiée) circule dans la population, elle ne sera pas détectée [320].

Néanmoins, si on considère les résultats du MAT au sein d'une population (et non pour un individu isolé), ceux-ci permettent d'avoir une idée globale des sérogroupes circulant à l'échelle de la population [320].

Le MAT est une technique "observateur-dépendante", c'est-à-dire que son résultat peut varier en fonction du manipulateur [13] et, pour un même échantillon, une différence d'une dilution entre deux résultats obtenus pour deux observateurs n'est pas significative.

Enfin, en aucun cas le MAT ne permet de dater une infection puisque la durée de vie des anticorps et leur cinétique de diminution sont très variables en fonction des individus [416, 418, 598]. De plus, les recontaminations stimulent l'augmentation des titres des anticorps sériques dirigés contre la souche infectante, mais, aussi, par réaction croisée, contre d'autres sérogroupes responsables d'infections antérieures ou vaccinaux (réactions paradoxales) [320]. On sait aussi que des vaccinations antérieures peuvent influencer la réactivité du sérovar [599]. L'analyse sérologique de sérums appariés permet de discriminer une infection courante d'une infection passée. Mais un tel protocole n'est pas envisageable chez des animaux sauvages.

La détermination d'un seuil de positivité (1:100 dans notre étude) est aussi cruciale dans les études de séroprévalence. Mais le choix est toujours discutable. En prenant un seuil de 1:100, qui est le seuil le plus utilisé dans les études épidémiologiques animales ou humaines, nous avons voulu rechercher tous les animaux ayant été en contact avec *Leptospira*. D'autres études ont choisi de prendre un seuil de positivité inférieur (1:25, 1:30, 1:50) [297, 381, 600] ou égal à 1:100 [311, 339, 356, 601-604] ou plus élevé [264, 310], allant même jusqu'à 1:1600 [141] permettant ainsi la détection des animaux infectés récemment.

1.1.2. Amorces utilisées pour la qPCR

Nous avons choisi d'utiliser des séquences d'amorces (LipL32-45F/LipL32-286R) et une sonde d'hydrolyse (LipL32-189P) déjà publiées [150]. Ces amorces montrent une bonne sensibilité [150, 460] et une spécificité de 100% pour les *Leptospira* pathogènes [150]. La sensibilité de détection de notre technique qPCR, évaluée au laboratoire sur une souche de référence titrée, était de 1-2 bactérie(s) par μ l, ce qui corrobore les résultats de Bourhy *et al.* [460] pour ces amorces. Il est néanmoins probable que la prévalence du portage rénal estimée

chez les rats noirs de Mayotte soit sous-estimée dans notre étude. En effet, en 2011, Bourhy *et al.* [460] ont publié la présence de deux mésappariements dans la séquence de l'amorce anti-sens LipL32-286R et deux autres dans la séquence de la sonde Taqman LipL32-189P (**Figure 42**) publiées par Stoddard *et al.* [150] qui empêchent l'amplification optimale et la quantification précise en qPCR des isolats de Mayotte avec ces amorces (cette publication est parue après que nous ayons terminé l'analyse par qPCR des échantillons de reins de rats noirs de Mayotte et nous n'avons pas eu le temps de refaire les analyses avec d'autres amorces pour comparer).

		LipL32-45F	
FioL1-130	1	AAGCATTACCGCTTGTGGTGC	TTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGGACACAATCCCAGGGACAAACGA
Lborg1929	1	AAGCATTACCGCTTGTGGTGC	TTTCGGTGGTCTGCCAAGCCTAAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGAGCACAGTTCAGGAACAAACGA
FioL1-130	91	AACCGTAAAAACGTTACTTCCCTACGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACGT	AAAGCCAGGACAAGCCCGGACGCGTTTAGTCGATGG
Lborg1929	91	AACGTAAAAACATTTCTTCTTACGGAACAGTAATCAACTACTATGGTTACATC	AAAGCCAGGACAAGCCCGGACGCGTTTAGTCGATGG
FioL1-130	181	AAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTGGATTCTGCCGT	AATCGCTGAAATGGGAGTTC
Lborg1929	181	AAGCAAAAAAGCATACTACTCTACGTTTGGGTACTGCCGT	AATCGCTGAAATGGGAGTTC

LipL32-286R

Figure 42 : Séquences nucléotidiques du gène *lipL32* de *L. interrogans* sérovar *Copenhageneri* souche Fiocruz L1-130 (FioL1-130) et *L. borgpetersenii* souche 200801929 (Lborg1929) [460].

Les séquences des amorces et de la sonde sont représentées sur fond noir (la séquence d'ADN de la souche Fiocruz L1-130 sert de référence pour les séquences publiées des amorces et de la sonde). Les nucléotides ayant un fond blanc au sein des séquences sur fond noir indiquent les positions de mésappariements (d'après [460]).

1.1.3. Comparaison des techniques

Au cours d'une étude épidémiologique en Australie en 2007-2008, Tulsiani *et al.* [580] ont collecté des échantillons à partir de chauves-souris frugivores (*Pteropus conspicillatus*) et de rongeurs afin de connaître le rôle potentiel des chauves-souris dans la transmission de la leptospirose aux rongeurs. Les prélèvements comprenaient des sérums, des échantillons de tissu rénal et des urines, et les méthodes de détection employées ont été la culture, le MAT, la PCR en temps réel et la coloration argentique de frottis. Cette étude a permis de comparer les techniques et d'identifier quelle était la meilleure méthode de détection des leptospires dans les échantillons biologiques :

- Peu de cultures se sont révélées positives alors que de nombreux rongeurs se sont révélés porteurs de *Leptospira* par les autres méthodes de détection, probablement à cause des contaminations de nombreuses cultures ;
- Les résultats de sensibilité et de spécificité pour les différents tests diagnostiques indiquent que l'isolement de *Leptospira* par culture est très peu

sensible comparé aux résultats de la PCR, mais que sa spécificité est élevée. Par ailleurs, le faible taux de réussite des cultures à partir de prélèvements est constaté dans de nombreuses études [485, 495, 561] ;

- La prévalence du portage rénal estimée par la méthode PCR sur tissu rénal et urine est supérieure à celle estimée par la culture.

La sérologie permet d'identifier les animaux qui ont été en contact avec la bactérie et pour lesquels des anticorps agglutinants circulent encore, mais elle ne permet pas de connaître leur rôle épidémiologique dans la transmission de la maladie. Par ailleurs, la présence de leptospires au niveau sanguin témoigne d'une infection récente mais pas du statut de réservoir. Le statut d'animal réservoir ne peut être affirmé sans la démonstration du portage rénal et de l'excrétion. Par ailleurs, la détection de *Leptospira* dans les urines, par culture ou par PCR, ne peut être la seule méthode d'investigation utilisée dans une étude épidémiologique car l'excrétion des leptospires par les hôtes réservoirs est intermittente. C'est pourquoi, la recherche de leptospires doit être conduite sur tissu rénal en priorité, spécifiquement dans la région corticale ou subcorticale [86]. Il est aussi possible d'investiguer la transmission verticale par recherche de la bactérie sur les tissus fœtaux [86].

L'isolement d'une souche locale est essentiel pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la leptospirose à une échelle locale [13, 135]. La culture est également le meilleur moyen d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour l'étude génétique des isolats, mais permet aussi la caractérisation sérologique précise de l'isolat, voire son utilisation dans un panel local de MAT.

Notre expérience de terrain et de laboratoire nous montre que cette technique est très difficile, coûteuse, et qu'elle demande un investissement considérable en temps, notamment parce que le prélèvement doit être stérile, et l'ensemencement rapidement après la mort de l'animal [13], ce qui est assez difficile à mettre en œuvre avec des prélèvements effectués sur le terrain sur des animaux sauvages, dans des conditions parfois précaires (alors que cela est plus simple à mettre en œuvre avec des animaux de laboratoire).

Compte-tenu de sa sensibilité, permettant la détection de l'ADN de *Leptospira* dans des échantillons biologiques de petite taille, et de sa spécificité, pouvant être optimisée par l'utilisation de sondes, la PCR en temps réel s'est imposée comme la technique de choix pour la recherche de réservoirs animaux de *Leptospira*.

De plus, la PCR est une technique robuste, peu affectée par les contaminants. Le prélèvement de choix est un échantillon de tissu rénal prélevé au niveau cortical, mais pour les espèces protégées, comme *Mormopterus francoismoutoui* dans notre étude, une investigation de l'excrétion urinaire est la méthode à privilégier.

1.1.4. Amélioration de la technique de culture

La détection des leptospires par culture constitue la méthode de référence pour le diagnostic de leptospirose [9]. Les limites inhérentes à cette méthode de diagnostic sont notamment le temps de croissance de *Leptospira* (le temps de doublement de *Leptospira* issu d'un prélèvement biologique frais est de 14-18 heures [9]). La méthode nécessite donc une mise en incubation d'au moins 13 semaines à 29-30°C avant de pouvoir certifier qu'une culture est négative, et une observation hebdomadaire des cultures au microscope à fond noir [9]. De plus, la contamination ou la dégradation des échantillons sont fréquentes avec des prélèvements d'animaux sauvages et les problèmes liés au transport sont importants à considérer. Idéalement, la mise en culture doit se faire dans les 15 minutes suivant la mort de l'animal, avant l'autolyse post-mortem qui permet aux micro-organismes de migrer entre les fluides et les tissus [605] (ce problème n'est pas rencontré lors de mise en culture de sang de patients humains). Au sein du milieu de culture, les spores fongiques et les bactéries entrent en compétition avec les leptospires [9]. De plus, même en cas de réussite de l'isolement, la culture *in vitro* de *Leptospira* est très exigeante du point de vue des conditions de température et de pH [9]. L'ensemble de ces facteurs rend l'isolement des leptospires sur le terrain très difficile [326, 571, 606].

Nous avons choisi de ne pas ajouter d'antibiotique ni d'inhibiteur spécifique dans nos milieux de culture afin de ne pas inhiber la croissance des *Leptospira*. Ce choix s'est avéré discutable puisque des contaminants se sont développés dans la plupart de nos cultures. De plus, pour un meilleur taux de réussite de la culture, il est recommandé pour chaque échantillon de faire plusieurs cultures [13], ainsi que des dilutions de la culture initiale au 1/10, 1/100 et 1/1000. Un tel protocole était trop lourd à mettre en place techniquement et financièrement.

L'utilisation d'antibiotiques permet de s'affranchir partiellement du problème des contaminations et s'est révélée très efficace dans différentes études pour augmenter la

sensibilité de la culture [485, 561, 571]. Par ailleurs, notre travail montre qu'il serait possible de cibler les reins à mettre en culture en choisissant préférentiellement les animaux ayant une protéinurie (résultat obtenu très rapidement sur le terrain grâce à l'analyse par bandelette urinaire), puisque ces animaux ont plus de chance d'être porteurs au niveau rénal.

Cette sélection, combinée à l'utilisation d'antibiotiques comme inhibiteurs de contamination, pourrait augmenter la sensibilité de la méthode de culture et conduire ainsi à l'isolement de souches de leptospires depuis les animaux réservoirs à La Réunion.

1.2. Utilisation des séro-buvards

Dans notre étude de la séroprévalence de la leptospirose dans la population réunionnaise [607], nous avons employé la technique de sérologie sur buvards montrant l'intérêt de cette méthode pour les études à grande échelle. Il était initialement prévu de mettre en œuvre cette technique sur les prélèvements sanguins sur buvard effectués sur les petits animaux (musaraignes, souris et chauves-souris), mais cela n'a pu être fait au cours de la thèse.

La sérologie sur buvard est une technique présentant plusieurs avantages :

- Facilité de prélèvement [607-610],
- Facilité de transport [607-609],
- Les buvards sont légers et ne peuvent se casser [609],
- Facilité de conservation [607-609],
- Nécessite peu d'espace pour le stockage [609, 610],
- Utilisable pour des enquêtes à grande échelle [607],
- Utilisable en pays en voie de développement (ne nécessite pas de respect de la chaîne du froid, conservation à température ambiante [609]...),
- Prélèvement peu invasif [607],
- Coût peu élevé [609, 610],
- Possibilité d'envoi par voie postale [609].

Néanmoins, cette technique présente quelques inconvénients :

- Différence d'une à deux dilutions entre la méthode sur buvard et la sérologie sur sérum fluide [608, 609],
- Légère gêne à la lecture du MAT à cause des fibres de buvard non broyées encore présentes,

- Nécessité d'utiliser des buvards certifiés pour le prélèvement sanguin [609],
- Contamination possible par contact entre les buvards s'il y a contact entre des buvards non secs [611],
- Difficulté d'élution des anticorps, qui est dépendante du tampon d'élution utilisé [611],
- Diminution de la réactivité des anticorps au cours du stockage si les conditions de ce stockage ne sont pas optimales [610].

Grâce à ses nombreux avantages, la méthode des séro-buvards permet les études à grande échelle. Elle permet aussi des analyses sérologiques sur des espèces de petite taille ou protégées, chez qui la quantité de sang prélevable est faible. Enfin, la méthode des séro-buvards pourrait être utilisée pour des suivis de séroprévalence et de mesure de l'incidence au sein des populations humaines et animales, grâce à un suivi de la séroprévalence au cours de l'année. Il est en effet envisageable de prélever une cohorte par simple pique du doigt chez l'Homme, ou dans l'oreille chez la plupart des animaux, avant la saison des pluies et après, afin de suivre le taux de séroconversion au sein des populations humaines et animales.

1.3. Méthode de quantification de la charge bactérienne rénale

Le rendement de la qPCR est dépendant de la qualité, de la quantité et de la pureté de l'ADN dans l'échantillon, notamment de la présence d'inhibiteurs. L'objectif de l'extraction est d'isoler un ADN intègre, pur, et en quantité suffisante pour une détection optimale de l'ADN par qPCR. Une fois que l'ADN a été extrait, le taux de dégradation de l'ADN varie significativement et dépend notamment du temps de conservation et de la température, du type d'échantillon et du protocole d'extraction (notamment de la composition du tampon d'élution) [612]. Le choix de la méthode de prélèvement, la taille de l'échantillon et le type de matériel affectent la qualité et la quantité d'ADN extrait à partir d'un échantillon [612].

Un seul opérateur a procédé à la totalité des prélèvements et des extractions, ce qui limite grandement les variations dues à l'échantillonnage et celles dues au processus d'extraction. Par ailleurs, chaque échantillon de tissu rénal a été pesé et, en moyenne, les 557 échantillons de tissus rénaux extraits pesaient $23,2 \pm 1,4$ mg. Les recommandations du fabricant du kit d'extraction étaient d'utiliser 20-25 mg de tissu rénal par extraction, ce qui a par conséquent été respecté, avec un intervalle de variation faible.

Nous n'avons pas quantifié le taux de dégradation de l'ADN stocké. Néanmoins, les extractions ont été regroupées sur une période de temps la plus courte possible et les qPCR ont été conduites à la suite des extractions, dans l'ordre d'extraction, ce qui implique que le temps de conservation des échantillons extraits a été similaire pour la totalité des échantillons, limitant ainsi les variations inter-échantillons du taux de dégradation de l'ADN.

Pour la quantification de la charge bactérienne rénale, nous avons utilisé un standard externe de concentration connue qui a été inclus dans chaque run. Notre méthode de quantification de la charge bactérienne rénale implique que le rendement d'extraction est considéré égal à 100%. Ce préalable, bien que théorique et non réalisable dans les faits, était la condition à poser afin de pouvoir comparer les charges bactériennes rénales entre les différents échantillons. Ce préalable ayant été posé pour tous les échantillons, nous considérons que la comparaison inter-échantillon est objective et correcte, par contre, la quantification en elle-même est probablement sous-estimée puisque nous n'avons pas extrait la quantité totale d'ADN du tissu rénal, et par ailleurs, lors du stockage des échantillons, cette quantité a diminué [612].

Il n'existe pas de méthode standard pour le prélèvement, la détection et la quantification de *Leptospira* dans les échantillons tissulaires. Il existe néanmoins de nombreuses méthodes de quantification de l'ADN, mais toutes ont leurs limites d'utilisation et d'applications [612]. La qPCR nous a semblé être une méthode alternative à la quantification des leptospires dans les tissus qui peut aussi être réalisée par culture, coloration argentique ou immunofluorescence.

1.4. Représentativité des échantillonnages

L'échantillonnage des animaux sur les deux îles devait être représentatif des populations animales à étudier. Le mode opérationnel a été le même sur les deux îles (les deux échantillonnages ont été conduits par la même personne). L'objectif était d'obtenir dans le temps imparti au travail de terrain, un maximum d'animaux représentatifs des espèces que l'on voulait étudier.

A La Réunion, les prélèvements des animaux de rente (bovins, caprins, porcins, ovins et cervidés) et de fourrière (chiens et chats) ont été conduits "en aveugle", c'est-à-dire que nous avons échantillonné tous les animaux se présentant, et que lors du prélèvement nous ne

tenions pas compte de leur provenance géographique, ni de leur âge ou de leur sexe. Cette méthode a permis d'obtenir un large panel d'animaux, de provenances géographiques diverses, représentatifs des animaux abattus à l'abattoir de Saint-Pierre (pour les animaux de rente) et des animaux ramassés par la fourrière du Tampon (carnivores errants).

L'échantillonnage des tangles a été biaisé par le fait que les chasseurs bénévoles participant à l'étude étaient libres de nous donner l'animal de leur choix à l'issue de leur chasse. Il en résulte que nous avons obtenu des animaux d'origines géographiques différentes, mais dans l'ensemble, plutôt de petite taille (les chasseurs gardaient les animaux les plus gros pour leur consommation personnelle). Il est difficile de dire si cela a influencé nos résultats.

L'échantillonnage des musaraignes, rats et souris a été conduit sur les mêmes sites, de façon simultanée. A Mayotte comme à La Réunion les sites étaient choisis en fonction de deux critères majeurs : 1/ que les conditions environnementales soient favorables aux rats (bordure de cours d'eau, écotone, déchetterie...), 2/ de la possibilité de poser les pièges à l'abri du regard des curieux (afin d'éviter les vols), de plus, à Mayotte, nous avons essayé de travailler au maximum près de zones habitées. Nous avons, sur les deux îles, essayé d'explorer des environnements divers (champs cultivés, zones proches d'habitations, bordure de rivière, zones ayant des déchets à proximité...). Les populations de rats sur les deux îles et de souris et de musaraignes à La Réunion sont probablement très importantes, mais non estimées, et connaissent des fluctuations. Il n'est pas possible d'évaluer le nombre d'animaux qui aurait été statistiquement représentatif de la population de chacun de ces micromammifères. Comme nous l'avons dit précédemment, notre étude est une photographie du statut de ces populations à un temps donné.

Les captures de lémuriniens et de roussettes dépendent beaucoup :

- de la chance de l'opérateur à repérer une famille (pour les lémuriniens) ou une zone d'alimentation accessible à pieds et où il est possible de poser le filet (pour les roussettes),
- des animaux qu'il est possible d'anesthésier au fusil hypodermique, c'est-à-dire qui ne se sauvent pas une fois repérés (cas des lémuriniens),
- des animaux qui rentrent et restent dans les mailles du filet (pour les roussettes).

Ces biais sont inhérents à la capture d'espèces sauvages et ne peuvent être évités. Néanmoins, nous pensons que l'échantillonnage des lémuriniens et des roussettes à Mayotte, conduit dans différentes zones de l'île, est assez représentatif de ces deux populations.

Les chiens domestiques à Mayotte représentent la population de chiens "tout-venant" reçus en consultation quotidienne par les vétérinaires locaux. Notre échantillonnage semble représentatif de la population de chiens domestiques. Par contre; l'échantillonnage de chiens

errants est trop faible (grande difficulté de capture) pour être représentatif de la grande population de chiens errants de cette île. Pour obtenir un échantillonnage représentatif de cette population animale, les moyens à mettre en œuvre seraient importants tant du point de vue humain que du temps nécessaire.

2. Hypothèses sur les origines et la diversité des leptospires à La Réunion et à Mayotte par l'histoire du peuplement par les mammifères

Dans ce chapitre, nous limiterons notre propos aux mammifères, qui sont les principaux hôtes des leptospires. La majorité des informations historiques proviennent de l'ouvrage d'Anthony Cheke et Julian Hume "*Lost Land of the Dodo*" [613] et de l'article d'A. Cheke "*The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western Indian Ocean oceanic islands*" [425]. Les compléments d'informations ont été obtenus directement auprès de l'auteur.

2.1. Colonisation de La Réunion et Mayotte par les mammifères

La Réunion était totalement inhabitée avant d'être découverte par des navires européens en route vers les Indes vers 1500. Au début du XVII^e siècle, l'île était une escale sur la route des Indes pour les bateaux anglais et néerlandais. Les Français y débarquèrent pour en prendre possession en 1642 et la baptisèrent île Bourbon. C'est en 1665 qu'arrivèrent les vingt premiers colons de l'île Bourbon. Les seuls animaux alors présents sur l'île étaient des reptiles (tortues terrestres et lézards), des oiseaux et des chauves-souris (dont quatre espèces aujourd'hui disparues) [614]. Les animaux domestiques arrivèrent par bateaux depuis l'Europe. Les anglais y amenèrent des chèvres et des cochons en 1629, les français y débarquèrent des bovins en 1949. Initialement, aucun rat n'était présent sur l'île de La Réunion, le rat noir arriva avec les bateaux européens au milieu des années 1670, suivi du chat en 1685, introduit par les colons pour lutter contre le rat. Le rat surmulot fut introduit depuis l'Europe en 1735, tandis que la souris domestique fut décrite pour la première fois en

1754 (mais elle devait avoir été introduite bien avant). La musaraigne fut introduite une première fois depuis l'Inde ou Madagascar vers 1740 mais cette population s'est éteinte, elle fut ensuite re-introduite à La Réunion depuis Maurice, au XIX^e siècle, tandis que le cerf *Rusa* fut importé comme gibier depuis Maurice pour la première fois en 1750 (population éteinte, puis ré-introduite de nombreuses fois par la suite, toujours depuis Maurice). Les colons introduisirent un autre gibier, depuis Madagascar, le tangué, en 1801. Des lémuriens (*Varecia variegata*) furent importés à La Réunion depuis Madagascar comme animaux domestiques, et des individus échappés ont constitué une petite population vers 1820 qui s'est maintenue jusque vers 1870 (**Figure 43**). On sait par ailleurs qu'une petite population de zébus fut introduite sur l'île depuis Madagascar (*Anthony Cheke, communication personnelle*).

La colonisation de Mayotte par les hommes est beaucoup plus ancienne que celle de La Réunion puisque des traces de civilisation datant du VIII^e siècle ont été décrites sur cette île. Les premiers habitants des Comores (et de Mayotte) étaient des africains. Ces premiers habitants possédaient des chèvres (originaires d'Afrique), des poules et des chats (dont l'origine est inconnue) ; les tenrecs *Tenrec ecaudatus* et les lémuriens *Eulemur fulvus* étaient aussi présents à cette époque, importés depuis Madagascar pour la chasse. Le rat noir *R. rattus* était déjà présent au VIII^e siècle, introduit depuis l'Afrique et/ou Madagascar, tandis que le rat surmulot *R. norvegicus* n'est à ce jour décrit sur aucune des îles des Comores. Le mouton est décrit pour la première fois à Mayotte vers le XI-XII^e siècle. La présence du cochon sauvage à Mayotte *Sus scrofa* est récente (> 1840). La petite civette indienne (*Viverricula indica*) fut introduite à Mayotte depuis l'Inde pour le commerce des sécrétions de leurs glandes périnéales, utilisées notamment en médecine traditionnelle. L'introduction de la civette date probablement du XI^e siècle, mais sa première description fut faite vers 1820 (**Figure 43**).

Tollenaere *et al.* [426] ont montré que les îles de l'Océan Indien présentaient différents types génétiques de *R. rattus*, reflétant des histoires de colonisation différentes par cette espèce. Ainsi les trois génotypes de *R. rattus* identifiés à Mayotte sont très proches des génotypes malgaches et totalement différents des génotypes de *R. rattus* d'Afrique de l'est et d'Europe. Les premiers habitants de Mayotte étant d'Afrique de l'Est, soit les rats de Madagascar étaient les premiers colonisateurs de l'île, soit ils sont arrivés secondairement mais ont supplanté les populations de rats est-africaines.

Par contre, La Réunion ne présente qu'un seul génotype de *R. rattus*, similaire à celui rapporté en Europe, Amérique, Afrique du Sud, Afrique de l'ouest et Océanie, qui s'est implanté lors de la colonisation de l'île par les européens.

zone géographique mais peuvent être adaptées à différents réservoirs [55], par exemple chez des animaux au Pérou [290, 615], en Tanzanie [616], à La Barbade [617], dans l'environnement en Malaisie [57], chez l'Homme à Mayotte [74]. Il est bien entendu difficile de savoir si ces souches sont réellement limitées à ces régions ou non retrouvées ailleurs car non recherchées.

- La souche, introduite avec une espèce mammalienne, n'a pas les capacités de s'adapter aux autres espèces animales hôtes introduites ou autochtones (elle peut être létale pour ces espèces ou ne pas avoir les capacités biologiques pour s'installer au niveau rénal) et ne dépendra que de l'espèce avec laquelle elle a été introduite pour sa survie : cette souche ne se retrouvera donc que chez une seule espèce et sa survie dépendra de cette seule population d'hôte.
- La souche, introduite avec une espèce mammalienne, a les capacités de s'adapter à plusieurs espèces locales introduites et/ou autochtones, sa survie dépendra alors d'un panel d'hôtes diversifiés, habitant différents milieux. Si en plus cette souche a les capacités de s'adapter aux écosystèmes locaux, elle pourra alors coloniser un grand nombre d'hôtes et d'habitats.

Les différentes origines des populations de rats noirs commensales de l'Homme peuvent induire des contrastes régionaux en ce qui concerne les zoonoses [574]. Par exemple, les trois pandémies de peste ont probablement émergé dans trois régions différentes, occupées par des lignées différentes de rats noirs : la peste de Justinien venue d'Afrique qui a sévit entre 541 et 767, la peste bubonique venue d'Asie au XIV^e siècle, et la peste pandémique survenue au XIX^e siècle, venue d'Asie [574].

Sur les îles, le regroupement par importation d'espèces réservoirs et de souches de *Leptospira* d'origines diverses peut être à l'origine d'une importante biodiversité "composite" de *Leptospira*, au sein de laquelle les souches restent inféodées à leur réservoir d'origine ou s'adaptent à de nouveaux réservoirs.

Les rats présents à La Réunion sont d'origine européenne [426] et les sérologies conduites sur cette île démontrent la circulation chez les animaux (et l'Homme) de sérogroupes "communs" en Europe, telles qu'Icterohaemorrhagiae, Canicola, Panama, Pyrogenes et Sejroe. Les rats de Mayotte proviennent d'Afrique de l'est et de Madagascar [426].

Actuellement une seule publication décrit la présence de *Leptospira* à Madagascar (une seule souche identifiée comme *L. interrogans* sérovar Kuwait [485] et non décrite à Mayotte à ce jour). Par contre, les souches est-africaines ont été plus étudiées, elles montrent une relative diversité [58, 386, 387, 618-621] et certaines souches présentes en Afrique de l'est ont été identifiées comme responsables de cas cliniques à Mayotte. Par exemple la souche mahoraise 200901122 (ST5) est similaire à *L. borgpetersenii* sérovar Kenya souche Nijenga [229] qui a été isolée pour la première fois en 1968 à partir d'un rat fouisseur (*Saccostomus campestris*) au Kenya [621] ; la souche 200801774 (ST6) est similaire à *L. kirschneri* sérovar Grippytyphosa souche Moskva [229] qui a aussi été retrouvée au Zimbabwe. Ainsi, les rats introduits à Mayotte depuis l'Afrique de l'est par les premiers colons, s'ils ont été totalement supplantés par les *R. rattus* introduit depuis Madagascar [426], ont pu néanmoins introduire des souches de *Leptospira* est-africaines. Les souches est-africaines auraient alors subi une pression de sélection génétique (liée à l'hôte originaire de Madagascar et à l'environnement) et certaines ont survécu et se sont adaptées à leurs nouveaux hôtes malgaches, eux-mêmes probablement porteurs de souches de *Leptospira* venant de leur région d'origine.

Par conséquent, compte-tenu du fait La Réunion et Mayotte ne comptaient aucun mammifère terrestre avant l'arrivée des hommes, nous émettons l'hypothèse que les leptospires présents actuellement ont des origines similaires à leurs hôtes animaux et que les souches circulant à La Réunion proviennent principalement d'Europe, tandis que l'origine de la diversité et de l'originalité génétique des souches de *Leptospira* retrouvée à Mayotte trouve probablement son origine dans la diversité génétique des souches est-africaines et malgaches.

Si notre hypothèse est vraie, il apparaît donc que la biodiversité originelle des souches s'est maintenue sur les deux îles, sans échange de souches entre ces deux territoires (où s'il y a eu échange, sans maintien des souches dans leur nouvel environnement). La colonisation d'un territoire étant généralement le fait d'un petit nombre d'individus [476, 622], il est possible que le sérotype Icterohaemorrhagiae n'ait pas été importé à Mayotte avec les animaux colonisateurs. Si ce sérotype a été introduit par la suite, il semble qu'il n'ait pas trouvé de niche écologique propice à sa survie

2.3. Notion de co-évolution hôte-pathogène : *Rattus rattus*, espèce clé de la diversité des souches de *Leptospira* ?

La réponse de l'hôte à un pathogène est une optimisation basée sur le coût physiologique de la réponse immunitaire *versus* le coût de l'infection par le pathogène sans la mise en œuvre des mécanismes de défense (**Figure 44**) [623]. Ainsi, des hôtes comme le chat ou les rongeurs, fréquemment en contact avec *Leptospira* par l'environnement ou leurs habitudes alimentaires et sociales ont probablement un coût d'adaptation au pathogène intéressant comparé à la pathogénicité potentielle de ce pathogène. A l'inverse, chez les hôtes "accidentels", très sensibles, chez qui l'infection peut être létale, comme l'Homme, le hamster, la gerbille ou le cheval, l'évolution n'a pas favorisé l'adaptation de l'hôte à *Leptospira* car pour ces espèces, moins en contact avec la bactérie, probablement parce que le coût de l'adaptation était trop élevé par rapport aux pertes subies par la présence du pathogène dans cette population d'hôtes [623].

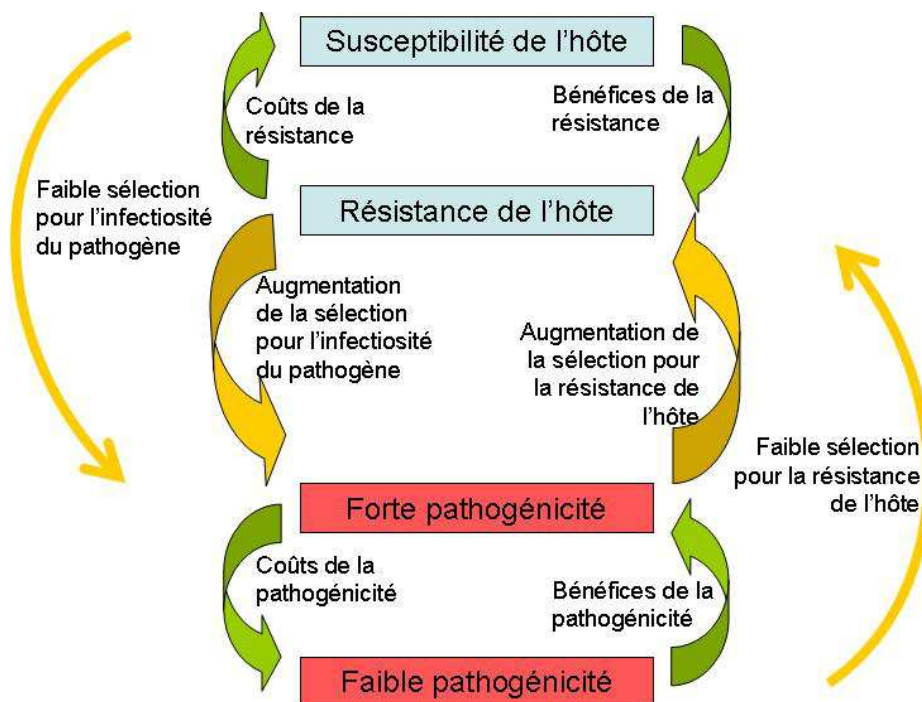


Figure 44 : Représentation schématique du phénomène de co-évolution.

Réciprocité des changements dus à la sélection dans une espèce (hôte ou pathogène) qui imposent la sélection de changements dans l'autre espèce (pathogène ou hôte respectivement). Les flèches vertes indiquent la sélection intra-spécifique; les flèches jaunes indiquent la sélection inter-spécifique (d'après [624]).

Une des questions centrales de l'épidémiologie contemporaine des maladies infectieuses concerne la création et le maintien de la diversité des pathogènes [625]. La notion de co-évolution hôte-pathogène est implicite pour *Leptospira* car exprimée dans la notion même de "réservoir" : « *Generally, coadaptation between the usual host and a variety of Leptospira leads to an asymptomatic infection* » [24]. L'adaptation de *Leptospira* aux rongeurs est acceptée, de même que l'adaptation spécifique des sérovars à une espèce animale en particulier (*Canicola* pour le chien, *Copenhageni* pour le rat, *Ballum* pour la souris...) [9, 73].

Or, nos résultats prouvent que le rat noir à Mayotte possède une grande capacité d'adaptation en tant qu'hôtes (asymptomatique) à quatre espèces de *Leptospira* et que réciproquement, ces différentes espèces de leptospires semblent adaptées à cet hôte.

Réservoir des quatre espèces génomiques circulant chez l'Homme, le rat semble être l'élément clé, garant du maintien de la diversité et de l'originalité génétique des souches de *Leptospira* à Mayotte.

Les stratégies évolutives connues pour les bactéries pathogènes montrent que ces dernières connaissent généralement une évolution leur permettant de s'adapter à un/des hôte(s), qui assure(nt) ainsi leur survie et leur transmission [626, 627]. Réciproquement, la cause la plus évidente de la sélection des gènes de l'immunité chez les hôtes est probablement la présence d'un agent pathogène, on parle de sélection dictée par le pathogène ("*pathogen-driven selection*"). Ainsi, à l'échelle d'une région géographique, il existe une corrélation entre la variabilité génétique des hôtes et la diversité des agents pathogènes présents [628].

L'idée que les pathogènes et les hôtes ont des effets évolutifs les uns sur les autres est une hypothèse attractive dont les implications pour les sciences médicales et vétérinaires commencent seulement à être reconnues [624]. Les agents pathogènes sont une cause majeure de mortalité dans les populations humaines et animales, par conséquent, ils imposent une forte pression de sélection sur le génome de leurs hôtes [628]. Bien que la documentation soit fournie en ce qui concerne la co-évolution de pathogènes avec leurs hôtes invertébrés, les plantes ou les bactéries, l'intérêt scientifique pour ce qui est des pathogènes de l'Homme et autres vertébrés ayant une espérance de vie relativement importante est plus récent [628-634]. Aujourd'hui, les données des études de génétique des populations laissent entrevoir comment la sélection naturelle a façonné l'immunité et les défenses de l'hôte, au sein d'une population en particulier, ou à l'échelle globale [628, 632]. Des phénomènes de co-évolution se mettent

en place entre toutes populations en interaction, proies et prédateurs, compétiteurs ou mutualistes, mais elle est plus importante dans les systèmes hôtes-pathogènes à cause de la nature très "intime" de l'association et des fortes pressions de sélection que chacun peut exercer sur l'autre [624]. C'est pourquoi, bien que cette idée soit controversée, dans ce contexte de co-évolution, nous pensons que le chat peut être un réservoir privilégié de *Leptospira*.

La théorie de l'évolution prédit que la sélection favorise la spécialisation des pathogènes si les hôtes sont abondants, alors que les stratégies généralistes apparaissent dans des conditions dans lesquelles la rencontre avec l'espèce hôte est moins prévisible [625]. Mayotte compte une faune mammalienne relativement réduite (par rapport à d'autres régions tropicales), nous sommes par conséquent dans un contexte où les hôtes sont peu abondants pour le pathogènes *Leptospira*. *R. rattus* est le seul représentant du genre *Rattus* à Mayotte, cependant, l'île compte (au moins) trois haplotypes de cette espèce non retrouvés à La Réunion (qui ne présente qu'un seul variant) [426]. En supposant que chaque haplotype représente un hôte particulier (sur les plans génétique et biologique), alors, Mayotte présente une diversité d'hôtes privilégiés pour *Leptospira* (c'est-à-dire du genre *Rattus*) plus importante qu'il n'y paraît. Nous nous retrouvons alors dans un contexte d'hôtes abondants ; la spécialisation de chaque espèce de *Leptospira* à un haplotype de *R. rattus* est une hypothèse intéressante qui permettrait d'expliquer la diversité génétique des souches circulant à Mayotte.

Le concept de polymorphisme lié à la multiplicité des niches ("*multiple niche polymorphism*") qui décrit la diversification des populations par leur adaptation à différentes niches écologiques [635] (c'est-à-dire à différents hôtes si on parle de parasites) peut expliquer la diversité génétique de *Leptospira* à Mayotte. La co-évolution de *Leptospira* avec une diversité de variants génétiques d'hôtes privilégiés comme *R. rattus* à Mayotte pourrait expliquer la diversité génétique de la bactérie sur cette île. Au contraire la co-évolution de ce pathogène avec un seul variant génétique de *R. rattus* à La Réunion peut être une explication à l'homogénéité génétique apparente des populations de *Leptospira* sur cette île.

Cette hypothèse pourra être vérifiée par le typage génétique simultané des rats noirs et des leptospires qu'ils hébergent [574]. Si cette hypothèse est juste, compte-tenu de la radiation génétique qu'a connue *R. rattus* à Madagascar, on devrait s'attendre à une grande diversité des souches circulantes de *Leptospira*. Mais d'autres facteurs peuvent rentrer en jeu...

3. Epidémiologie comparée de la leptospirose sur les deux îles

Le **Tableau 46** compare les résultats pour les espèces communes étudiées à La Réunion et à Mayotte, c'est-à-dire rats noirs, chiens et bovins (l'étude sur les bovins n'a pas été faite dans le cadre de ce travail de thèse).

Tableau 46 : Résultats comparés pour trois espèces animales à La Réunion et à Mayotte, les chiens, les rats noirs, les bovins.

Espèces	Chiens errants		Rats noirs		Bovins	
	La Réunion	Mayotte	La Réunion	Mayotte	La Réunion	Mayotte ^a
Séroprévalence (%)	23/50 (46,0)	7/8 (87,5)	52/66 (78,8)	14/124 (11,2)	30/87 (34,5)	33/284 (11,6)
Prévalence du portage rénal (%)	7/24 (29,2)	nd	50/76 (65,8)	42/141 (29,8)	14/76 (18,4)	nd

^a Résultats de l'enquête conduite par l'Institut Pasteur de Paris en 2010.
nd : Non déterminé.

La méthode utilisée pour l'étude de prévalence du portage rénal a été la même pour les deux études et les résultats sont donc comparables.

La séroprévalence est significativement plus élevée chez les rats noirs à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2=84,28$; dl = 1 ; p-value < 10^{-5}). La séroprévalence est significativement plus élevée chez les bovins à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2 = 22,54$; dl = 1 ; p-value < 10^{-5}). Le trop faible nombre de chiens errants prélevés à Mayotte ne nous permet pas une comparaison statistique des séroprévalences. La prévalence du portage rénal est significativement plus élevée chez les rats noirs à La Réunion qu'à Mayotte ($\chi^2 = 30,65$; dl = 1 ; p-value < 10^{-7}).

Pourquoi l'incidence de la leptospirose humaine est-elle très supérieure à Mayotte (25 cas pour 100 000 habitants par an contre 8,69 cas à La Réunion) alors que la séroprévalence et la prévalence du portage rénal chez les principaux mammifères réservoirs sont significativement inférieures à ce qui est observé à La Réunion ?

Plusieurs explications peuvent être avancées :

- L'exposition de l'Homme à *Leptospira* est plus importante à Mayotte, liée à une densité de population élevée (511 habitants/km² contre 320 à La Réunion), au mode de vie et aux conditions sanitaires locales ;
- L'environnement à Mayotte est plus favorable à la survie et à la transmission de *Leptospira* à l'Homme ;
- Ces différences observées sont liées à un biais d'échantillonnage et les échantillons ne sont pas représentatifs des populations animales (nombre d'individus trop faible, répartition des sites de capture non homogène...)

Dans les zones rurales, la transmission de la leptospirose est principalement associée à l'élevage d'animaux de rente [636], avec une augmentation du risque pendant la saison des pluies [245]. Avec 15 500 ménages agricoles, éleveurs ou cultivateurs, qui représentent 30% du total des ménages mahorais, Mayotte présente une population rurale importante (8% de la population active déclarée comme "agriculteur" contre 2% à La Réunion), très exposée à la maladie. Dans les zones urbaines, l'infection est généralement associée à la surpopulation, des conditions d'hygiène pauvres, des installations sanitaires inadéquates, l'accumulation des déchets ménagers (par manque de système de ramassage et de traitement) et à la pauvreté [245]. Or, les conditions sanitaires, le système de ramassage des déchets et les conditions de logement à Mayotte sont globalement de qualité inférieure à celles observées à La Réunion (**Tableau 47**). A São Paulo (Brésil), une étude a montré que dans presque la moitié des cas, l'infection avait lieu au domicile, liée à la précarité des conditions de vie [637]. En plus du climat favorable au maintien et à la transmission de la leptospirose, les facteurs socio-économiques favorisent au maintien d'une forte incidence de la leptospirose à Mayotte [637-639].

Tableau 47 : Confort des résidences à Mayotte et à La Réunion.

(Source : INSEE - Recensements de la population de Mayotte 2007 [419]; La Réunion 2006 [409])

Équipement	Mayotte (2007)	La Réunion (2006)
Électricité dans le logement (% des logements)	91,9	99,1
Eau dans le logement (% des logements)	76,2	96,6
W-C / latrines (% des logements)	65,4	98,3
Douche ou baignoire dans le logement (% des logements)	30,2	95,0
Habitations de fortune (% du parc immobilier)	43	13,9

Bien que le réservoir animal semble moins contaminé à Mayotte qu'à La Réunion, il est probable qu'à Mayotte, les conditions climatiques, la forte densité de population et les

facteurs socio-économiques favorisent le maintien de la bactérie dans l'environnement d'une part, et sa transmission d'autre part.

On observe que chez les animaux, la diversité des sérogroupes circulant est supérieure à La Réunion, avec onze sérogroupes identifiés tandis que seulement quatre sérogroupes ont été retrouvés à Mayotte (**Figure 45**). Cette différence peut en partie provenir du panel d'antigènes utilisé : pour les sérums de La Réunion nous avons utilisé un panel de 17 antigènes composé de souches de référence, et pour ceux de Mayotte nous avons utilisé un panel de 11 souches dont 9 sont des souches isolées localement. De plus, les espèces et le nombre d'animaux étudiés sur les deux îles sont différents. Il est par conséquent difficile de tirer des conclusions sur la diversité des sérogroupes.

Néanmoins, les données de sérologie et de biologie moléculaire montrent que la différence majeure dans l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion et à Mayotte est l'absence du séro groupe *Icterohaemorrhagiae* à Mayotte aussi bien chez l'Homme [229] que chez les animaux alors qu'il est le principal séro groupe responsable des infections humaines à La Réunion et le séro groupe majoritaire retrouvé chez les rats sur cette île (données non confirmées par isolement ou séquençage).

A Mayotte, la mise en évidence de la diversité des souches est surtout due à l'effort de détection par la mise en culture du sang des patients malades [74] qui n'est pas faite systématiquement à La Réunion. Les autres hypothèses pouvant être avancées pour expliquer la différence dans la diversité des souches circulant sur les deux îles sont les suivantes :

1/ Hypothèse liée à l'historique de la colonisation des îles par les hôtes de *Leptospira*

Voir section 2 de ce Chapitre.

2/ Hypothèse liée au contexte écologique

Avec un climat chaud et humide, et une densité de micromammifères réservoirs aussi importante, La Réunion et Mayotte constituent des environnements idéaux pour la survie et la transmission des leptospires [640]. La présence de leptospires dans l'eau est positivement corrélée à la turbidité de l'eau [641]. Il est probable que le type de sol, les caractéristiques des eaux douces et le climat (un peu plus chaud et humide à Mayotte) induisent des durées de survie des souches différentes entre ces deux îles ;

3/ Hypothèse liée à la faune sauvage

Mayotte compte deux espèces sauvages, non retrouvées à La Réunion et dont les populations sont relativement importantes : les lémuriens et les roussettes. Ces deux espèces, pouvant vivre à proximité de l'Homme, contribuent-elles de manière significative au maintien de certaines souches de *Leptospira* ? De même, quelle est la nature et l'importance de la circulation des leptospires entre roussettes, rats et lémuriens, tous trois partageant des écosystèmes anthropisés ?

4/ Hypothèse liée à la diversité génétique de *R. rattus* à Mayotte

Voir section 2 de ce Chapitre.

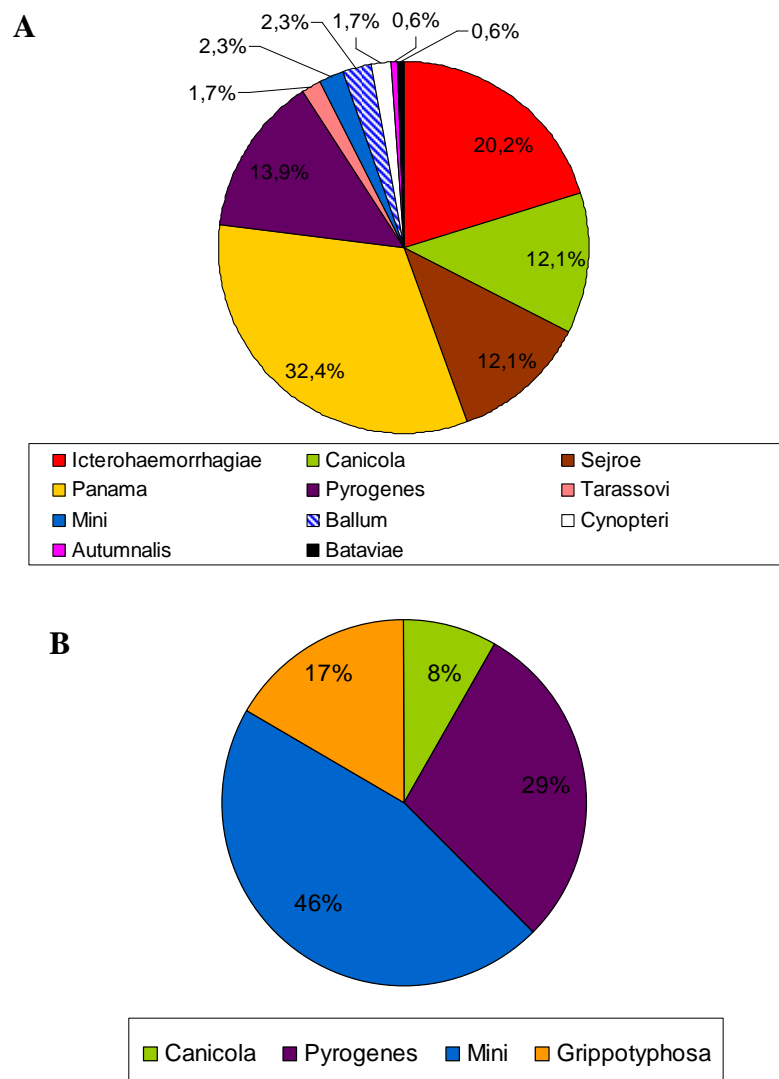


Figure 45 : Sérogroupes identifiés par MAT chez les animaux de deux îles de l'Océan Indien.

A. Résultats sérologiques sur douze espèces animales de la Réunion (n = 224) prélevées en 2009 ;
B. Résultats sérologiques sur quatre espèces animales de Mayotte (n = 54) prélevées en 2007 (les données sur les chiens domestiques ne sont pas incluses car biaisées par la vaccination).

4. Conséquences en santé vétérinaire

4.1. Prévention de la leptospirose chez les animaux domestiques

Les animaux domestiques, chiens, chats, nouveaux animaux de compagnie (rats, souris, furets, hamsters...) sont très souvent négligés dans l'évaluation du risque d'infection par *Leptospira* chez l'Homme. Les chiens, parce qu'ils sont le plus souvent vaccinés et, par conséquent, considérés par l'opinion commune comme protégés donc non porteurs, les chats, parce qu'ils ne sont pas considérés comme potentiellement porteurs par la majorité des praticiens vétérinaires, quant aux rongeurs en cage, on pense rarement à eux comme source de contamination. Pourtant, des cas sont rapportés de contamination par des chiens domestiques [642-644] ou des rats domestiques [645]. Par ailleurs, nous rappelons que l'infection du chien par *Leptospira* est souvent asymptomatique [356, 646].

La protection de l'infection clinique chez les chiens et de l'installation des bactéries au niveau rénal doivent être les deux objectifs clés de la vaccination [347]. La durée de l'immunité vaccinale chez les chiens varie en fonction des études, mais on reconnaît généralement une durée d'immunité vaccinale d'environ un an [343], bien que cette durée soit controversée. Les anticorps vaccinaux sont stimulés à chaque contact avec une souche sauvage et les titres post-vaccinaux peuvent être très élevés (≥ 1600) [647].

Chez les chiens domestiques, la prévention de la maladie doit passer par l'application d'un protocole de vaccination adapté aux conditions épidémiologiques locales. Cela implique l'utilisation d'un vaccin dirigé contre les sérogroupes circulant localement.

Nous avons vu que le vaccin bivalent actuellement disponible en France protégeait contre les deux principaux sérogroupes circulant chez les canidés à La Réunion (*Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*), mais que d'autres souches non comprises dans le vaccin circulaient sur cette île, laissant présager un possible changement d'épidémiologie de la leptospirose chez les chiens, comme cela a été observé aux Etats-Unis [265, 646] et dans certains pays d'Europe [333, 648] où le vaccin bivalent *Icterohaemorrhagiae/Canicola* a été utilisé depuis plus longtemps que dans les Départements français d'Outre-mer. A Mayotte, la question de l'intérêt de la vaccination des chiens avec le vaccin bivalent se pose. En effet, notre étude ne prouve pas la circulation du séro groupe *Icterohaemorrhagiae* tandis que le séro groupe *Canicola* semble circuler faiblement chez les chiens. La diversité des souches circulant chez les rats et les chiens errants laisse supposer que la protection des chiens

domestiques par le vaccin bivalent est probablement insuffisante. L'utilisation d'un vaccin canin contenant (au moins) la valence Mini pourrait-elle être envisageable à Mayotte?

Par ailleurs, l'incidence de la leptospirose connaît chez le chien des variations intra- et inter-annuelles [141, 649], notamment en fonction de la pluviométrie [270, 505] et le protocole vaccinal doit prendre en compte les saisons à risque accru pour les animaux. Il pourrait être envisageable de vacciner les chiens avant la saison des pluies qui est la période de contamination par voie indirecte la plus à risque, et éventuellement d'effectuer un rappel six mois plus tard pour les chiens les plus exposés (à La Réunion ceux vivant à l'est par exemple, les chiens servant à la chasse aux tangles...).

Il est important de suivre l'évolution des sérogroupes circulant dans la population canine afin d'évaluer l'intérêt de la vaccination des chiens domestiques avec le vaccin bivalent. Il est essentiel d'adapter les valences et le protocole vaccinal à l'épidémiologie propre de la maladie chez les canidés sur chaque île.

Des mesures de prophylaxie autres que la vaccination (non disponible pour les chats) peuvent être imaginées pour protéger les animaux domestiques de l'infection par *Leptospira* :

- Instauration d'une période de quarantaine pour tous les carnivores domestiques et les nouveaux animaux de compagnie entrant sur les territoires réunionnais et mahorais, pendant laquelle un examen clinique et des tests sérologiques pourraient être conduits ;
- Limiter les baignades en eaux douces ;
- Eviter la divagation des animaux domestiques qui peuvent, en ces occasions, être en contact avec des animaux errants excréteurs ou des environnements contaminés ;
- Lutter de façon collective, raisonnée, efficace (et peut être de façon saisonnière) contre les rats, souris et musaraignes ;
- Lutter contre les carnivores errants, source de contamination probable des animaux domestiques.

La lutte contre la leptospirose canine, zoonose majeure, doit être incluse dans les programmes de lutte contre la maladie.

4.2. Prévention de la leptospirose chez les animaux de rente

Nous montrons qu'une forte proportion du cheptel réunionnais est porteuse de leptospires au niveau rénal. Même si la leptospirose ne représente aucun risque de transmission par l'alimentation, savoir qu'une forte proportion du cheptel est atteinte de cette maladie peut induire une réaction défavorable chez les consommateurs [510]. Par ailleurs, le risque pour les éleveurs, personnels d'abattoir, vétérinaires, etc. est élevé.

Un programme de contrôle optimal contre la leptospirose chez les animaux de rente doit prévenir l'apparition des symptômes cliniques et l'excrétion urinaire chez les animaux. Une des approches prophylactiques mises en œuvre dans différents pays comme les Etats-Unis, le Brésil, les Pays-Bas, le Royaume-Uni, l'Espagne, le Portugal ou encore l'Italie, est la vaccination à grande échelle dans le cheptel bovin et/ou porcin. Néanmoins, il n'existe actuellement pas de vaccin contre les leptospires possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) française, ce qui représente une contrainte majeure à la lutte contre la leptospirose chez les animaux de rente en France. Il existe différents vaccins commercialisés pour les bovins, certains incluant les valences Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae et Pomona, d'autres sont bivalents et incluent les valences Hardjo et Pomona. Une des limites à l'utilisation de ces vaccins est qu'ils ne protègent que contre quelques sérogroupes et n'empêchent pas l'infection par des sérogroupes non inclus dans la préparation vaccinale.

La vaccination peut aussi être pratiquée chez les cervidés. Une étude pratiquée en Nouvelle-Zélande sur deux troupeaux de cerfs (*Cervus elaphus*) infectés par *Leptospira* a montré que la vaccination d'un troupeau avec un vaccin bivalent (*L. interrogans* sérovars Pomona et Hardjo) n'induisait pas de meilleurs résultats dans le taux de fécondation qu'un troupeau non vacciné, mais par contre, la vaccination permettait de réduire les mortalités périnatales [650].

D'autres mesures de lutte peuvent être appliquées, notamment la détection des animaux porteurs au sein du troupeau, leur isolement, et l'élimination de la bactérie par un traitement antibiotique efficace [408, 513, 651, 652]. Il est aussi important d'assécher les zones humides dans les bâtiments d'élevage et d'éviter de mettre les animaux dans des pâtures humides (bien que cela soit difficile à réaliser en zone tropicale lors de la saison des pluies). Le pâturage commun avec des animaux de statut inconnu augmente aussi les risques de contamination [518].

La lutte contre les rongeurs, musaraignes et animaux errants est un des points majeurs de la lutte contre la leptospirose dans les élevages d'animaux de rente [408]. Il faut éliminer ces petits mammifères des bâtiments d'élevage, lutter au niveau des silos ou des stocks de grains qui les attirent (**Figure 46**), mais aussi au niveau des auges où les animaux réservoirs peuvent uriner.

Tout animal nouvellement introduit au sein d'un élevage doit subir une période de quarantaine stricte [408] permettant d'effectuer des tests sérologiques, voire une détection de *Leptospira* au niveau urinaire²⁵. Ces mêmes tests doivent être pratiqués sur les animaux utilisés en monte naturelle car la transmission vénérienne de *Leptospira* a été démontrée chez les bovins [653, 654], les caprins [401], et les porcs [9, 655]. Enfin, les semences utilisées pour l'insémination artificielle doivent être contrôlées vis-à-vis de cette maladie [397, 398, 401, 656-658].

Néanmoins, à Mayotte, ces mesures restent relativement complexes à mettre en œuvre du fait des nombreuses introductions illégales d'animaux sur l'île, notamment depuis les Comores, et de l'absence de laboratoire vétérinaire équipé pour effectuer ces analyses.



Figure 46 : Exemple de zone attractive pour les rats dans une exploitation bovine.

Les éleveurs doivent veiller à ce que les silos soient fermés et à ce que les granulés tombés hors du silo soient ramassés. De plus, les friches aux abords de l'élevage doivent être éliminées car ces écotones représentent des zones favorables aux rats.

²⁵ Cette recherche dans les urines doit être répétée pendant la quarantaine à cause de l'intermittence de l'excrétion.

On pourrait imaginer détecter les troupeaux infectés par l'observation des lésions rénales macroscopiques à l'abattoir (points blancs dans le parenchyme rénal) [659, 660]. Néanmoins, des études montrent que l'absence de lésions ne signifie pas que l'animal n'est pas infecté par *Leptospira* [661]. En effet, Chappel *et al.* [662] montrent que 7,5% des porcs examinés présentant des reins normaux étaient infectés par *Leptospira* et que 23,5% des reins présentant des points blancs étaient contaminés. Au Vietnam, Boqvist *et al.* montrent l'absence d'association entre le statut de porteur rénal et la présence d'anomalies macroscopiques au niveau rénal [547]; une autre étude montre qu'aucune lésion macroscopique au niveau des organes reproducteur n'a été mise en évidence chez 16 truies séropositives au MAT [663].

La recherche des lésions rénales macroscopiques à l'abattoir ne peut constituer une méthode efficace de détection des animaux porteurs de *Leptospira* [664].

5. Intérêt de ce travail pour la santé humaine

5.1. Coût de la maladie

Peu de recherches ont été menées sur les conséquences économiques de la leptospirose, de sorte que les informations manquent sur le coût sociétal de cette maladie, notamment le coût des soins de santé, de la perte de productivité due aux séquelles de la maladie mais aussi des pertes de productivité agricole [221].

En Nouvelle-Calédonie, le coût de l'épidémie de leptospirose du premier semestre de 2008 a été estimé à 5361 euros par patient (157 patients diagnostiqués) [172]. En incluant le coût des diagnostics négatifs et de la prévention, le coût global de cette épidémie a été estimé à 984 472 euros, soit 3,95 euros par habitant [172].

Au Brésil, l'impact financier de la leptospirose a été estimé à 22,9 millions de réals (~ 9,5 millions d'euros) en 2007 pour le manque à gagner des salariés, tandis que les coûts hospitaliers s'élèveraient à 831 500 réals (~ 344 590 euros) pour cette même année [665].

Par ailleurs, en plus du coût lié aux malades, il existe un coût important lié aux campagnes de prévention, à l'édition de prospectus, le tournage de spots publicitaires pour la

télévision ou la radio... Les dépenses liées à la prévention ont été estimées à 25 024 euros en Nouvelle-Calédonie en 2008 [172]. Enfin, une des dépenses majeures dans la prévention et le contrôle de la leptospirose est celle liée aux campagnes de dératisation. Cette dépense annuelle a été évaluée à 27 020 euros pour la seule ville de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) [172].

A La Réunion, le raticide (antagoniste de la vitamine K) le plus utilisé est la bromadiolone, mélangée avec du maïs concassé (0,005%), et conditionnée dans des sachets de 30 g. Le difénacoum peut aussi être utilisé, et depuis peu le brodifacoum (0,001%) est disponible sur l'île [666]. La Fédération Départementale des Groupement de Défense contre les Organismes Nuisibles de la Réunion (FDGDON) coordonne deux campagnes de dératisation par an dans la plupart des communes de l'île : la première campagne se déroule de mi-mars à fin mai, lorsque les cannes à sucre sont en pleine croissance ; la seconde campagne a lieu de mi-octobre à mi-décembre lorsque la coupe est déjà avancée et que les rats se réfugient dans les parcelles encore hautes pour trouver un abri [666]. Ces campagnes visent à protéger les agriculteurs vis-à-vis de la leptospirose et à limiter les pertes agricoles directes liées aux rats. Entre 2006 et 2011, c'est en moyenne 65 tonnes de raticides qui sont distribués annuellement par le FDGDON (sur la base de 3 kg/ha). Le coût annuel de ces campagnes de dératisation est élevé, en 2011 le seul coût du raticide était de 3,66 euros/kg, soit environ 240 000 euros/an (*Didier Pastou, directeur du FDGDON Réunion, communication personnelle*). Ces quelques chiffres nous montrent que les moyens mis en jeu dans la lutte contre les rats sont très importants à La Réunion et leur coût très élevé.

5.2. Population à risque et mesures de prévention

La prévalence du portage rénal de la bactérie responsable chez les différentes espèces animales étudiées à La Réunion est élevée et témoigne de l'importance de l'exposition de la population réunionnaise à *Leptospira*. A Mayotte, les séroprévalences estimées dans les populations de quatre espèces de mammifères sauvages (lémurs, rats, roussettes, chiens errants) montre l'importance du risque zoonotique représenté par les rats et les chiens en particulier, et le risque potentiel représenté par les lémuriens et les roussettes.

Si en zones tempérées, l'exposition est surtout professionnelle [9, 13], à La Réunion aussi bien qu'à Mayotte, l'ensemble de la population peut être considérée comme à risque.

En effet, les rongeurs et les musaraignes sont présents dans tous les écosystèmes, et vivent proches de l'Homme. De plus, les chiens et chats errants représentent une population importante, qui participe à la contamination environnementale des écosystèmes ruraux et urbains.

5.2.1. Mesures générales en population humaine

Le vaccin disponible pour l'Homme est un vaccin monovalent qui protège contre le sérotype Icterohaemorrhagiae, mais l'efficacité de ce vaccin est souvent remise en cause [667]. De plus, la vaccination induit un sentiment de "protection" chez les personnes vaccinées alors qu'elles peuvent être infectées par un sérotype autre qu'Icterohaemorrhagiae.

Notre étude montre que même si d'autres sérotypes sont retrouvés chez les animaux, Icterohaemorrhagiae est le sérotype principal retrouvé chez les rats et il est le sérotype majoritaire retrouvé chez les patients hospitalisés à La Réunion [202, 412]. Le vaccin peut par conséquent être protecteur pour la population réunionnaise globale. Par contre, ce vaccin est peu adapté pour les éleveurs, les vétérinaires ruraux et les personnels d'abattoir qui sont, d'après nos résultats, professionnellement plus exposés aux sérotypes Sejroe, Panama et Pyrogenes hébergés majoritairement par les animaux de rente.

À Mayotte, peu de cas cliniques sont liés au sérotype Icterohaemorrhagiae. Le vaccin disponible en France semble donc inapproprié à l'épidémiologie de la leptospirose à Mayotte.

La prévention de la transmission peut se faire par le port de vêtements longs (pour éviter les égratignures et empêcher ainsi la pénétration de la bactérie par voie cutanée), le port de gants, et de bottes (porter des "claquettes" ou marcher pieds-nus sont des facteurs de risque de contamination [185]). Même si ces mesures ne sont pas toujours "pratiques" à mettre en œuvre (par exemple pour les travailleurs aux champs, il est contraignant de porter des bottes), à La Réunion comme à Mayotte, ces mesures de prévention basiques pourraient s'appliquer facilement en population agricole. La prévention peut aussi passer par l'amélioration du stockage des aliments (destinés à la consommation humaine ou animale) et la sensibilisation sur le risque d'utiliser les eaux stagnantes ou les eaux de pluie pour les usages de la vie courante (lavage du linge, toilette, lavage des véhicules...) [222].

Il est évident qu'un plan rationnel de contrôle doit être basé sur la connaissance des sources d'infections et que la dynamique de l'épidémiologie nécessite un système de surveillance permanent. Ainsi, les mesures de prévention et de contrôles doivent être imaginées sur mesure en fonction de la zone considérée [222].

A cause de la complexité et de la dynamique de l'épidémiologie de la leptospirose, il n'existe pas de règles générales pour la prévention et le contrôle de la maladie dans les populations humaines. Le contact direct ou indirect avec les urines des animaux excréteurs est la source de l'infection. La prévention et le contrôle de la maladie chez l'Homme doivent donc se focaliser sur la réduction des sources d'infection et la prévention de la pénétration de la bactérie dans le corps de cet hôte accidentel.

Enfin, la croissance de la population humaine et le développement de systèmes de transports rapides ont permis une connexion de l'ensemble des biotopes de la planète. Le résultat en a été une rupture des barrières géographiques et l'introduction de nouvelles espèces dans de nouveaux habitats [631]. Le milieu insulaire a, en théorie, pour avantage un meilleur contrôle des intrants puisque toute arrivée se fait par voie maritime (ports) ou voie aérienne (aéroports) et que des postes de contrôles peuvent être mis en place à ces positions stratégiques. Il est aujourd'hui essentiel de limiter l'introduction de nouvelles souches de leptospires à La Réunion et Mayotte par un contrôle des hôtes animaux de cette bactérie pouvant être introduits sur les îles (arrivées de rats par les bateaux et d'animaux domestiques et de rente par voie aérienne ou maritime).

5.2.2. Quels moyens de lutte contre les petits mammifères ?

La lutte contre les micromammifères est un point essentiel de la lutte contre la leptospirose humaine à La Réunion et à Mayotte. Néanmoins, c'est sans compter la grande adaptabilité de ces espèces à différents environnements ainsi que la grande capacité de reproduction qui rend la lutte en milieu anthropisé et tropical, riche en ressources alimentaires, très difficile.

Une étude conduite en Tanzanie a montré une forte saisonnalité entre l'incidence de la leptospirose chez l'Homme et le pic d'abondance de la population de rongeurs infectés dans les régions agricoles. Leurs résultats indiquent que la suppression des rongeurs par capture

plutôt que la réduction de la proportion d'environnements favorables pour les rongeurs avait un meilleur impact sur la réduction du nombre de cas humains de leptospirose [155].

Les fluctuations d'abondance des populations de réservoirs sauvages sont une explication attractive aux variations temporelles de l'incidence des cas humains de leptospirose. En effet, une forte abondance, associée à des conditions climatiques favorables [157, 194], favorise la dissémination d'une part et la survie d'autre part des leptospires dans le milieu [668] et induit ainsi une augmentation de l'incidence de la maladie chez les différentes espèces animales, dont l'Homme [492]. En Nouvelle Calédonie, Perez *et al.* [571] montrent que les épidémies de leptospirose humaine dans cette région d'hyper-endémicité peuvent survenir suite à des conditions météorologiques favorables (pluie, chaleur et humidité) conduisant à une augmentation du nombre de rongeurs réservoirs entraînant une augmentation de l'exposition de la population. Néanmoins, une revue des études de terrain sur les rongeurs réservoirs de zoonoses montre que l'existence d'une corrélation positive entre l'abondance des hôtes et la prévalence de la maladie est difficile à établir et que les fluctuations de population chez les rongeurs ne permet pas d'expliquer la totalité des variations dans l'incidence d'une zoonose chez l'Homme [668].

La synthèse d'Howald *et al.* [257] démontre sans ambiguïté que l'éradication de populations insulaires de rongeurs commensaux est réalisable. Ils ont établi que parmi les 344 tentatives d'éradication des populations de *Rattus* commensaux recensées, 318 ont été couronnées de succès. Il faut cependant garder à l'esprit que la quasi-totalité de ces îles est inhabitée et qu'en dépit de l'augmentation spectaculaire de la superficie des îles traitées avec succès enregistrée ces vingt dernières années, la plus vaste ne couvre que la superficie de 113 km². En conséquence, dans l'état actuel des connaissances et des moyens disponibles, il n'est guère envisageable d'éradiquer les populations de rongeurs commensaux d'îles densément peuplées et de vaste superficie comme La Réunion et Mayotte.

La lutte contre les petits mammifères réservoirs ne peut se faire sans une connaissance approfondie de la biologie et de la répartition de ces animaux à l'échelle locale [475]. L'utilisation de raticide doit être raisonnée et des tests de résistance aux anticoagulants doivent être conduits afin d'évaluer la molécule la plus adaptée localement. Le contrôle des populations de rongeurs doit être fait collectivement, tout au long de l'année, les actions doivent être mutualisées et adaptées aux différents écosystèmes (les fréquences des opérations de dératisations peuvent être différentes selon si on dératisé un champ de canne, un quartier

urbain ou un verger par exemple). Les coûts d'un tel programme et les moyens humains sont considérables. Est-il possible d'envisager un tel programme aujourd'hui ?

5.2.3 Vacciner le cheptel pour protéger la population humaine

En Nouvelle-Zélande, le nombre de cas de leptospirose humaine a fortement baissé entre les années 1950 et 1990 grâce à une importante campagne de vaccination du cheptel bovin dirigée contre *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo et *L. interrogans* sérovar Pomona, les deux sérovars les plus retrouvés chez les patients et qui a débuté dans les années 1980 [669]. Néanmoins, durant cette période, une augmentation de la proportion de cas due à *L. interrogans* sérovar Ballum a été observée. La vaccination a donc permis, outre une réduction du nombre de cas de leptospirose humaine annuel, un changement dans l'épidémiologie de la maladie [669].

La vaccination du cheptel est un moyen de lutte efficace contre la leptospirose humaine.
--



**CHAPITRE IX : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE
RECHERCHE**



1. Conclusions

Le dictionnaire Larousse définit l'épidémiologie comme la *"science qui étudie, au sein de populations (humaines, animales, voire végétales), la fréquence et la répartition des problèmes de santé dans le temps et dans l'espace, ainsi que le rôle des facteurs qui les déterminent. L'épidémiologie descriptive peut poursuivre deux objectifs complémentaires :*

- *L'un, de santé publique : en permettant de mieux connaître les problèmes de santé d'une population (animale), elle donne des moyens d'action à différents niveaux (prévention, campagne d'éducation pour la santé...);*
- *L'autre, de recherche : elle permet de mettre en évidence des problèmes mal connus, d'observer des disparités géographiques, qui peuvent faire naître des hypothèses de recherche".*

Ce travail de thèse sur l'épidémiologie de la leptospirose animale à La Réunion visait tout d'abord à actualiser les connaissances au sujet de cette zoonose. A Mayotte, notre travail a consisté en la recherche des réservoirs animaux potentiellement responsables des cas humains. Les enquêtes transversales permettent de décrire l'état de santé d'une population à un moment précis. Notre travail est donc, en quelque sorte, un "cliché" des situations épidémiologiques sur les deux îles étudiées, en 2007 pour Mayotte et en 2009 pour La Réunion. Par une approche similaire (captures d'animaux sur le terrain et analyses par MAT et qPCR) nous démontrons que la leptospirose connaît deux épidémiologies différentes sur ces deux îles tropicales françaises de l'Océan Indien.

Notre étude souligne qu'une zoonose telle que la leptospirose ne peut être contrôlée uniquement par des mesures de vaccination de la population humaine à risque et des mesures de contrôle des populations de rats. La compréhension de l'écologie de cette maladie ayant pour réservoir la faune sauvage et domestique apparaît comme nécessaire [262]. Notre travail est essentiellement descriptif mais l'épidémiologie descriptive constitue le socle des études d'épidémiologie analytique, de la recherche de facteurs de risque, des études de biostatistiques ou des études de phylogéographie.

L'originalité de ce travail de thèse tient :

- Dans le nombre d'animaux et d'espèces étudiés ;

- Dans la conduite d'un travail du terrain au laboratoire et l'utilisation de méthodes de recherche de la présence ou du passage de *Leptospira* sur chaque animal ("*multi-sample-per-mammal, multi-test approach*", recommandé par Tulsiani *et al.* [326]) ;
- Dans la quantification, à La Réunion, de la charge bactérienne rénale par qPCR chez les animaux porteurs de leptospires, qui n'avait jamais été publiée avant ;
- Dans la démonstration grâce au séquençage, de la diversité des souches circulant chez les rats à Mayotte et de leurs similarités avec les souches isolées chez les patients ;
- Dans la recherche de l'origine de la diversité des souches et des divergences dans les épidémiologies de la maladie sur les deux îles étudiées, par l'histoire de la colonisation et des facteurs liés à la diversité génétique locale du rat noir.

Nous montrons l'intérêt de l'utilisation des techniques d'analyse comme le test de microagglutination et la PCR quantitative pour l'évaluation du statut d'un animal vis-à-vis de la maladie, mais nous en avons aussi appréhendé les limites. En particulier dans l'interprétation combinée des différents résultats et l'application de ces données à la définition précise de la notion de réservoir. Notre étude est une approche globale et la notion de réservoir animal est posée à l'échelle de l'espèce et ne peut en aucun cas être appliquée à un individu isolé, prélevé à un moment précis, car la notion de chronicité est essentielle pour qualifier un réservoir.

Nous montrons que les facteurs de terrain, socio-culturels, économiques, biologiques, mais aussi historiques permettent d'appréhender l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion et à Mayotte, et de comprendre les différences observées.

1.1. Epidémiologie de la leptospirose sur l'île de La Réunion

La leptospirose humaine est une maladie bien connue à La Réunion et très médiatisée. La lutte contre les rats (conduite de façon collective par la Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles, FDGDON, et au niveau des élevages par le Groupement Régional de Défense Sanitaire des Elevages Réunionnais, GRDSBR) et la vaccination des travailleurs à risque constituent les principales mesures mises

en œuvre dans la lutte contre la maladie. Des plaquettes d'informations sont aussi diffusées (notamment par l'Agence Régionale de Santé, ARS) et des articles paraissent dans les quotidiens et journaux dédiés aux professionnels les plus exposés.

Nous montrons que la leptospirose est endémique chez la quasi-totalité des espèces étudiées à La Réunion (à part le tenrec) et que les espèces de rente aussi bien que les mammifères sauvages étudiés pouvaient être appréhendés comme des réservoirs potentiels de la maladie. Il apparaît donc que la lutte contre le rat est une mesure de lutte très insuffisante et que la prévention de la maladie doit aussi englober une lutte contre les souris, musaraignes et animaux errants (chiens et chats). La mise en évidence du rôle de réservoirs de la souris et de la musaraigne et le fait que, contrairement aux deux espèces de rats, elles soient "tolérées" dans les habitations, leur confèrent, *a priori*, un rôle majeur dans l'épidémiologie humaine et vétérinaire des leptospiroses à La Réunion.

De plus, la leptospirose est endémique en élevage porcin, caprin, bovin et de cervidés. Nous n'avons pas évalué les pertes économiques liées à la circulation de cette maladie dans les élevages, mais en 2003, la thèse vétérinaire d'Hélène Gares montrait déjà l'importance de la leptospirose comme cause d'avortement en élevage bovin laitier [77]. Il paraît aujourd'hui essentiel de prendre en compte la leptospirose comme une pathologie majeure de l'élevage réunionnais et de mettre en œuvre, à l'échelle de chaque élevage, mais aussi à l'échelle globale, un programme de lutte efficace. Il est important que cette maladie, reconnue pour engendrer des pertes majeures de production, soit incluse dans la liste des pathologies faisant l'objet d'une surveillance par le réseau d'épidémiosurveillance local.

1.2. Epidémiologie de la leptospirose sur l'île de Mayotte

Notre étude souligne l'importance de caractériser génétiquement les souches de leptospires infectant les animaux afin de mieux analyser le risque épidémiologique pour la population humaine [670]. L'identification de 20 séquences de *Leptospira* chez le rat, identiques aux isolats cliniques retrouvés chez les patients malades, associée à la forte densité de rats noirs et de la population humaine, ainsi qu'aux conditions sanitaires souvent précaires de nombreux quartiers de Mayotte, font du rat noir la source zoonotique principale de leptospires sur l'île. Le rat noir semble être l'élément clé du cycle de transmission à Mayotte et

du maintien de la remarquable (et unique) diversité génétique parmi les souches de *Leptospira* sur cette île (dont une souche "endémique").

D'autres animaux sont aussi susceptibles de jouer un rôle dans le cycle de transmission de la maladie, notamment les zébus et les chiens errants. Le rôle des roussettes et des lémuriens doit encore être exploré de manière plus approfondie.

En conséquence, la lutte contre la leptospirose à Mayotte doit inclure des campagnes sanitaires de prévention dans la population humaine expliquant les mesures de protection classiques (port de gants et de chaussures fermées lors du travail en milieu humide, non utilisation des eaux de pluies, gestion des déchets ménagers, désinfection immédiate des plaies...) mais aussi une lutte collective efficace contre les populations de rongeurs et de chiens errants et une meilleure gestion des déchets [595], notamment la suppression des décharges à ciel ouvert.

Un risque pour Mayotte serait l'introduction et l'installation du sérotype Icterohaemorrhagiae *via* l'introduction d'animaux porteurs (rats arrivant par bateaux notamment mais aussi toute espèce animale pouvant héberger ce sérotype) qui modifierait l'épidémiologie et peut être l'écologie des autres souches pathogènes circulantes sur l'île.

1.3. Ecologie et mesures de lutte

L'écologie de la leptospirose, décrite tout au long de ce manuscrit, est résumée dans la **Figure 47**. Les mesures de prophylaxie doivent prendre en compte les différents facteurs de risque ; les principaux points sur lesquels la prévention peut se faire afin de diminuer l'incidence en populations humaines et animales sont énumérés ci-après (les numéros sont reportés sur la **Figure 47**) :

❶ Facteurs sociaux de prévention de la leptospirose :

- Amélioration des conditions de vie de la population (dans les quartiers, et au niveau des habitations individuelles) ;
- Installation de l'eau courante dans les foyers ;
- Mise en place d'un système de ramassage régulier des déchets [91, 183-185, 671] ;
- Développement du réseau d'assainissement de l'eau ;
- Augmentation du niveau d'éducation.

② Prévention de la leptospirose par une meilleure politique d'aménagement du territoire :

- Ne pas construire en zone inondable ;
- Limiter l'expansion des villes dans les zones naturelles (qui augmente les contacts avec la faune sauvage) ;
- Limiter les zones favorables aux rongeurs (entassement de ferrailles, bâtiments abandonnés, couper l'herbe et défricher en bordure des parcelles cultivées ou des abords d'élevage qui sont des lieux refuge pour les rongeurs...)

③ Prévention par la gestion du réservoir animal :

- Lutte collective et individuelle (par les particuliers) contre les petits mammifères réservoirs (rongeurs, musaraignes) ;
- Lutte contre l'errance animale (chiens et chats) : mise en place d'une fourrière animale, stérilisation des animaux domestiques ;
- Sensibilisation des professionnels de la santé animale ;
- Recherche de la présence de la maladie au sein des troupeaux et mise en place d'un traitement antibiotique pour les individus porteurs ;
- Respect d'une période de quarantaine et évaluation du statut sanitaire de tout animal introduit et des animaux utilisés pour la monte naturelle ;
- Vaccination des troupeaux (pas de vaccin disponible en France pour le moment) et vaccination des animaux domestiques avant la saison des pluies (période favorable à la transmission de la maladie) ;
- Evaluation régulière du statut des élevages, connaissance des souches circulant chez les animaux (recherche en santé animale).

④ Moyens de prévention et traitement de la maladie chez l'Homme :

- Développement des méthodes de diagnostic ;
- Sensibilisation des professionnels de santé ;
- Amélioration de la prise en charge des malades ;
- Vaccination des personnes à risque ;
- Connaissance des souches circulant en population humaine et de leur pathogénicité (mise en culture, génotypage, recherche médicale) ;
- Campagnes d'information et de sensibilisation (prospectus, spot télévisés et radiophoniques, information dans les écoles...), notamment en ce qui concerne

les pratiques à risque (marcher pieds-nus, utilisation des eaux de pluie, pêche et baignade en eaux douces...) [9, 185, 233].

⑤ Mesures de prévention pouvant être envisagées au niveau de l'environnement :

- Assèchement des zones humides ;
- Développement des systèmes de drainage des zones inondées [249] ;
- Etude des zones les plus favorables aux petits mammifères (par des protocoles de capture-recapture visant à évaluer la densité de population de chaque espèce de petits mammifères) ;
- Compréhension des mécanismes de survie dans le milieu ainsi que les éléments favorisant cette survie (pH, minéraux, cohabitations avec d'autres bactéries du sol...) par la recherche scientifique.

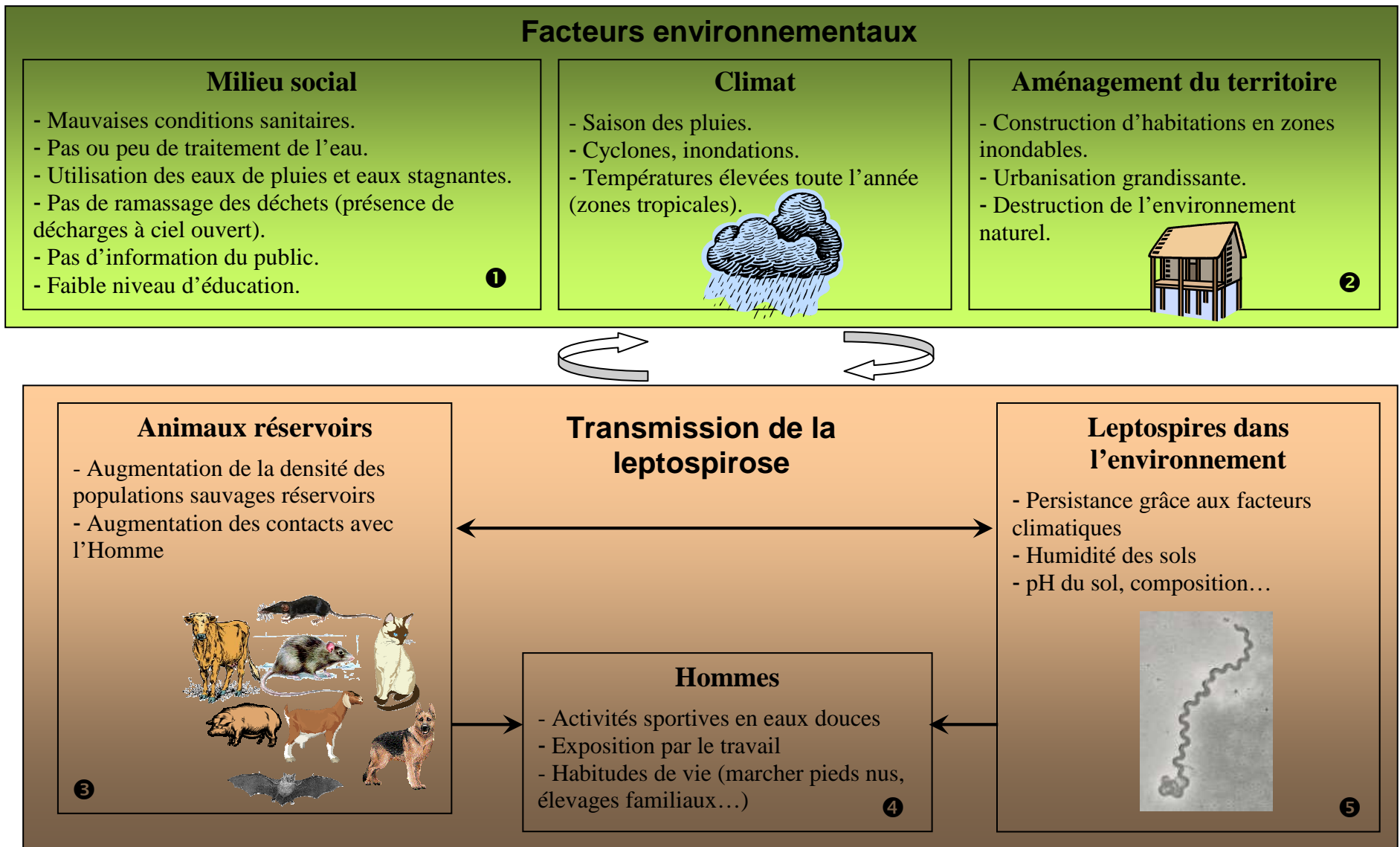


Figure 47 : Ecologie de la leptospirose (d'après [245]).

2. Perspectives de recherche

Nous espérons que ce travail de thèse constituera une base pour la mise en place de recherches plus approfondies sur la maladie et l'amélioration des mesures de prévention dans la population humaine et en médecine vétérinaire.

Les perspectives de recherche sur la leptospirose dans l'Océan Indien sont nombreuses :

□ Tout d'abord, les recherches futures doivent porter sur le typage des souches circulantes, chez l'Homme et chez les animaux. Actuellement, les méthodes de génotypage nécessitent une quantité relativement importante d'ADN, et par conséquent la réussite de cultures bactériennes à partir d'échantillons biologiques. Les méthodes courantes pour le typage génétique de *Leptospira* étaient l'analyse par FAFLP (*fluorescent amplified fragment length polymorphism*) [672-674] ou par RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) [602, 675, 676]. Ces méthodes manquent de pouvoir discriminant, sont très lourdes à mettre en œuvre, coûteuses et peu reproductibles. La méthode d'analyse par PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) [677-679] est toujours très utilisée, bien que lourde à mettre en œuvre, elle présente un bon pouvoir discriminant et une bonne reproductibilité. Depuis quelques années, de nouvelles méthodes de génotypage se développent, notamment la méthode MLVA (*multiple locus variable number of tandem repeats analysis*) basée sur l'amplification et la migration sur gel d'agarose de d'un nombre défini de locus VNTR (*variable number of tandem repeat*) [59-61, 680] et la méthode MLST (*multilocus sequence typing*) basée sur le séquençage d'un nombre défini de gènes (le plus souvent de gènes de ménage) permettant de définir des profils alléliques ou "*sequence types*" [62, 681-683]. Les méthodes d'analyses MLVA et MLST sont plus simples à mettre en œuvre techniquement que les méthodes précédemment citées, et la reproductibilité inter-laboratoire est bonne. De plus, les séquences MLST peuvent être échangées *via* des bases de données accessibles par Internet (<http://www.mlst.net/>), ce qui facilite le transfert de connaissance et permet le typage en ligne, à partir des séquences des locus MLST. Enfin, l'avantage de l'analyse par MLST par rapport à l'analyse par MLVA est qu'elle ne nécessite pas d'étape de migration sur gel d'agarose. Cette méthode a déjà montré tout son intérêt, notamment en Thaïlande, dans l'identification de réservoirs animaux et le typage d'un variant responsable d'une épidémie de leptospirose [64]. S'affranchir de la culture reste difficile pour ces méthodes de génotypage, mais Perez et

Goarant [540] ont décrit une technique MLST permettant le typage des souches directement à partir d'échantillons biologiques. Néanmoins, la principale limite de la méthode MLST est le manque de consensus concernant les locus à utiliser.

Les futures méthodes de typage doivent pouvoir shunter l'étape de mise en culture, et se faire directement sur les échantillons biologiques (sérum, reins, urines). C'est pourquoi, le Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Parasitologie et Hygiène du GHSR/CHR finalise actuellement la mise au point d'une méthode de génotypage des souches de *Leptospira* à partir d'échantillons biologiques par la méthode HRMA (*high resolution melting analysis*). Cette méthode permet de détecter des variations au sein d'une séquence d'ADN entre plusieurs échantillons, sans caractériser ces mutations sur le plan nucléotidique, mais en mettant en évidence des différences dans les températures de fusion (notées T_m) de ces séquences [684-687]. L'utilisation de la température de fusion pour la différenciation des espèces génomiques de leptospires a déjà été publiée [149, 153] et une méthode RAPD-HRM [688] a été appliquée au typage de *Leptospira*, mais uniquement sur des souches de référence en culture. La méthode de typage par HRM élaborée par le Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Parasitologie et Hygiène sera applicable sur des échantillons biologiques, et est donc novatrice ; de plus, cette méthode est rapide et reproductible. Elle présente deux applications majeures :

- D'abord elle permettra, grâce à la comparaison avec des ADN de référence de *Leptospira* d'identifier les souches circulant chez l'Homme, mais aussi chez les animaux ;
- Dans un second temps, par analyse simultanée des souches humaines et animales, l'identification de clusters incluant des souches d'origine humaine et d'autres d'origine animale permettra de mieux comprendre les voies de transmission de la leptospirose et de mettre en place des mesures de prévention adaptées.

L'épidémiologie moléculaire semble aujourd'hui une approche de choix pour la détermination des voies de transmission de *Leptospira*. La détermination des profils génétiques des souches isolées chez l'Homme et de celles isolées chez les animaux, voire même dans l'environnement, et la mise en évidence de clusters permettra une meilleure compréhension des cycles à l'échelle locale [674].

□ Notre étude a mis en évidence la possibilité d'une relation entre diversité des haplotypes de *R. rattus* et diversité des souches circulant de *Leptospira*. Il apparaît aujourd'hui comme essentiel de ne pas limiter l'étude de *Leptospira* à la bactérie elle-même, mais de prendre en compte son écologie globale et en particulier l'écosystème dans lequel elle évolue majoritairement, c'est-à-dire l'hôte. Savoir si la diversité génétique d'un hôte réservoir hyper-tolérant à l'infection par *Leptospira* comme *R. rattus* influence l'apparition et le maintien d'une diversité génétique chez la bactérie permettrait de mieux appréhender l'écologie bactérienne non seulement à l'échelle locale comme à Mayotte, mais aussi à l'échelle mondiale en permettant de mieux comprendre la répartition des différents sérovars. Cette approche nécessiterait le typage génétique des hôtes (notamment rongeurs) [426, 689] parallèlement à celui des souches qu'ils hébergent. A Madagascar par exemple, continent où 29 haplotypes de *R. rattus* différents sont décrits [426], cette hypothèse impliquerait la circulation d'une grande diversité de *Leptospira*.

□ Sur le long terme, la recherche sur *Leptospira* et les leptospiroses dans l'Océan Indien doit s'inscrire dans un programme élargi visant à obtenir une meilleure connaissance de la diversité de ce genre bactérien sur les îles de la zone (Maurice, Rodrigues, Seychelles, Comores, Mayotte, La Réunion, Madagascar). La recherche sur *Leptospira* dans l'Océan Indien doit inclure un volet "veille" visant à surveiller l'introduction et/ou l'émergence de nouveaux sérovars sur les îles. A Mayotte notamment, l'introduction du sérogroupe Icterohaemorrhagiae est un risque majeur. La connaissance des souches circulant sur chaque île et des échanges potentiels d'animaux entre ces îles, mais aussi entre ces îles et les autres régions du monde (incluant les transports involontaires de rongeurs dans les bateaux) permettra de mieux appréhender les particularités épidémiologiques à l'échelle de chaque île et le risque d'émergence à l'échelle de la zone ouest Océan Indien.

GLOSSAIRE

Les définitions sont proposées ici au sens utilisé dans le manuscrit. A l'exception des sigles d'organismes, ces définitions proviennent de l'encyclopédie et du dictionnaire Larousse en ligne (<http://www.larousse.fr/encyclopedie> ; <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>), du site "Internet PubChem Compound" (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), du site Internet de J.P. Euzéby "Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse" (<http://www.bacteriologie.net>), du site Internet français de la CITES (<http://www.cites.org/fra/disc/what.php>), du site Internet "StatSoft Electronic Statistics Textbook" (<http://www.statsoft.com>), de "Immunologie -Aide Mémoire Illustré" de D. Male [690] et de l'article de van Belkum *et al.* [691].

- 8-Azaguanine :** Analogue de la purine montrant une activité antinéoplasique (5-amino-2,3-dihydrotriazolo[4,5-d]pyrimidin-7-one).
- Anticorps :** Protéine du sérum sanguin sécrétée par les lymphocytes B (globules blancs intervenant dans l'immunité) en réaction à l'introduction d'une substance étrangère (antigène) dans l'organisme (synonyme : immunoglobuline ou Ig).
- Antigène :** Substance (généralement étrangère à l'organisme), susceptible de déclencher une réaction immunitaire en provoquant la formation d'anticorps.
- Anurie :** Arrêt de la production d'urine par les reins.
- Biodiversité** « La diversité biologique, ou biodiversité, est la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Cela inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs. » (XVIII^e Assemblée générale de l'Union mondiale pour la Nature [UICN], Costa Rica, 1988). Ainsi ce concept prend-il en compte le nombre des espèces vivantes, leurs caractéristiques, et notamment leur matériel génétique (génome), ainsi que les écosystèmes dans lesquels elles s'intègrent.
- Céphalée :** Toute douleur de la tête, quelle que soit sa cause.
- ChikAni :** "Distribution et évolution du virus du chikungunya chez les vertébrés des îles de l'Océan Indien". Projet de recherche financé en 2006 par l'INRA puis de 2007 à 2010 par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dont l'objectif était d'étudier la présence du virus du chikungunya chez les vertébrés de la Réunion et de Mayotte. Pour ce faire, deux campagnes de capture et de prélèvement de vertébrés sauvages et domestiques de La Réunion et de Mayotte ont été réalisées en 2006 (en période d'épidémie humaine) et en 2007 (en-dehors de la période épidémique). Le projet était porté par l'INRA avec la collaboration de l'AFSSA (ANSES) de Nancy. De nombreux partenaires ont participé de façon active au projet, notamment le CIRAD de La Réunion, l'IRD, l'INSERM, le GHSR, l'UMR Virologie de Maisons-Alfort, l'ONCFS, le GDS974, les vétérinaires praticiens, le Laboratoire Vétérinaire Départemental, la Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR), le parc zoologique du Chaudron.
- CITES :** La Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction, connue par son sigle CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) ou encore comme la Convention de Washington, est un accord international entre Etats. Elle a pour but de veiller à ce que le commerce international des spécimens d'animaux et de plantes sauvages ne menace pas la survie des espèces auxquelles ils appartiennent.
- Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) :** Syndrome hémorragique caractérisé par la disparition du fibrinogène du sang circulant. L'apparition soudaine de facteurs d'activation de la thrombine provoque la formation de dépôts de fibrine et l'oblitération thrombotique des petits vaisseaux. Cette réaction consomme le fibrinogène, les facteurs V et VIII et les plaquettes. Le

sang devient donc incoagulable et des hémorragies surviennent. Survient ensuite une phase réactionnelle avec héparinémie endogène et fibrinolyse.

Coloration de Gram :	La coloration de Gram, mise au point en 1884, s'effectue en trois temps. Dans un premier temps, les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol (mordantage). Dans un deuxième temps, qualifié de temps de différenciation, les bactéries sont soumises à l'action de l'alcool ou d'un mélange alcool + acétone. Les bactéries se répartissent en deux catégories : celles qui conservent la coloration violette et qui sont qualifiées de bactéries à Gram positif et celles qui sont décolorées et qui sont qualifiées de bactéries à Gram négatif. Dans un troisième temps, afin de mieux visualiser les bactéries décolorées (bactéries à Gram négatif), on procède à un traitement par la fuchsine ou par la safranine. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rouge ou en orange. Lorsque des bactéries à Gram positif sont colorées par la méthode de Gram puis soumises au lysozyme, les protoplastes obtenus sont colorés en violet. Le siège de la coloration se situe donc au niveau du cytoplasme. Les protoplastes traités par l'alcool ou par un mélange alcool-acétone se décolorent instantanément. Le principe de cette coloration peut s'expliquer de la manière suivante : Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et, après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi autorise le passage de l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.
Ecosystème :	Système formé par un environnement (biotope) et par l'ensemble des espèces (biocénose) qui y vivent, s'y nourrissent et s'y reproduisent.
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) :	Technique sérologique utilisée pour détecter des anticorps ou des antigènes. L'antigène est adsorbé sur une phase solide et l'anticorps à doser est ajouté puis révélé par une protéine couplée à une enzyme (péroxydase ou phosphatase le plus souvent). Dans l'étape finale, on ajoute un substrat chromogène qui est dégradé par l'enzyme en un produit coloré. La densité optique est mesurée après un temps déterminé, elle est proportionnelle à la quantité de substrat chromogène dégradé, elle même proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés.
Endémique :	Se dit des espèces vivantes propres à un territoire bien délimité. Se dit d'une maladie infectieuse présente de façon continue au sein d'une population ou d'une région.
Epidémie :	Développement et propagation rapide d'une maladie contagieuse, le plus souvent d'origine infectieuse, dans une population. Le mot épidémie (du grec epi, sur, et dêmos, peuple, littéralement « qui circule dans le peuple ») qualifie soit l'apparition d'un grand nombre de cas d'une nouvelle maladie, soit l'accroissement considérable du nombre de cas d'une maladie déjà existante, dans une région donnée, au sein d'une communauté ou d'une collectivité.
Epidémiologie :	Étude des maladies épidémiques, de leur mode de contagion et des moyens de les combattre.
Epidémiologie bactérienne :	Etude de la dissémination des bactéries pathogènes, incluant leur schéma de transmission, les facteurs de risque et le contrôle de l'infection dans les populations (humaines ou animales),
Epistaxis :	Saignement de nez (synonyme : rhinorrhagie).
Espèces (<i>species</i>) :	Taxon de base bactérien, nom du groupe en-dessous du genre, dont les membres montrent un fort degré de similarité globale, comparée avec les autres souches plus distantes. Il n'y a actuellement pas de définition d'espèces universellement acceptée en bactériologie.
Génisse :	Femelle de l'espèce bovine qui n'a pas encore mis bas.
Genomospecies (Espèce génomique) :	Selon l'International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB), une espèce est définie génétiquement (genomospecies) comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN-ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridation supérieures ou égales à 70 p. cent et par une valeur $\Delta T_{m(e)}$ inférieure ou égale à 5 C.

Génotype :	Profil génétique d'un organisme étudié par une méthode de biologie moléculaire.
Guano :	Nom donné aux excréments des oiseaux marins et des chauves-souris. Le guano est constitué d'ammoniac ainsi que d'acides uréiques, de phosphore, d'acides oxaliques et carboniques, et de certains sels et impuretés.
Hématémèse :	Vomissement de sang d'origine digestive.
Hématurie :	Présence de sang dans l'urine.
Hépatomégalie :	Augmentation anormale du volume du foie.
Hétéroduplex :	Acide nucléique bicaténaire dans lequel les deux brins ne possèdent pas uniquement des séquences rigoureusement complémentaires.
Homoduplex :	Acide nucléique bicaténaire dont toutes les bases sont appariées.
Immunoglobulines de type G (IgG) :	Sous-classe d'anticorps. C'est l'immunoglobuline sérique majeure, elle constitue le principal anticorps au cours de la réponse secondaire (mémoire) à la plupart des antigènes.
Immunoglobulines de type M (IgM) :	Sous-classe d'anticorps. C'est la première classe d'immunoglobulines qui est produite au cours du développement de la réponse immunitaire.
Incidence :	Nombre de nouveaux cas d'une maladie constatés pendant une période déterminée et dans une population donnée (Organisation Mondiale de la Santé). L'incidence est un rapport qui s'exprime en nombre de cas pour 100 000 habitants.
Isohyète :	Se dit d'une courbe joignant les points recevant la même quantité de précipitations.
Isolat :	Une population de cellules bactériennes en culture pure, dérivant d'une unique colonie. En microbiologie clinique, les isolats sont généralement issus de cultures primaires obtenues à partir d'un patient.
Kaliémie :	Taux de potassium dans le plasma sanguin.
Lipoprotéine :	Substance formée par l'association de protéines (appelées apolipoprotéines) et de lipides (cholestérol, triglycérides).
Lymphadénopathie :	Atteinte des nœuds lymphatiques qui augmentent de volume, peuvent devenir douloureux, inflammés (lymphadénite).
Maladie de Lyme :	Maladie infectieuse articulaire, neurologique et cardiaque, dont l'agent est une bactérie de la famille des spirochètes, <i>Borrelia burgdorferi</i> (synonyme : borréliose de Lyme).
Maladie émergente :	L'Office International des Epizooties (OIE) définit (en 2006) les maladies émergentes comme des <i>infections nouvelles, causées par l'évolution ou la modification d'un agent pathogène ou d'un parasite existant</i> . Le caractère « nouveau » de la maladie se traduit par exemple par un changement d'hôtes, de vecteur, de pathogénicité ou de souche.
Méléna :	Émission par l'anus de sang digéré (de couleur noire) par le tube digestif. Un méléna traduit une hémorragie digestive haute, c'est-à-dire provenant de l'œsophage, de l'estomac ou du duodénum.
Méningite aseptique :	Inflammation méningée avec des cultures bactériennes de routine négatives.
Microscope à fond noir :	Le microscope à fond noir qui utilise le principe de la « microscopie en champ sombre » permet d'améliorer le contraste d'échantillons transparents mais non teintés. Dans la microscopie à fond noir, l'image est créée par la diffraction de la lumière. La lumière diffractée par la préparation permet la formation de l'image. Sans préparation, la lumière n'arrive pas à l'objectif d'où le fond noir. La préparation donne donc une image sur fond noir.
Multi Locus Sequence Typing (MLST) :	Technique de génotypage consistant à rechercher les variations dans les séquences alléliques de plusieurs gènes de ménage (généralement 5 à 10).

Myalgie :	Douleur musculaire.
Oligurie :	Diminution du volume des urines (chez l'Homme, moins de 500 ml / 24h).
Pathogène :	Qualifie ce qui provoque une maladie, en particulier un germe capable de déterminer une infection. Une bactérie est pathogène du fait de sa virulence (pouvoir de multiplication), de sa production de toxines ou d'enzymes, ou de leur association.
Pathogénicité :	Capacité biologique à provoquer une maladie.
Pétéchie :	Petite lésion rouge vif ou bleutée de la peau ou des muqueuses. Les pétéchies, dues au passage de globules rouges hors des vaisseaux sanguins, mesurent de 1 à 3 mm.
Plasmide :	Molécule d'ADN extrachromosomique capable de se répliquer indépendamment et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte (certains plasmides sont utilisés comme vecteurs de clonage).
Population :	Groupe d'organismes de la même espèce habitant dans un environnement donné.
Prévalence :	Rapport du nombre de cas d'un trouble morbide à l'effectif total d'une population, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, à un moment ou pendant une période donnés.
Processus auto-immun :	Processus pathologique au cours duquel le malade est victime de ses propres défenses immunitaires.
Pseudogène :	Gène dont la séquence est voisine des gènes de structure fonctionnels, mais qui ne s'exprime pas.
Récepteur TLR (Toll-Like Receptor) :	Protéines transmembranaires, présentes à la surface de certains types cellulaires chez l'Homme et les mammifères et qui sont homologues au produit du gène de drosophile Toll. Ces récepteurs très conservés par l'évolution jouent un rôle important dans l'immunité innée et notamment dans les défenses contre les microorganismes. Ils peuvent reconnaître des motifs moléculaires uniquement présents chez ces microorganismes pathogènes dénommés PAMP pour "pathogen-associated microbial pattern". Parmi ces PAMPs on trouve : - des composants des parois bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycanes ou la flagelline composant du flagelle de certaines bactéries, - de l'ADN bactérien, - de l'ARN viral double brin. TLR2 reconnaît une variété de PAMPs incluant les lipoprotéines bactériennes, les peptidoglycanes et les acides lipotéichoïques. TLR4, sa localisation est controversée. Il est activé par les LPS bactériens
Rhabdomyolyse :	Destruction du tissu des muscles striés, entraînant la libération dans le sang d'un pigment musculaire toxique, la myoglobine. Une rhabdomyolyse se traduit par des douleurs des muscles atteints et une coloration foncée des urines. Au niveau sanguin, on note une augmentation de la créatine phosphokinase.
Saignement subarachnoïde :	Un saignement subarachnoïde consiste en un saignement de la surface du cerveau, dans la région située entre le cerveau et la boîte crânienne.
Saprophyte :	Bactérie ou champignon microscopique vivant dans la nature aux dépens de matières organiques qu'ils contribuent à dégrader (dans le cas particulier de <i>Leptospira</i> , "saprophyte" est opposé à "pathogène").
Sensibilité :	La sensibilité d'un test ou d'un examen diagnostique est sa capacité de donner un résultat positif lorsque la maladie (ou la condition) est présente.
Sérogroupe :	Ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes (bactéries, virus, champignons), permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce.
Séroprévalence :	Nombre de personnes dans une population donnée qui répond positivement à des tests sériques spécifiques. Elle est souvent présentée sous forme de pourcentage.
Sérovar :	Désigne une propriété antigénique permettant d'identifier une cellule (bactéries, globule rouge, etc.) ou un virus par des méthodes sérologiques. La technique est souvent appelée le sérogroupage. Le taxon de base pour les leptospires est le sérovar et les sérovares apparentés sont rassemblés dans des sérogroupe.

Souche (strain) :	Descendants d'un isolement unique en culture pure, généralement dérivé d'une colonie unique initiale. Une souche peut être considérée comme un isolat ou un groupe d'isolats qui peuvent être distingués des autres isolats des mêmes genres et espèces, par des caractères phénotypiques et génétiques. Les cultures d'un microorganisme particulier, isolées au même moment à partir de plusieurs endroits chez un même patients, et non différenciés par typage, sont aussi considérées comme une souche unique.
Souche type (type strain) :	Une souche qui est maintenue en culture pure, et qui définit une espèce, elle en est le représentant (il n'y a qu'une souche type par espèce). Une souche type est identifiée par la lettre T à la suite de son numéro d'enregistrement. La souche type est souvent un des premiers spécimens décrit pour l'espèce.
Spécificité :	Capacité d'un test ou d'un examen de donner un résultat négatif lorsque la maladie n'est pas présente.
Splénomégalie :	Augmentation pathologique du volume de la rate.
SYBR Green :	Composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). Il est le principal marqueur séquence aspécifique utilisé en PCR en temps réel.
Syndrome de Guillain-Barré :	Polyradiculonévrite inflammatoire avec présence d'albumine dans le liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Ce syndrome se manifeste par une inflammation aigüe et démyélinisation (destruction de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses) des nerfs périphériques, responsables de paralysies.
Syphilis :	Maladie infectieuse sexuellement transmissible due à une bactérie, <i>Treponema pallidum</i> (tréponème pâle).
Tableau de contingence :	Tableau statistique mettant en évidence, parmi un groupe d'individus, un échantillon ou une population, une distribution d'un certain caractère A pour chaque catégorie ou tranche d'un autre caractère B, et réciproquement (la distribution de A et celle de B figurent dans les deux marges du tableau).
Taurillon :	Jeune mâle de l'espèce bovine élevé et nourri intensivement pour la production de viande.
Taxonomie :	Etude théorique de la classification des organismes, qui implique les activités reliées d'allocation de taxa aux organismes, leur nomenclature et identification.
Thrombocytopénie (ou thrombopénie) :	Abaissement du nombre des plaquettes (chez l'Homme, on parle de thrombocytopénie au-dessous de 150 000 par millimètre cube de sang).
Titre d'anticorps :	Concentration minimum en anticorps nécessaire à la réaction d'agglutination.
Transposase :	Enzyme se liant à un transposon (séquence d'ADN pouvant changer de position) et catalysant la migration de ce transposon dans une autre région du génome.
Typage (typing) :	Analyse phénotypique et/ou génétique des isolats bactériens, en-dessous du niveau de l'espèce ou de la sous-espèce, et effectué en vue d'obtenir des données génétiques spécifiques d'une souche/d'un clone, qui pourra être utilisé pour l'étude des schémas de transmission des infections, trouver les réservoirs et les sources des infections humaines.
Variable Number Tandem Repeat (VNTR) :	Courte séquence nucléotidique de 14 à 100 nucléotides de longueur, organisée en clusters de répétitions en tandem, généralement répétées 4 à 40 fois par occurrence. Ces clusters de répétition sont dispersés sur un grand nombre de chromosomes.
Virulence :	Capacité d'un agent infectieux qui détermine l'importance à laquelle se manifeste la maladie dans une population.
Zoonose :	Pour l'Organisation Mondiale de la Santé, une zoonose est une infection ou infestation naturellement transmissible de l'animal à l'Homme et <i>vice versa</i> .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITEES

1. **Noguchi H.** Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae (Inada and Ido). *The Journal of Experimental Medicine* 1918; **27**: 575-592.
2. **Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)** (<http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/>). Accessed 2 September, 2011.
3. **World Health Organization.** Report of the first meeting of the Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group (LERG). Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
4. **Pappas G, Papadimitriou R, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N.** The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases* 2008; **12**: 351-357.
5. **Ullmann LS, Langoni H.** Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2011; **17**: 119-129.
6. **Rhyan JC, Spraker TR.** Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology* 2010; **47**: 34-39.
7. **Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH.** Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 1-7.
8. **Chomel BB, Belotto A, Meslin F-X.** Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13**: 6-11.
9. **Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P.** *Leptospira and leptospirosis*. Second ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999: 296 pp.
10. **Weil A.** Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus and Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin* 1886; **39**: 209-232.
11. **Landouzy LTJ.** Typhus hépatique. *Gazette des hôpitaux civils et militaires* 1883; **56**: 913-914.
12. **Kobayashi Y.** Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2001; **7**: 10-15.
13. **Levett PN.** Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14**: 296-326.
14. **Marr JS, Cathey JT.** New hypothesis for cause of an epidemic among Native Americans, New England, 1616–1619. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 281-286.
15. **Stimson AM.** Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports* 1907; **22**: 541.
16. **Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H.** The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *Journal of Experimental Medicine* 1916; **23**: 377-402.
17. **Uhlenhuth P, Fromme W.** Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). *Medizinische Klinik* 1915: 1202-1203.
18. **Hübener EA, Reiter H.** Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1915; **41**: 1275-1277.
19. **Dawson B, Hume WE, Bedson SP.** Infective jaundice. *British Medical Journal* 1917; **2**: 345-354.
20. **Stokes A, Ryle JA.** A note on Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica) as it has occurred in the army in Flanders. *British Medical Journal* 1916; **23**: 413-417.
21. **Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H.** The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *Journal of Experimental Medicine* 1917; **26**: 341-353.
22. **International Leptospirosis Society (ILS)** (<http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html#TofR>). Accessed 12 September 2010.
23. **Harwood CS, Canale-Parola E.** Ecology of spirochetes. *Annual Review of Microbiology* 1984; **38**: 161-192.
24. **Baranton G, Old IG.** The Spirochaetes: a different way of life. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 1995; **93**: 63-95.
25. **Trott DJ, Jensen NS, Saint Girons I, Oxberry SL, Stanton TB, Lindquist D, Hampson DJ.** Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; **35**: 482-485.
26. **Li C, Motaleb A, Sal M, Goldstein S, F., Charon N, W.** Spirochete periplasmic flagella and motility. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2000; **2**: 345-354.
27. **Johnson RC, Rogers P.** Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology* 1964; **88**: 1618-1623.
28. **Picardeau M, Brenot A, Saint-Girons I.** First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. inactivation of *L. biflexa flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology* 2001; **40**: 189-199.

29. Liao S, Sun A, Ojcius D, Wu S, Zhao J, Yan J. Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiology* 2009; **9**: 253.
30. Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes. *Annual Review of Genetics* 2002; **36**: 47-73.
31. Goldstein SF, Buttle KF, Charon NW. Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *Journal of Bacteriology* 1996; **178**: 6539-6545.
32. Haake DA, Matsunaga J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Molecular Microbiology* 2010; **77**: 805-814.
33. Murray GL, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Molecular Microbiology* 2010; **78**: 701-709.
34. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 2002; **71**: 635-700.
35. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology* 2001; **2**: 346-352.
36. Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Saint-Girons I, Werts C, Raetz CRH. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: 25420-25429.
37. Nahori MA, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CRH, Saint-Girons I, Werts C. Differential TLR recognition of leptospiral Lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *Journal of Immunology* 2005; **175**: 6022-6031.
38. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008; **3**: e1607.
39. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene* 2000; **254**: 19-28.
40. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology* 2011; **153**: 73-81.
41. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of Bacteriology* 1993; **175**: 4225-4234.
42. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity* 2000; **68**: 2276-2285.
43. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *Journal of Bacteriology* 2004; **186**: 2818-2828.
44. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira WJ, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko A. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology* 2003; **49**: 929-945.
45. Ristow P, Bourhy P, McBride FvWdC, Figueira CP, Huerre M, Ave P, Girons IS, Ko AI, Picardeau M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathogens* 2007; **3**: e97.
46. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and Immunity* 1996; **64**: 2322-2330.
47. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AGP, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39**: 3303-3310.
48. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Reis MG, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infection and Immunity* 2001; **69**: 4958-4968.
49. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, Sehgal SC. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2008; **102**: 699-708.

- 50. Ko AI, Goarant C, Picardeau M.** *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2009; **7**: 736-747.
- 51. Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM.** Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; **4**: e612.
- 52. Organisation Mondiale de la Santé.** Diagnostic de la leptospirose et typage des leptospires. Genève: Organisation Mondiale de la Santé; 1956.
- 53. Adler B, de la Peña Moctezuma A.** *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2010; **140**: 287-296.
- 54. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG.** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; **37**: 463-464.
- 55. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant SR.** Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1999; **49**: 839-858.
- 56. Cerqueira GM, Picardeau M.** A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution* 2009; **9**: 760-768.
- 57. Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML, Dohnt MF, Galloway RL, Steigerwalt AG, Bahaman AR, Craig S, Harrower BJ, Smythe LD.** *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **59**: 705-708.
- 58. Feresu SB, Steigerwalt AG, Brenner DJ.** DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; **49**: 1111-1117.
- 59. Salaiün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M.** Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; **44**: 3954-3962.
- 60. Slack A, Dohnt M, Symonds M, Smythe L.** Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from far North Queensland, Australia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005; **4**: 10.
- 61. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M.** Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43**: 539-545.
- 62. Ahmed N, Devi SM, de los A Valverde M, Vijayachari P, Machang'u R, Ellis W, Hartskeerl R.** Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2006; **5**: 28.
- 63. Leon A, Pronost S, Fortier G, Andre-Fontaine G, Leclercq R.** Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; **48**: 581-585.
- 64. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NPJ, Peacock SJ.** A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2007; **1**: e56.
- 65. van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, Buiting A, Bonten M, Willems R.** The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity. *PLoS ONE* 2010; **5**: e13482.
- 66. Gorgé O, Lopez S, Hilaire V, Lisanti O, Ramiisse V, Vergnaud G.** Selection and validation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis panel for typing *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **46**: 1026-1036.
- 67. Ren S-X, Fu G, Jiang X-G, Zeng R, Miao Y-G, Xu H, Zhang Y-X, Xiong H, Lu G, Lu L-F, Jiang H-Q, Jia J, Tu Y-F, Jiang J-X, Gu W-Y, Zhang Y-Q, Cai Z, Sheng H-H, Yin H-F, Zhang Y, Zhu G-F, Wan M, Huang H-L, Qian Z, Wang S-Y, Ma W, Yao Z-J, Shen Y, Qiang B-Q, Xia Q-C, Guo X-K, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen Y-M, Shi M-H, Chen Z, Xu J-G, Zhao G-P.** Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003; **422**: 888-893.
- 68. Nascimento ALTO, Verjovski-Almeida S, van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LEA, Digiampietri LA, Hartskeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EAL.** Genome features of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; **37**: 459-478.
- 69. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B.** Genome reduction in *Leptospira*

borgpetersenii reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; **103**: 14560-14565.

70. Bourhy P, Frangeul L, Couvé E, Glaser P, Saint-Girons I, Picardeau M. Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *Journal of Bacteriology* 2005; **187**: 3931-3940.

71. Saint Girons I, Margarita D, Amouriaux P, Baranton G. First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. *Research in Microbiology* 1990; **141**: 1131-1138.

72. Xue F, Yan J, Picardeau M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira spp.*: lessons learned from the genomes. *Microbes and Infection* 2009; **11**: 328-333.

73. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 2003; **3**: 757-771.

74. Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; **4**: e724.

75. Moutou F. Enquête sur la faune murine dans le département de la Réunion: Rapport DDASS; 1980.

76. Debarbat F, Mollaret, H.H., Mailloux, M. Leptospiroses in the island of Reunion. II. Animal leptospiroses [in French]. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 736-743.

77. Gares H. Study of infertility risk factors in Reunion island dairy herds [in French] [thesis]. Toulouse: Université Paul Sabatier; 2003. 103 pp.

78. Sigaud M, Caceres S, Picard M, Desvars A, Michault A. Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*): natural maintenance host of leptospires? [in French]. *Bulletin de la Société de Pathologies Exotiques* 2009; **102**: 19-20.

79. Charton A. Contribution à l'étude épidémiologique des leptospiroses. Le cas de l'île de Mayotte [thesis]. Lyon: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon; 1992. 101 pp.

80. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, Cespedes MJ, Matthias MA, Swancutt MA, Loopez Linan RL, Gotuzzo E, Guerra H, Gilman RH, Vinetz JM, Consortium ObotPUSL. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clinical Infectious Diseases* 2005; **40**: 343-351.

81. Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes MML, Linhares AAC, Vasconcelos PF, Ko AI. Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira sp* in children of Salvador, Bahia [in Portuguese]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; **35**: 159-165.

82. Bal AM, Bharadwaj RS, Gita N, Joshi SA, Thakare JP. Guillain-Barre syndrome in a pediatric patient following infection due to *Leptospira*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2003; **56**: 29-31.

83. Panicker JN, Mammachan R, Jayakumar RV. Primary neuroleptospirosis. *Postgraduate Medical Journal* 2001; **77**: 589-590.

84. Sanjeev J, Mohd Khateebullah A. Leptospirosis presenting as acute meningoencephalitis. *Journal of Infection in Developing Countries* 2010; **4**: 179-182.

85. Marchiori E, Lourenço S, Setubal S, Zanetti G, Davaus Gasparetto T, Hochegger B. Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: a state-of-the-art review. *Lung* 2011; **189**: 1-9.

86. Turner LH. Leptospirosis. *British Medical Journal* 1969; **1**: 231-235.

87. Levett PN, Haake DA. *Leptospira species (Leptospirosis)*. In: Gerald L, Mandell, J.E.B., Raphael, D., ed. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009.

88. Renault P, Boidin E, D'Ortenzio E, Balleydier E, Daniel B, Filleul L. Epidemiological surveillance of leptospirosis on Reunion Island in 2004-2008: possible impact of chikungunya infection on the case fatality rate of leptospirosis [in French]. *Bulletin de Veille Sanitaire* 2010; **104**: 148-152.

89. Silva Júnior GB, Abreu KL, Mota RMB, A.G., Araújo SM, Rocha HA, Libório AB, Daher EF. RIFLE and Acute Kidney Injury Network classifications predict mortality in leptospirosis-associated acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* 2011; **16**: 269-276.

90. Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WDJ, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999; **354**: 820-825.

91. Sarkar U, Nascimento S, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalafanos I, Grunstein I, Flannery B, Dias J, Riley LW, Reis MG, Ko AI. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; **66**: 605-610.

92. Abdulkader RCRM, Silva MV. The kidney in leptospirosis. *Pediatric Nephrology* 2008; **23**: 2111-2120.

93. Trevejo RT, Rigau-Pérez 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. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhagiae - Nicaragua, 1995. *Journal of Infectious Diseases* 1998; **178**: 1457-1463.

94. Park SK, Lee SH, Rhee YK, Kang SK, Kim KJ, Kim MC, Kim KW, Chang WH. Leptospirosis in Chonbuk Province of Korea in 1987: a study of 93 patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; **41**: 345-351.
95. Daher EF, Lima RSA, Silva Junior GB, Silva EC, Karbage NNN, Kataoka RS, Carvalho Junior PC, Magalhaes MM, Mota RMS, Liborio AB. Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 201 patients in a metropolitan city of Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2010; **14**: 3-10.
96. Zavala-Velazquez J, Cardenas-Marrufo M, Vado-Sois I, Cetina-Camara M, Cano-Tur J, Laviada-Molina H. Hemorrhagic pulmonary leptospirosis: three cases from the Yucatan peninsula, Mexico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; **41**: 404-408.
97. Ahmad S, Sarwari AR. Leptospirosis induced pulmonary alveolar hemorrhage. *West Virginia Medical Journal* 2010; **106**: 20-22.
98. Im JG, Yeon KM, Han MC, Kim CW, Webb WR, Lee JS, Han YC, Chang WH, Chi JG. Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. *American Journal of Roentgenology* 1989; **152**: 955-959.
99. Paganin F, Bourdin A, Borgherini G, Dalban C, Poubeau P, Tixier F, Gouix A, Noel J-B, Cotte L, Arvin-Berod C. Manifestations pulmonaires de la leptospirose. *Revue des Maladies Respiratoires* 2009; **26**: 971-979.
100. Nally JE, Chantranuwat C, Wu X-Y, Fishbein MC, Pereira MM, da Silva JJP, Blanco DR, Lovett MA. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *American Journal of Pathology* 2004; **164**: 1115-1127.
101. Medeiros FdR, Spichler A, Athanazio DA. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica* 2010; **115**: 155-162.
102. Croda J, Neto AN, Brasil RA, Pagliari C, Nicodemo AC, Duarte MI. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; **16**: 593-599.
103. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CRR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2007; **11**: 142-148.
104. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho LAF, Aires T, S.F., Villasboas-Bisneto JC, Queirroz A, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2008; **14**: 505-508.
105. Herrmann-Storck C, Saint Louis M, Foucand T, Lamaury I, Deloumeaux J, Baranton G, Simonetti M, Sertour N, Nicolas M, Salin J, Cornet M. Severe leptospirosis in hospitalized patients, Guadeloupe. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 331-334.
106. Paganin F, Bourdin A, Dalban C, Courtin JP, Poubeau P, Borgherini G, Michault A, Sally JC, Tixier F, Genin R, Arvin-Berod C. Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases. *Intensive Care Medicine* 2007; **33**: 1959-1966.
107. Marotto PC, Ko AI, Murta-Nascimento C, Seguro AC, Prado RR, Barbosa MC, Cleto SA, Eluf-Neto J. Early identification of leptospirosis-associated pulmonary hemorrhage syndrome by use of a validated prediction model. *Journal of Infection* 2010; **60**: 218-223.
108. Marotto Paulo CF, Nascimento Cristiane MR, Eluf-Neto J, Marotto Marcia S, Andrade L, Sztajn bok J, Seguro Antonio C. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases* 1999; **29**: 1561-1563.
109. Rathinam S. Ocular manifestations of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine* 2005; **51**: 189-194.
110. Curling A. Equine recurrent uveitis: classification, etiology, and pathogenesis. *Compendium of Continuing Education for Veterinarians* 2011; **33**: E1-4.
111. Verma A, Kumar P, Babb K, Timoney JF, Stevenson B. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; **4**: e778.
112. Wagenaar JFP, Goris MGA, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu ATA, de Kruif MD, ten Cate H, Hartskeerl R, Brandjes DPM, van Gorp ECM. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Tropical Medicine and International Health* 2007; **12**: 111-122.
113. Edwards CN, Nicholson GD, Hassel TA, Everard CO, Callender J. Thrombocytopenia in leptospirosis: the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; **35**: 352-354.
114. Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1990; **32**: 252-259.
115. Yang H-L, Jiang X-C, Zhang X-Y, Li W-J, Hu B-Y, Zhao G-P, Guo X-K. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infectious Diseases* 2006; **6**: 19.

116. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpaboon R, Opartkiattikul N, White Nicholas J, Peacock Sharon J, Day Nicholas P. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 2008; **46**: 254-260.
117. Wagenaar JFP, Goris MGA, Partiningrum DL, Isbandrio B, Hartskeerl RA, Brandjes DPM, Meijers JCM, Gaseem MH, Van Gorp ECM. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Tropical Medicine and International Health* 2010; **15**: 152-159.
118. Law-Koune JD, Picard P, Van Der Linden T, Michault A, Corbin JC, Duval G. Thrombocytopenia in leptospirosis. Role of anti-platelet antibodies [in French]. *Presse Medicale* 1988; **17**: 1315-1316.
119. McClure EM, Goldenberg R, L. Infection and stillbirth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2009; **14**: 182-189.
120. McGovern LM, Boyce TG, Fischer PR. Congenital infections associated with international travel during pregnancy. *Journal of Travel Medicine* 2007; **14**: 117-128.
121. Tramoni G, Clément HJ, Lopez F, Viale JP. An unusual case of post partum haemorrhage: leptospirosis infection [in French]. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 2003; **22**: 363-365.
122. Goldenberg R, L., McClure EM, Saleem S, Reddy UM. Infection-related stillbirths. *Lancet* 2010; **375**: 1482-1490.
123. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C. Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana [in French]. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction* 1995; **24**: 418-421.
124. Baytur YB, Cabuk M, Koyuncu FM, Lacin S, Ceylan C, Kandiloglu AR. Weil's syndrome in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2005; **119**: 132-133.
125. Shaked Y, Shpilberg O, Samra D, Samra Y. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious Diseases* 1993; **17**: 241-243.
126. Chedraui PA, San Miguel G. A case of leptospirosis and pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2003; **269**: 53-54.
127. Dassanayake D, Wimalaratna H, Agampodi S, Liyanapathirana V, Piyarathna T, Goonapienuwala B. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infectious Diseases* 2009; **9**: 48.
128. McBride AJA, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2005; **18**: 376-386.
129. Srinivas R, Agarwal R, Gupta D. Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C. *Malaria Journal* 2007; **6**: 42.
130. Spichler A, Moock M, Chapola EG, Vinetz J. Weil's disease: an unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005; **9**: 336-340.
131. Silva JJPd, Dalston MO, Carvalho JEMd, Setubal S, Oliveira JMCd, Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; **35**: 395-399.
132. Blendon DC, Goldberg HS. Silver impregnation stain for *Leptospira* and flagella. *Journal of Bacteriology* 1965; **89**: 899-900.
133. Sharma KK, Kalawat U. Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: one-year prospective study. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2008; **51**: 209-211.
134. Picardeau M, Cornet M, Morel V, Sertour N, Chaumet D, Brachet E, Bourhy P. Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2008; **37**: 329-331.
135. World Health Organization. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta: World health Organization, 2003: 122 pp.
136. Maciel EAP, de Carvalho ALF, Nascimento SF, de Matos RB, Gouveia EL, Reis MG, Ko AI. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008; **2**: e154.
137. Kazami A, Watanabe H, Hayashi T, Kobayashi K, Ogawa Y, Yamamoto K, Adachi Y. Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan. *Journal of Veterinary and Medical Science* 2002; **64**: 735-737.
138. Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 2009; **87**: 16-19.
139. Tucunduva de Faria M, Calderwood MS, Athanzio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG. Carriage of *Leptospira* interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 2008; **108**: 1-5.
140. Kuriakose M, Regi P, Joseph MR, Sugathan S, Sudha TN. Leptospirosis in a midland rural area of Kerala state. *Indian Journal of Medical Research* 2008; **128**: 307-312.

- 141. Gautam R, Guptill LF, Wu CC, Potter A, Moore GE.** Spatial and spatio-temporal clustering of overall and serovar-specific *Leptospira* microscopic agglutination test (MAT) seropositivity among dogs in the United States from 2000 through 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 2010; **96**: 122-131.
- 142. Aviat F, Rochereau-Roulet S, Branger C, Estavoyer JM, Chatrenet B, Orsonneau JL, Thorin C, Andre-Fontaine G.** Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2010; **33**: 375-387.
- 143. Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T.** Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **105**: 289-297.
- 144. Bomfim MRQ, Ko A, Koury MC.** Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 2005; **109**: 89-94.
- 145. Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpaiaboon R, Hoffmaster AR, Day NPJ, Peacock SJ.** Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS ONE* 2011; **6**: e16236.
- 146. Mérien F, Amouriaux P, Pérolat P, Baranton G, Saint-Girons I.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical sample. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; **30**: 2219-2224.
- 147. Zuerner RL, Alt DP, Bolin CA.** IS1533-based assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 3284-3289.
- 148. Branger C, Blanchard B, Fillonneau C, Suard I, Aviat F, Chevallier B, André-Fontaine G.** Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **243**: 437-445.
- 149. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW.** Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2005; **54**: 45-59.
- 150. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR.** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2009; **64**: 247-255.
- 151. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA.** Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE* 2009; **4**: e7093.
- 152. Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantitanawat S, Naigowit P.** Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; **57**: 117-122.
- 153. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Athaud A, Baranton G.** A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters* 2005; **249**: 139-147.
- 154. Mohan ARM, Cumberbatch A, Adesiyun AA, Chadee DD.** Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996-2007: A retrospective study. *Acta Tropica* 2009; **112**: 260-265.
- 155. Holt J, Davis S, Leirs H.** A model of leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Tropica* 2006; **99**: 218-225.
- 156. Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, Michault A.** Seasonality of human leptospirosis in Reunion island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. *PLoS ONE* 2011; **6**: e20377.
- 157. Coelho M, Massad E.** The impact of climate on leptospirosis in São Paulo, Brazil. *International Journal of Biometeorology* 2011; **56**: 233-241.
- 158. Herrmann-Storck C, Brioudes A, Quirin R, Deloumeaux J, Lamaury I, Nicolas M, Postic D, Perez JM.** Retrospective review of leptospirosis in Guadeloupe, French West Indies 1994-2001. *West Indian Medical Journal* 2005; **54**: 42-46.
- 159. Sundharagiati B, Boonpacknavig S, Harinasuta C, Pholpothi T.** Seasonal incidence of canine leptospirosis in Bangkok. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1966; **60**: 366-368.
- 160. Chou YL, Chen CS, Liu CC.** Leptospirosis in Taiwan, 2001-2006. *Emerging Infectious Diseases* 2008; **14**: 856-857.
- 161. Tassinari WS, Pellegrini DCP, Sá CBP, Reis RB, Ko AI, Carvalho MS.** Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health* 2008; **13**: 503-512.
- 162. Watson JT, Gayer M, Connolly MA.** Epidemics after natural disasters. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13**: 1-5.
- 163. Bharadwaj R, Bal AM, Joshi SA, Kagal A, Pol SS, Garad G, Arjunwadkar V, Katti R.** An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2002; **55**: 194-196.
- 164. Maskey M, Shastri JS, Saraswathi K, Surpam R, Vaidya N.** Leptospirosis in Mumbai: post-deluge outbreak 2005. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2006; **24**: 337-338.

- 165. Pappachan MJ, Sheela M, Aravindan KP.** Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2004; **58**: 1054-1055.
- 166. Kawaguchi L, Sengkeoprasedh B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, Watanabe H, Aoyama A.** Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2008; **78**: 957-961.
- 167. Victoriano ABF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong GL, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S, Adler B.** Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infectious Diseases* 2009; **9**: 147.
- 168. Ciceroni L, Stepan E, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, Lupidi R, Mansueto S, Manera A, Ioli A, Marcuccio L, Grillo R, Ciarrocchi S, Cinco M.** Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 79-86.
- 169. Barcellos C, Sabroza PC.** The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública* 2001; **17**: S59-S67.
- 170. Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, Spiegel RA, Weyant RS, Bragg SL.** Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; **61**: 399-404.
- 171. Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, Effler PV.** Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of a university campus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; **76**: 882-886.
- 172. Goarant C, Laumont-Barney S, Perez J, Vernel-Pauillac F, Chanteau S, Guigon A.** Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. *Tropical Medicine and International Health* 2009; **14**: 1-4.
- 173. Baranton G, Postic D.** Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *International Journal of Infectious Diseases* 2006; **10**: 162-170.
- 174. Kupek E, de Sousa Santos Faversoni MC, de Souza Philippi JM.** The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2000; **4**: 131-134.
- 175. Coudert C, Beau F, Berlioz-Arthaud A, Melix G, Devaud F, Boyeau E, Jaomeau C, Lablee P, Jarno P.** Human leptospirosis in French Polynesia. Epidemiological, clinical and bacteriological features. *Médecine Tropicale* 2007; **67**: 137-144.
- 176. Hermann Storck C, Postic D, Lamaury I, Perez JM.** Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago, French West Indies. *Epidemiology and Infection* 2008; **136**: 1407-1415.
- 177. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD.** Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Tropica* 2008; **107**: 255-258.
- 178. ProMED-mail post. Leptospirosis - Philippines** (<http://www.promedmail.org/>). Accessed 25th May, 2011.
- 179. Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN.** Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerging Infectious Diseases* 1997; **3**: 78-80.
- 180. Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA.** Interactions of *Leptospira* with environmental bacteria from surface water. *Current Microbiology* 2011; **62**: 1802-1806.
- 181. Dias JP, Teixeira MG, Nascimento Costa MC, Mendes CMC, Guimaraes P, Reis MG, Ko A, Barreto ML.** Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; **40**: 499-504.
- 182. Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D, Brouwer KC, Cunningham CB, Segura ER, Gilman RH, Gotuzzo E, Vinetz JM.** Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Medicine* 2006; **3**: e308.
- 183. Riley L, Ko A, Unger A, Reis M.** Slum health: Diseases of neglected populations. *BMC International Health and Human Right* 2007; **7**: 2.
- 184. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RDM, Santana FS, Mohr S, Melendez AXTO, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI.** Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008; **2**: e228.
- 185. Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Manickam P, Natarajaseenivasan K, Gupte MD, Sehgal SC.** Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. *Indian Journal of Medical Research* 2009; **130**: 67-73.
- 186. Leal-Castellanos CB, García-Suárez R, González-Figueroa E, Fuentes-Allen JL, Escobedo-de la Peñal J.** Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiology and Infection* 2003; **131**: 1149-1156.

- 187. Sharma S, Vijayachari P, Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Sehgal SC.** Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of Andaman islands, India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; **74**: 278-283.
- 188. Waitkins SA.** Leptospirosis as an occupational diseases. *British Journal of Industrial Medicine* 1986; **43**: 721-725.
- 189. Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM.** Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; **66**: 61-70.
- 190. Demers R, Y., Frank R, Demers P, Clay M.** Leptospiral exposure in Detroit rodent control workers. *American Journal of Public Health* 1985; **75**: 1090-1091.
- 191. Natarajaseenivasan K, Boopalan M, Selvanayagi K, Suresh SR, TRatnam S.** Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2002; **55**: 170-173.
- 192. Zamora J, Riedemann S, Montecinos MI, Cabezas X.** Serological survey of human leptospirosis in a high risk population in Chile. *Revista Medica de Chile* 1990; **118**: 247-252.
- 193. Everard CO, Hayes RJ, Fraser-Chanpong GM.** A serosurvey for leptospirosis in Trinidad among urban and rural dwellers and persons occupationally at risk. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1985; **79**: 96-105.
- 194. Katz AR, Buchholz AE, Hinson K, Park SY, Effler PV.** Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerging Infectious Diseases* 2011; **17**: 221-226.
- 195. Perrocheau A, Pérolat P.** Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *European Journal of Epidemiology* 1997; **13**: 161-167.
- 196. Hirschauer C, Daudens E, Coudert C, Frogier E, Melix G, Fleure M, Mallet H-P.** Epidemiology of leptospirosis in French Polynesia from 2006 to 2008 [in French]. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2009; **48-49-50**: 508-511.
- 197. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD.** The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. *Epidemiology and Infection* 2006; **134**: 1217-1225.
- 198. Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M.** Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases* 2006; **10**: 378-386.
- 199. Topic MB, Habus J, Milas Z, Tosev EC, Stritof Z, Turk N.** Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **104**: 202-206.
- 200. Morshed MG, Konishi H, Terada Y, Arimitsu Y, Nakazawa T.** Seroprevalence of leptospirosis in a rural flood prone district of Bangladesh. *Epidemiology and Infection* 1994; **112**: 527-531.
- 201. Pereira MMA, J.** Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil - a serological and epidemiological study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1990; **85**: 47-52.
- 202. Duval G, Michault A, Baranton G, Law-Koune JD, Folio G, Bertil G, Guiserix J.** Sero epidemiological survey on human leptospirosis in Reunion Island [in French]. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 1991; **39**: 135-141.
- 203. Lévesque B, Messier V, Bonnier-Viger Y, Couillard M, Côté S, Ward BJ, Libman MD, Gingras S, Dick D, Dewailly É.** Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; **59**: 283-286.
- 204. Abb J.** Acute leptospirosis in a triathlete. *Wilderness and Environmental Medicine* 2002; **13**: 45-47.
- 205. Guarner J, Shieh W-J, Morgan J, Bragg SL, Bajani MD, Tappero JW, Zaki SR.** Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon. *Human Pathology* 2001; **32**: 750-752.
- 206. Morgan J, Bornstein Shari L, Karpati Adam M, Bruce M, Bolin CA, Austin Constance C, Woods Christopher W, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham Donald R, Proctor M, Ashford David A, Bajani M, Bragg Sandra L, Shutt K, Perkins Bradley A, Tappero Jordan W.** Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clinical Infectious Diseases* 2002; **34**: 1593-1599.
- 207. Wilkins E, Cope A, Waitkins S.** Rapids, rafts, and rats. *Lancet* 1988; **332**: 283-284.
- 208. Gelman S, S. , Gundlapalli A, V. , Hale D, Croft A, Hindiyeh M, Carroll K, C. .** Spotting the Spirochete: rapid diagnosis of leptospirosis in two returned travelers. *Journal of Travel Medicine* 2002; **9**: 165-167.
- 209. 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, Team tE-CI.** Leptospirosis in “eco-challenge” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerging Infectious Diseases* 2003; **9**: 702-707.
- 210. Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak BM, Hartskeerl RA, Sejvar J, Ashford DA.** Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Clinical Infectious Diseases* 2002; **34**.

211. Teichmann D, Göbels K, Simon J, Grobusch M, P., Suttorp N. A severe case of leptospirosis acquired during an Iron man contest. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001; **20**: 137-138.
212. Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, Quénel P, Cabié A. Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **84**: 621-626.
213. Stern Eric J, Galloway R, Shadomy Sean V, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, Wofford T, Wilkins Patricia P, Ari Mary D, Harris L, Clark Thomas A. Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. *Clinical Infectious Diseases* 2010; **50**: 843-849.
214. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1997; **46**: 577-579.
215. Boland M, Sayers G, Coleman T, Bergin C, Sheehan N, Creamer E, O'Connell M, Jones L, Zochowski W. A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. *Epidemiology and Infection* 2004; **132**: 195-200.
216. Mortimer RB. Leptospirosis in a caver returned from Sarawak, Malaysia. *Wilderness and Environmental Medicine* 2005; **16**: 129-131.
217. Lau C, Smythe L, Weinstein P. Leptospirosis: An emerging disease in travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2010; **8**: 33-39.
218. Grobusch M, P., Bollmann R, Schönberg A, Slevogt H, Garcia V, Teichmann D, Jelinek T, Flick H, Bergmann F, Rosseau S, Temmesfeld-Wollbrück B, Suttorp N. Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic. *Journal of Travel Medicine* 2003; **10**: 55-58.
219. Agampodi S, Peacock SJ, Thevanesam V. The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. *Lancet Infectious Diseases* 2009; **9**: 524-526.
220. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* 2008; **33**: 557-569.
221. World Health Organization. Leptospirosis: an emerging public health problem. *Weekly Epidemiological Record* 2011; **86**: 45-50.
222. Hartskeerl AR, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; **17**: 494-501.
223. Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology* 2010; **5**: 1413-1425.
224. Bolin CA. Diagnostic of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery (Small animal)* 1996; **11**: 166-171.
225. Meites E, Jay MT, Deresinski S, Shieh WJ, Zaki SR, Tompkins L, Smith DS. Reemerging leptospirosis, California. *Emerging Infectious Diseases* 2004; **10**: 406-412.
226. Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, Sadkowska-Todys M, Avdicova M, Reetz J, Luge E, Guerra B, Nöckler K, Jansen A. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clinical Infectious Diseases* 2009; **48**: 691-697.
227. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; **25**: 1--13.
228. Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Messina OG, Collia O, de Bassadoni D, Schtirbu R, Olenchuk A, de Mazzonelli GD, Parma A. Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 1004-1005.
229. Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, van der Linden H, Thiberge JM, Diancourt L, Brisse S, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M. Human Leptospira isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; **50**: 307-311.
230. Esmaili R, Hesamzadeh A, Alizadeh-Navaei R, Haghshenas MH, Alhani F. Incidence of leptospirosis in Mazandaran Province, north of Iran: a one year survey. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009; **12**: 1330-1333.
231. Tangkanakul W, Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasien P, Kingnate D, Ashford DA. Risk factors associated with leptospirosis in northeastern Thailand, 1998. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **63**: 204-206.
232. Vado-Solis I, Cardenas-Marrufo MF, Jimenez-Delgadillo B, Alzina-Lopez A, Laviada-Molina H, Suarez-Solis V, Zavala-Velazquez JE. Clinical-epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2002; **44**: 335-340.
233. Narita M, Fujitani S, Haake DA, Paterson DL. Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama islands, Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **73**: 652-656.

234. Young CC, Niedfeldt MW, Gottschich LM, Peterson CS, Gammons MR. Infectious disease and the extreme sport athlete. *Clinics in Sports Medicine* 2007; **26**: 473-487.
235. Olszyna DP, Jaspars R, Speelman P, van Elzaker E, Korver H, Hartskeerl RA. Leptospirosis in the Netherlands, 1991-1995 [in Dutch]. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 1998; **142**: 1270-1273.
236. Christova I, Tasseva E, Manev H. Human leptospirosis in Bulgaria, 1989-2001: epidemiological, clinical, and serological features. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2003; **35**: 869-872.
237. Johnston V, Stockley JM, Dockrell D, Warrell D, Bailey R, Pasvol G, Klein J, Ustianowski A, Jones M, Beeching NJ, Brown M, Chapman ALN, Sanderson F, Whitty CJM. Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom: Recommendations for investigation and initial management. *Journal of Infection* 2009; **59**: 1-18.
238. Leshem E, Segal G, Barnea A, Yitzhaki S, Ostfeld I, Pitlik S, Schwartz E. Travel-related leptospirosis in Israel: a nationwide study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **82**: 459-463.
239. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerging Infectious Diseases* 2005; **11**: 1048-1054.
240. Askling HH, Lesko B, Vene S, Berndtson A, Björkman P, Bläckberg J, Bronner U, Follin P, Hellgren U, Palmerus M, Ekdahl K, Tegnell A, Struwe J. Serologic analysis of returned travelers with fever, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 2009; **15**: 1805-1808.
241. Bezirtzoglou C, Dekas K, Charvalos E. Climate changes, environment and infection: Facts, scenarios and growing awareness from the public health community within Europe. *Anaerobe* 2011; **17**: 337-340.
242. Epstein PR. Climate and health. *Science* 1999; **285**: 347-348.
243. Patz JA, Kovats RS. Hotspots in climate change and human health. *British Medical Journal* 2002; **325**: 1094-1098.
244. Sehgal SC, Sugunan AP, Vijayachari P. Outbreak of leptospirosis after the cyclone in Orissa. *National Medical Journal of India* 2002; **15**: 22-23.
245. Lau C. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **104**: 631-638.
246. Patz JA, Campbell-Lendrum D, Holloway T, Foley JA. Impact of regional climate change on human health. *Nature* 2005; **438**: 310-317.
247. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine* 2007; **357**: 1018-1027.
248. Programme UNHS. The challenge of slums: global report on human settlements 2003. London, UK; 2003.
249. Yanagihara Y, Villanueva SYAM, Yoshida S-i, Okamoto Y, Masuzawa T. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2007; **30**: 399-413.
250. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 2010; **468**: 647-652.
251. Suzan G, Marcé E, Giermakowski JT, Mills JN, Ceballos G, Ostfeld RS, Armien B, Pascale JM, Yates TL. Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS ONE* 2009; **4**: e5461.
252. Swaddle J, Calos P. Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS ONE* 2008; **3**: e2488.
253. Allan BF, Keesing F, Ostfeld R. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology* 2003; **17**: 267-272.
254. Carver S, Spafford H, Storey A, Weinstein P. Dryland salinity and the ecology of Ross River virus: the ecological underpinnings of the potential for transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; **9**: 611-622.
255. Carlson JC, Dyer LA, Omlin FX, Beier JC. Diversity cascades and malaria vectors. *Journal of Medical Entomology* 2009; **46**: 460-464.
256. Derne BT, Fearnley EJ, Lau CL, Paynter S, Weinstein P. Biodiversity and leptospirosis risk: a case of pathogen regulation? *Medical Hypotheses* 2011; **77**: 339-344.
257. Howald G, Donlan CJ, Galvan JP, Russell JC, Parkes J, Samaniego A, Wang Y, Veitch D, Genovesi P, Pascal M, Saunders A, Tershy B. Invasive rodent eradication on islands. *Conservation Biology* 2007; **21**: 1258-1268.
258. Lhomme V, Grolier-Bois L, Jouannelle J, Elisabeth L. Leptospirosis in Martinique from 1987 to 1992: results of an epidemiological, clinical and biological study. *Médecine et Maladies Infectieuses* 1996; **26**: 94-98.
259. Berlioz-Arthaud A, Kiedrzyński T, Singh N, Yvon J-F, Roualen G, Coudert C, Uluiviti V. Multicentre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; **101**: 714-721.

- 260. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD.** Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 2001; **78**: 103-116.
- 261. Maillard J-C, Gonzalez J-P.** Biodiversity and emerging diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; **1081**: 1-16.
- 262. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD.** Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; **287**: 443-449.
- 263. Higgins R.** Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 2004; **23**: 569-581.
- 264. Prescott JF, McEwen B, Taylor J, Woods JP, Abrams-Ogg A, Wilcock B.** Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Canadian Veterinary Journal* 2002; **43**: 955-961.
- 265. Ghneim G, S., Viers J, H., Chomel B, B., Kass P, H., Descollonges D, A., Johnson M, L.** Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Veterinary Research* 2007; **38**: 37-50.
- 266. Ward MP, Guptill LF, Prahl A, Wu CC.** Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2004; **224**: 1958-1963.
- 267. Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW.** Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *Journal of Small Animal Practice* 1998; **39**: 231-236.
- 268. Ward MP.** Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 2002; **56**: 215-226.
- 269. Jorge RSP, Ferreira F, Ferreira Neto JS, Vasconcelos SdA, Lima EdS, Morais ZMd, Souza God.** Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011; **106**: 441-444.
- 270. Ward MP.** Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Preventive Veterinary Medicine* 2002; **56**: 203-213.
- 271. Ward MP, Glickman LT, Guptill LE.** Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; **220**: 53-58.
- 272. Prescott JF, Key D, Osuch MR.** Leptospirosis in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 1999; **40**: 430-431.
- 273. Jansen A, Nöckler K, Schönberg A, Luge E, Ehlert D, Schneider T.** Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006; **25**: 544-546.
- 274. Klopffleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C, Nöckler K, Mayer-Scholl A, Gruber AD.** An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Veterinary Medicine International* 2010; **928541**.
- 275. Ashford RW.** When is a reservoir not a reservoir? *Emerging Infectious Diseases* 2003; **9**: 1495-1496.
- 276. Savey M, Dufour B.** Diversité des zoonoses. Définitions et conséquences pour la surveillance et la lutte. *Epidémiologie et Santé Animale* 2004; **46**: 1-16.
- 277. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE.** Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Veterinary Pathology* 2009; **46**: 792-799.
- 278. Minette HP.** Incidence and serotype of *Leptospirae* isolated from rodents and mongooses on the island of Hawaii. In: *10th Pacific Sci. Congr.* Honolulu, 1961.
- 279. Minette HP.** Leptospirosis in rodents and mongooses on the Island of Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1964; **13**: 826-832.
- 280. Tomich PQ.** Studies of leptospirosis in natural host populations I. Small mammals of Waipio Valley, island of Hawaii. *Pacific Science* 1979; **33**: 257-279.
- 281. Higa HH, Fujinaka IT.** Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the island of Oahu. *Public Health Reports* 1976; **91**: 171-177.
- 282. Alexander AD, Benenson A, Byrne RJ, Diaz Rivera RS, Evans LB, Gochenour WS, Hall HE, Hightower JA, Jeffries H, Dejesus J, Martinez E, Paniagua M, Pons JA, Rodriguez Molina R, Swisher KYJ, Woodward TE, Yager RH.** Leptospirosis in Puerto Rico. *Zoonoses Research* 1963; **2**: 152-227.
- 283. Michel V.** Epidémiologie de la leptospirose zoonose: étude comparée du rôle de différentes espèces de la faune sauvage et de leur environnement [thesis]. Lyon: Université Claude Bernard; 2001. 251 pp.
- 284. Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G.** Epidemiology of leptospirosis. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2002; **54**: 7-10.
- 285. Everard CO, Fraser-Chanpong GM, Bhagwandin LJ, Race MW, James AC.** Leptospire in wildlife from Trinidad and Grenada. *Journal of Wildlife Diseases* 1983; **19**: 192-199.
- 286. Everard COR, Green AE.** Leptospirosis in Trinidad and Grenada, with special reference to the mongoose. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1976; **70**: 57-61.

- 287. Tsai CC, Fresh JW.** Leptospire in the Hebdomadis and Pomona serogroups from mongooses in Taiwan. *Tropical and Geographical Medicine* 1971; **23**: 201-203.
- 288. Vinetz JM, Wilcock BA, Aguirre A, Gollin LX, Katz AR, Fujioka RS, Maly K, Horwitz P, Chang H.** Beyond disciplinary boundaries: leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence. *EcoHealth* 2005; **2**: 291-306.
- 289. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA.** Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infection and Immunity* 2005; **73**: 3251-3260.
- 290. Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM.** Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2008; **2**: e213.
- 291. Ralaiarijaona RL, Bellenger E, Chanteau S, Roger F, Pérolat P, Rasolofo Razanamparany V.** Recherche de réservoirs de la leptospirose à Madagascar par la technique d'amplification génique. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 2001; **67**: 34-36.
- 292. Collares-Pereira M, Mathias ML, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Duarte-Rodrigues P.** Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira Island (Azores). *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 1151-1157.
- 293. Sunbul M, Esen S, Leblebicioglu H, Hokelek M, Pekbay A, Eroglu C.** *Rattus norvegicus* acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to Leptospira strain. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001; **33**: 896-898.
- 294. Villanueva SYAM, Ezoë H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, Koizumi N, Fukui T, Okamoto Y, Masuzawa T, Cavinta LL, Gloriani NG, Yoshida S-i.** Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **82**: 889-898.
- 295. Maghami GH, Hooshmand-rad P, Farhang-azad A.** Leptospirosis in small mammals of Iran: II: isolation of *Leptospira grippityphosa* from *Mus musculus*. *Journal of Wildlife Diseases* 1977; **13**: 286-289.
- 296. Brown RZ, Gorman GW.** The occurrence of leptospiral infections in feral rodents in southwestern Georgia. *American Journal of Public Health* 1960; **50**: 175-181.
- 297. Cvetnic Z, Margaletic JM, Toncic J, Turk N, Milas Z, Spicic S, Lojkic M, Terzic S, Jemersic S, Humski A, Mitak M, Habrun B, Krt B.** A serological survey and isolation of leptospire from small rodents and wild boars in the Republic of Croatia. *Veterinary Medicine* 2003; **48**: 321-329.
- 298. Mgone GF, Mhamphi G, Katakweba A, Paemelaere E, Willekens N, Leirs H, Machang'u RS.** PCR detection of *Leptospira* DNA in rodents and insectivores from Tanzania. *Belgian Journal of Zoology* 2005; **135**: 17-19.
- 299. Matthias MA, Levett PN.** Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Medical Journal* 2002; **51**: 10-13.
- 300. World Health Organization.** Leptospirosis. The coypu as a rodent reservoir infection. *Weekly Epidemiological Record* 1986; **15**: 115.
- 301. Waitkins SA, Wanyangu S, Palmer M.** The coypu as a rodent reservoir of leptospira infection in Great Britain. *Journal of Hygiene, Cambridge* 1985; **95**: 409-417.
- 302. Michel V, Ruvoen-Clouet N, Menard A, Sonrier C, Fillonneau C, Rakotovo F, Ganière JP, André-Fontaine G.** Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and human in France. *European Journal of Epidemiology* 2001; **17**: 111-121.
- 303. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G.** *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2009; **32**: 463-476.
- 304. Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VanderSchalie J, Besser TE, Huckabee J, Daniels JB, Hancock DD, Leslie M, Baer R.** Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington state. *Zoonoses and Public Health* 2008; **55**: 436-442.
- 305. Gale JL, Head MD.** *Suncus* as a potential reservoir of leptospirosis: the blaming of the shrew. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1970; **1**: 270-274.
- 306. Kundin WD, Carlos ER, Tsai CC, Kuczynski GA.** *Suncus* as a potential reservoir of leptospirosis: the blaming of the shrew. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1970; **1**: 270-274.
- 307. Yasuda PH, Santa Rosa CA, Myers DM, Yanaquita RM.** The isolation of leptospire from stray dogs in the city of Sao Paulo, Brazil. *International Journal of Zoonoses* 1980; **7**: 131-134.
- 308. Tsai CC, Fresh JW.** *Leptospira canicola* isolated from dogs in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* 1969; **68**: 58-62.
- 309. André-Fontaine G.** Canine leptospirosis-Do we have a problem? *Veterinary Microbiology* 2006; **117**: 19-24.

- 310. Moore GE, Guptill LF, Glickman NW, Caldanaro RJ, Aucoin D, Glickman LT.** Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases* 2006; **12**: 501-503.
- 311. Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwata H, Okuda M.** Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Medical Science* 2009; **71**: 1191-1199.
- 312. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE.** Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010; **29**: 1305-1309.
- 313. Meeyam T, Tablerk P, Petchanok B, Pichpol D, Padungtod P.** Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in dogs. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2006; **37**: 148-153.
- 314. Rossetti CA, Liem M, Samartino LE, Hartskeerl RA.** Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. *Veterinary Microbiology* 2005; **107**: 241-248.
- 315. Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA.** Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiology and Infection* 2010; **138**: 1059-1070
- 316. Romero MH, Sanchez JA, Hayek LC.** Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en poblacion urbana humana y canina del Departamento del Tolima. *Revista de Salud Pública* 2010; **12**: 268-275.
- 317. Brown K, Prescott J.** Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *Canadian Medical Association Journal* 2008; **178**: 399-401.
- 318. Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin OA.** Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005; **38**: 294-300.
- 319. Juvet F, Schuller S, O'Neill EJ, O'Neill PA, Nally JE.** Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Veterinary Record* 2011; **168**: 564.
- 320. Levett PN.** Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 2003; **36**: 447-452.
- 321. Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwatanaporn A, Chueasuwanhai S, Day NP, Peacock SJ.** The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; **81**: 695-697.
- 322. Thiermann AB.** Incidence of leptospirosis in the Detroit rat population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1977; **26**: 970-974.
- 323. de Faria MT, Calderwood MS, Athanzio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG.** Carriage of *Leptospira* interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Tropica* 2008; **108**: 1-5.
- 324. Abdulkader RCRM, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, Da Silva MV.** Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2002; **44**: 79-83.
- 325. Thiermann AB.** The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 39-43.
- 326. Tulsiani SM, Graham GC, Dohnt MF, Burns M-A, Craig SB.** Maximizing the chances of detecting pathogenic leptospires in mammals: the evaluation of field samples and a multi-sample-per-mammal, multi-test approach. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2011; **105**: 145-162.
- 327. Hartskeerl RA, Terpstra WJ.** Leptospirosis in wild animals. *Veterinary Quarterly* 1996; **18**: S149-150.
- 328. Cox TE, Smythe LD, Leung LKP.** Flying foxes as carrier of pathogenic *Leptospira* species. *Journal of Wildlife Diseases* 2005; **41**: 753-757.
- 329. Prescott J.** Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Canadian Medical Association Journal* 2008; **178**: 397-398.
- 330. Andrade L, Rodrigues AC, Sanches TRC, Souza RB, Seguro AC.** Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 2007; **292**: F586-F592.
- 331. Claus A, Van de Maele I, Pasmans F, Gommeren K, Daminet S.** Leptospirosis in dogs: a retrospective study of seven clinical cases in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2008; **77**: 259-263.
- 332. Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, Jansen A, Kaser-Hotz B, Klopffleisch R, Lotz F, Luge E, Nöckler K.** Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; **24**: 1277-1282.
- 333. Ellis WA.** Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Veterinary Record* 2010; **167**: 602-605.

- 334. Goldstein RE.** Canine leptospirosis. *The Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice* 2010; **40**: 1091-1101.
- 335. Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi A-A, Gouya MM, Djadid ND.** *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution* 2010; **10**: 273-277.
- 336. Silva EF, Cerqueira GM, Seyffert N, Hartwig DD, Athanazio DA, Pinto LS, Queiroz A, Ko AI, Brod CS, Dellagostin OA.** *Leptospira noguchii* and human and animal leptospirosis, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2009; **15**: 621-623.
- 337. Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF, Gutiérrez-Blanco E, Jiménez-Coello M.** Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira* species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; **1149**: 270-274.
- 338. Hrinivich K, Prescott JF.** Leptospirosis in 2 unrelated dogs. *Canadian Veterinary Journal* 1997; **38**: 509-510.
- 339. Roach JM, van Vuuren M, Picard JA.** A serological survey of antibodies to *Leptospira* species in dogs in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 2010; **81**: 156-159.
- 340. Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, Hartmann K.** Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *Journal of Small Animal Practice* 2007; **48**: 324-328.
- 341. Bakoss P, Jarekova J, Labuda M.** An attempt to control a natural focus of leptospirosis grippotyphosa by rodenticide - a long-term study (1977-2004). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2007; **14**: 51-56.
- 342. Scanziani E, Origi F, Giusti AM, Iacchia G, Vasino A, Pirovano G, Scarpa P, Tagliabue S.** Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *Journal of Small Animal Practice* 2002; **43**: 154-157.
- 343. Klaasen HLBM, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ.** Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology* 2003; **95**: 121-132.
- 344. Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, Ojkic D, Presvott JF.** Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2009; **73**: 167-175.
- 345. Hartman EG, van Houten M, Frik JF, van der Donk JA.** Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1984; **7**: 245-254.
- 346. Tronel JP, Bey RF, Thevenon J, Minke J, Milford F.** *Efficacy of Leptodog® vaccine in dogs demonstrated by experimental challenges: evaluation at short term and duration of immunity.* In: Proceedings of the 24th World Small Animal Veterinary Congress. Lyon, France, 1999.
- 347. Minke JM, Bey R, Tronel JP, Latour S, Colombet G, Yvoret J, Cariou C, Guiot AL, Cozette V, Guigal PM.** Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Veterinary Microbiology* 2009; **137**: 137-145.
- 348. Schreiber P, Martin V, Najbar W, Sanquer A, Gueguen S, Lebreux B.** Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. *Veterinary Microbiology* 2005; **108**: 113-118.
- 349. Carlos ER, Kundin WD, Watten RH, Tsai CC, Irving GS, Carlos ET, Directo AC.** Leptospirosis in the Philippines: feline studies. *American Journal of Veterinary Research* 1971; **32**: 455-456.
- 350. Jamshidi S, Akhavizadegan MA, Bokaie S, Maazi N, A. GA.** Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 2009; **1**: 32-36.
- 351. Felt SA, Wasfy MO, El-Tras WF, Samir A, Rahaman BA, Boshra M, Parker TM, Hatem ME, El-Bassiouny AA, Murray CK, Pimentel G.** Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **84**: 420-425.
- 352. Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, Birgel EH, Fernandes WR, Paim GV.** Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *International Journal of Zoonoses* 1985; **12**: 111-119.
- 353. Agunloye CA, Nash AS.** Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *Journal of Small Animal Practice* 1996; **37**: 126-129.
- 354. Fukushima H, Nakamura R, Iitsuka S, Ito Y, Saito K.** Presence of zoonotic pathogens (*Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Leptospira* spp.) simultaneously in dogs and cats. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* 1985; **181**: 430-440.
- 355. Donahue JM, Smith BJ, Poonacha KB, Donahoe JK, Rigsby CL.** Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1995; **7**: 87-91.
- 356. Houwers DJ, Goris MGA, Abdoel T, Kas JA, Knobbe SS, van Dongen AM, Westerduin FE, Klein WR, Hartskeerl RA.** Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses

indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. *Veterinary Microbiology* 2010; **148**: 449-451.

- 357. Shanahan LM, Slovis NM.** Leptospira interrogans associated with hydrallantois in 2 pluriparous thoroughbred mares. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; **25**: 158-161.
- 358. Baverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzen P, Egenvall A.** Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2009; **51**: 15.
- 359. Donahue JM, Smith BJ, Redmon KJ, Donahue JK.** Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1991; **3**: 148-151.
- 360. Lees VW, Gale SP.** Titers to *Leptospira* species in horses in Alberta. *Canadian Veterinary Journal* 1994; **35**: 636-340.
- 361. Hodgin EC, Miller DA, Lozano F.** Leptospira abortion in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1989; **1**: 283-287.
- 362. Poonacha KB, Donahue JM, Giles RC, Hong CB, Petrites-Murphy MB, Smith BJ, Swerczek TW, Tramontin RR, Tuttle PA.** Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Veterinary Pathology* 1993; **30**: 362-369.
- 363. Szeredi L, Haake DA.** Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 755-761.
- 364. Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W, Medeiros MA.** Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. *Veterinary Microbiology* 2011; **153**: 413.
- 365. Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, Andre-Fontaine G, Laugier C, Fortier G, Leclercq R.** Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2006; **18**: 218-221.
- 366. Hogan PM, Bernard WV, Kazakevicius PA, Fitzgerald MR.** Acute renal disease due to *Leptospira interrogans* in a weaning. *Equine Veterinary Journal* 1996; **28**: 331-333.
- 367. Divers T, Byars TD, Shin SJ.** Renal dysfunction associated with infection of *Leptospira interrogans* in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; **201**: 1391-1392.
- 368. Williams RD, Morter RL, Freeman MJ, Lavignette AM.** Experimental chronic uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1971; **10**: 948-954.
- 369. Sandmeyer LS, Grahn BH, Breaux CB.** Diagnostic ophthalmology. Anterior and posterior uveitis with inflammatory retinal detachment, most likely secondary to equine recurrent uveitis. *Canadian Veterinary Journal* 2007; **48**: 97-98.
- 370. Wada S, Yoshinari M, Katayama Y, Anzai T, Wada R, Akuzawa M.** Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of *Leptospiral* infection in a horse. *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6**: 191-195.
- 371. Brem S, Gerhards H, Wollanke B, Meyer P, Kopp H.** 35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis (ERU). *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 1999; **112**: 390-393.
- 372. Brandes K, Wollanke B, Niedermaier G, Brem S, Gerhards H.** Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2007; **54**: 270-275.
- 373. Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH.** Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**: 2731-2733.
- 374. Pearce JW, Galle LE, Kleiboeker SB, Turk JR, Schommer SK, Dubielzig RR, Mitchell WJ, Moore CP, Giuliano EA.** Detection of *Leptospira interrogans* DNA and antigen in fixed equine eyes affected with end-stage equine recurrent uveitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; **19**: 686-690.
- 375. Parma AE, Cerone SI, Sansinanea SA.** Biochemical analysis by SDS-PAGE and western blotting of the antigenic relationship between *Leptospira* and equine ocular tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992; **33**: 179-185.
- 376. Lucchesi PMA, Parma AE, Arroyo GH.** Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *BMC Microbiology* 2002; **2**: 3.
- 377. Alonso-Andicoberry C, García-Peña FJ, Pereira-Bueno J, Costas E, Ortega-Mora LM.** Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 2001; **52**: 109-117.
- 378. Collares-Pereira M.** Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *Veterinary Record* 1991; **128**: 549-550.
- 379. Zacarias FGS, Vasconcellos SA, Anzai EK, Giraldo N, de Freitas JC, Hartskeerl R.** Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; **39**: 744-748.
- 380. Gamage CD, Koizumi N, Muto M, Nwafor-Okoli C, Kurukurusuriya S, Rajapakse JRPV, Kularatne SAM, Kanda K, Lee RB, Obayashi Y, Watanabe H, Tamashiro H.** Prevalence and carrier status of

- leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; **11**: 1041-1047.
- 381. Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J, Sanjuan ML, Yus E.** Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Veterinary Microbiology* 2001; **80**: 275-284.
- 382. Kingscote BF.** Diagnosis of *Leptospira* serovar hardjo infection in cattle in Canada. *Canadian Veterinary Journal* 1985; **26**: 270-274.
- 383. Lilenbaum W, Souza GN.** Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science* 2003; **75**: 249-251.
- 384. Prescott JF, Miller RB, Nicholson VM.** Isolation of *Leptospira* hardjo from kidneys of Ontario cattle at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1987; **51**: 229-231.
- 385. Schoonman L, Swai ES.** Herd- and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. *Tropical Animal Health and Production* 2010; **42**: 1565-1572.
- 386. Feresu SB, Bolin CA, Korver H, Terpstra WJ.** Classification of leptospire of the Pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; **44**: 541-546.
- 387. Feresu SB, Korver H, Riquelme N, Baranton G, Bolin CA.** Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis serogroup isolated from Zimbabwe cattle. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; **46**: 694-698.
- 388. Gangadhar NL, Prabhudas K, Bhushan S, Sulthana M, Barbuddhe SB, Rehaman H.** *Leptospira* infection in animals and humans: a potential public health risk in India. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 2008; **27**: 885-892.
- 389. Suepaul S, Carrington C, Campbell M, Borde G, Adesiyun A.** Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Tropical Animal Health and Production* 2011; **43**: 367-375.
- 390. Escamilla HP, Martinez MJJ, Medina CM, Morales SE.** Frequency and cause of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2007; **71**: 314-317.
- 391. Grooms DL.** Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. *Theriogenology* 2006; **66**: 624-628.
- 392. André-Fontaine G, Kodjo A.** Leptospiroses et troubles de la reproduction chez les bovins. *Bulletin des GTV* 2009; **48**: 53-58.
- 393. Grégoire N, Higgins R, Robinson Y.** Isolation of leptospire from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. *American Journal of Veterinary Research* 1987; **48**: 370-371.
- 394. Kingscote BF.** Leptospirosis in livestock. *Canadian Veterinary Journal* 1985; **26**: 235-236.
- 395. Higgins RJ, Harbourne JF, Little TW, Stevens AE.** Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. *Veterinary Record* 1980; **107**: 307-310.
- 396. Pearson JK, Mackie DP, Ellis WA.** Milk drop syndrome resulting from *Leptospira* hardjo. *Veterinary Record* 1980; **106**: 135-136.
- 397. Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZMM, Vasconcellos AS, Richtzenhain LJ.** Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 2000; **73**: 261-267.
- 398. Kiktenko VS, Balashov NG, Rodina VN.** Leptospirosis infection through insemination of animals. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 1976; **21**: 207-213.
- 399. Oriel JD, Hayward AH.** Sexually-transmitted diseases in animals. *British Journal of Venereal Diseases* 1974; **50**: 412-420.
- 400. Ciceroni L, Lombardo D, Pinto A, Ciarrocchi S, Simeoni J.** Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige - South Tyrol. *Journal of Veterinary Medicine B* 2000; **47**: 217-223.
- 401. Lilenbaum W, Vargas R, Brandao FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA.** Detection on *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 2008; **69**: 837-842.
- 402. Boqvist S, Thu HTV, Vågsholm I, Magnusson U.** The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Vietnam. *Theriogenology* 2002; **58**: 1327-1335.
- 403. Naito M, Sakoda Y, Kamikawa T, Nitta Y, Hirose K, Sakashita M, Kurokawa S, Kida H.** Serological evidence of leptospiral infection in pig populations in different districts in Japan. *Microbiology and Immunology* 2007; **51**: 593-599.
- 404. Kessy MJ, Machang'u RS, Swai ES.** A microbiological and serological study of leptospirosis among pigs in the Morogo municipality, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production* 2010; **42**: 523-530.
- 405. Boqvist S, Chau BL, Gunnarsson A, Olsson Engvall E, Vågsholm I, Magnusson U.** Animal- and herd-level risk factors for leptospiral seropositivity among sows in the Mekong delta, Vietnam. *Preventive Veterinary Medicine* 2002; **53**: 233-245.
- 406. Bolin CA.** Diagnosis of leptospirosis in swine. *Swine Health and Production* 1994; **2**: 23-24.

407. Ellis WA. Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. *Veterinary Record* 1986; **118**: 563.
408. Bolin CA. *Diagnosis and control of bovine leptospirosis*. In: *Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference*. Reno, NV, 2003: 155-159.
409. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE). *Tableau Economique de La Réunion (TER), Edition 2010*. INSEE ed. Paris, France, 2010: 237 pp.
410. Site de Météo France Réunion (http://www.meteo.fr/temps/domtom/La_Reunion/meteoreunion2/#). Accessed 15th January 2011.
411. Raunet M. *Physical environment and soils of Reunion. Consequences for effective agricultural and use [in French]*. Montpellier, France: CIRAD 1991: 438 pp.
412. Rapports d'activité du Centre National de Référence des Leptospiroses (<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000031-010/actualites-rapports>). Accessed December 21, 2011.
413. Mailloux M, Debarbat F, Mollaret HH. Leptospiroses in the island of Reunion. I. Human leptospiroses [in French]. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1983; **76**: 729-735.
414. Michault A. Insularité et risque épidémiques à la Réunion. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1998; **91**: 52-55.
415. Mailloux M. Les leptospiroses humaines dans les D.O.M.-T.O.M. 10 années de bilan immunologiques (1970-1979). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique Filiales* 1980; **73**: 229-238.
416. Romero EC, Caly CR, Yasuda PH. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1998; **40**: 183-184.
417. Everard CO, Maude GH, Hayes RJ. Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1990; **84**: 255-266.
418. Blackmore DK, Schollum LM, Moriarty KM. The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *New Zealand Medical Journal* 1984; **97**: 83-86.
419. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE). *Tableau Economique de Mayotte (TEM), Edition 2010*. Mamoudzou: INSEE Mayotte, 2010: 70 pp.
420. Laporte P, Michault A, Galtier J, Lefait-Robin R, Aucher P, Baranton G. La leptospirose à Mayotte. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1990; **83**: 637-641.
421. van der Hoeden J, Szenberg E. Infection with *Leptospira mini swajizak* in man and animals in Israel. *Zoonoses Research* 1962; **1**: 251-276.
422. Souza Júnior MFd, Lobato ZIP, Lobato FCF, Moreira ÉC, Oliveira RRd, Leite GG, Freitas TD, Assis RA. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; **39**: 292-294.
423. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS ONE* 2010; **5**: e12637.
424. Comité Français de l'IUCN-ONCFS. *Les vertébrés terrestres introduits en outre-mer et leurs impacts. Guide illustré des principales espèces envahissantes*. Aurillac (France): UICN-ONCFS, 2011: 100 pp.
425. Cheke A. The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western Indian Ocean oceanic islands. *Phelsuma* 2010; **18**: 38-69.
426. Tollenare C, Brouat C, Duplantier JM, Rahalison L, Rahelinirina S, Pascal M, Moné H, Mouahid G, Leirs H, Cosson JF. Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *Journal of Biogeography* 2010; **37**: 398-410.
427. Nicoll ME. *Tenrec ecaudatus, Tenrec, Tandraka, Trandraka*. In: Goodman SM, Benstead JP, eds. *The Natural History of Madagascar*. Chicago and London: The University of Chicago Press, 2004: 1283-1287.
428. Goodman SM, Jansen van Vuuren B, Ratrimomanarivo F, Probst J-M, Bowie RCK. Specific status of populations in the Mascarene islands referred to *Mormopterus acetabulosus* (Chiroptera: Molossidae), with description of a new species. *Journal of Mammalogy* 2008; **89**: 1316-1327.
429. Moutou F. Notes sur les chiroptères de l'île de La Réunion (Océan Indien). *Mammalia* 1982; **46**: 35-51.
430. Jones G, Teeling EC. The evolution of echolocation in bats. *TRENDS in Ecology and Evolution* 2006; **21**: 149-156.
431. Mittermeier RA, Ganzhorn JU, Konstant WR, Glander K, Tattersall I, Groves CP, Rylands AB, Hapke A, Ratsimbazafy J, Mayor MI, Louis EEJ, Rumpler Y, Schwitzer C, Rasoloarison RM. Lemur diversity in Madagascar. *International Journal of Primatology* 2008; **29**: 19-38.
432. Desvars A, Duval T, Punelle C, Pascal M, Vourc'h G. The flying-fox *Pteropus seychellensis* in Mayotte (Comoros): capture and blood sample methods. *Journal of Wildlife Diseases* 2009 **45**: 870-873.
433. Reine NJ, Langston CE. Urinalysis interpretation: How to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2005; **20**: 2-10.

- 434. Leroy J.** Comparaison des tests de dépistage rapide et de la mesure de la protéinurie chez le chien [thesis]. Toujouse: Paul Sabatier; 2006. 72 pp.
- 435. Robert R.** Pluviométrie à l'île de la Réunion : des travaux de J. Defos du Rau (1960) à nos jours. *L'Information Géographique* 2001; **65**: 53-59.
- 436. Lucchesi PMA, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC.** Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2004; **37**: 131-134.
- 437. Czopowicz M, Kaba J, Smith L, Szalus-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L, Frymus T.** Leptospiral antibodies in the breeding goat population of Poland. *Veterinary Record* 2011; **169**: 230.
- 438. Blatti S, Overesch G, Gerber V, Frey J, Hüsey D.** Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2011; **153**: 449-456.
- 439. Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplède A, Blanchard B, Descarsin V, Dumas P, Dumas Y, Coïc C, Couzi L, Fournier P.** Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. *Journal of Wildlife Diseases* 2010; **46**: 1141-1151.
- 440. Agampodi SB, Peacock SJ, Thevanesam V, Nugugoda DB, Smythe L, Thaipadungpanit J, Craig SB, Burns MA, Dohnt M, Boonsilp S, Senaratne T, Kumara A, Palihawadana P, Perera S, Vinetz JM.** Leptospirosis outbreak in Sri Lanka in 2008: Lessons for assessing the global burden of disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **85**: 471-478.
- 441. Castro JRd, Salaberry SRS, Souza MAD, Lima-Ribeiro AMC.** Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil [in Portuguese]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; **44**: 217-222.
- 442. de Freitas T, Keuroghlian A, Eaton D, de Freitas E, Figueiredo A, Nakazato L, de Oliveira J, Miranda F, Paes R, Monteiro L, Lima J, da C. Neto A, Dutra V, de Freitas J.** Prevalence of *Leptospira interrogans* antibodies in free-ranging Tayassu pecari of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. *Tropical Animal Health and Production* 2010; **42**: 1695-1703.
- 443. Kositanont U, Naigowit P, Invithaya A, Singchai C, Puthavathana P.** Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in rodents and shrews trapped in low and high endemic areas in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2003; **86**: 136-142.
- 444. Laras K, Cao BV, Bounlu K, Nguyen TKT, Olson JG, Thongchanh S, Tran NVA, Hoang KL, Punjabi N, Ha BK, Ung SA, Insisiengmay S, Watts DM, Beecham HJ, Corwin AL.** The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; **67**: 278-286.
- 445. Bustin SA.** Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods* 2010; **50**: 217-226.
- 446. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT.** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009; **55**: 611-622.
- 447. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B.** Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity* 2005; **73**: 4853-4863.
- 448. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B.** Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Infection and Immunity* 2002; **70**: 2311-2318.
- 449. Hauk P, Macedo F, Romero EC, Vasconcellos SA, de Moraes ZM, Barbosa AS, Ho PL.** In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. *Infection and Immunity* 2008; **76**: 2642-2650.
- 450. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC.** The leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; **13**: 2037-2045.
- 451. Luo D, Xue F, Ojcius DM, Zhao J, Mao Y, Li L, Lin X, Yan J.** Protein typing of major outer membrane lipoproteins from Chinese pathogenic *Leptospira* spp. and characterization of their immunogenicity. *Vaccine* 2009; **28**: 243-255.
- 452. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, André-Fontaine G.** Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infection and Immunity* 2005; **73**: 4062-4069.
- 453. Feng CY, Li QT, Zhang XY, Dong K, Hu BY, Guo XK.** Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against leptospira. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2009; **42**: 796-803.
- 454. Lin X, Zhao J, Qian J, Mao Y, Pan J, Li L, Peng H, Luo Y, Yan J.** Identification of immunodominant B- and T-cell combined epitopes in outer membrane lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; **17**: 778-783.

455. Cheema PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, Sandey M. Detection of pathogenic leptospires in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. *Indian Journal of Experimental Biology* 2007; **45**: 568-573.
456. Mayer-Scholl A, Draeger A, Luge E, Ulrich R, Nöckler K. Comparison of two PCR systems for the rapid detection of *Leptospira* spp. from kidney tissue. *Current Microbiology* 2010; **62**: 1104-1106.
457. Jouglard SDD, Simionatto S, Seixas FK, Nassi FL, Dellagostin OA. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. *Canadian Journal of Microbiology* 2006; **52**: 747-752.
458. Bomfim MRQ, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *The Veterinary Journal* 2008; **178**: 251-256.
459. Weidmann M, Meyer-König U, Hufert FT. Rapid detection of Herpes Simplex virus and Varicella-Zoster virus infections by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**: 1565-1568.
460. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **49**: 2154-2160.
461. Kwok-Keung K, Meiyun Wu S, Morin Nissom P, Oh SKW, Choo ABH. Generation of high-level stable transgene expressing human embryonic stem cell lines using Chinese hamster elongation factor-1alpha promoter system. *Stem Cells and Development* 2008; **17**: 825--836.
462. Cerqueira GM, McBride AJA, Queiroz A, Pinto LS, Silva EF, Hartskeerl RA, Reis MG, ko AI, Dellagostin OA. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **82**: 83-87.
463. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Research in Microbiology* 2000; **151**: 333-341.
464. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 1988; **16**: 10881-10890.
465. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; **28**: 2731-2739.
466. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 2004; **32**: 1792-1797.
467. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2008; **25**: 1253-1256.
468. R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing, 2006pp.
469. Taylor KD. Competitive displacement as a possible means of controlling commensal rodents on islands. *Ecological Bulletins* 1975; **19**: 187-197.
470. Harper GA, Dickinson KJM, Seddon PJ. Habitat use by three rat species (*Rattus* spp.) on Stewart Island/Rakiura, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 2005; **29**: 251-260.
471. Barbehenn KR. Recent invasions of Micronesia by small mammals. *Micronesica* 1974; **10**: 41-50.
472. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 1468-1473.
473. Wolff JO. *Density-dependence and the socioecology of space use in rodents*. In: Design C, ed. ACIAR Monograph 96, Rats, mice and people: rodent biology and management. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2003: 124-130.
474. Russell J, Ringler D, Trombini A, Le Corre M. The island syndrome and population dynamics of introduced rats. *Oecologia* 2011; **167**: 667-676.
475. Pascal M, Lorvelec O, Borel G, Rosine A. Rodent community structures in agricultural and 'natural' ecosystems of Guadeloupe and Martinique (French West Indies) [in French]. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* 2004; **59**: 283-292.
476. Russell JC, Abdelkrim J, Fewster RM. Early colonisation population structure of a Norway rat island invasion. *Biological Invasions* 2009; **14**: 2923-2931.
477. **Mus musculus**, **Animal Diversity Web** (http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Mus_musculus.htm). Accessed November 2nd, 2011.
478. **Société d'Etudes Ornithologiques de La Réunion (SEOR)**. La conservation de l'Echenilleur de La Réunion par le contrôle des rats dans le massif de la Roche Ecrite: Synthèse des travaux 2010-2011 (action A1) du programme LIFE+CAP DOM Saint-André, La Réunion, France; 2011.
479. Wisseman CL, Traub R, Gochenour WS, Smadel JE, Lancaster WE. Leptospirosis of man and animals in urban, rural and jungle areas of southeast Asia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1955; **4**: 29-40.

- 480. Santos CS, Macedo JIO, Bandeira M, Chagas-Junior AD, McBride AJA, McBride FvWC, Reis MG, Athanazio DA.** Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes. *Journal of Medical Microbiology* 2010; **59**: 1101-1106.
- 481. Day TD, Waas JR, O'Connor CE, Carey PW, Matthews LR, Pearson AJ.** Leptospirosis in brushtail possums: is *Leptospira interrogans* serovar *balcanica* environmentally transmitted? *Journal of Wildlife Diseases* 1997; **33**: 254-260.
- 482. Cirone SM, Riemann HP, Ruppner R, Behymer DE, Franti CE.** Evaluation of the hemagglutination test for epidemiologic studies of leptospiral antibodies in wild mammals. *Journal of Wildlife Diseases* 1978; **14**: 193-202.
- 483. Shimizu MM.** Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, island of Hawaii. *International Journal of Zoonoses* 1984; **11**: 173-188.
- 484. Pereira MM, Andrade J.** Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospire and specific antibodies in rodents. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; **82**: 768-770.
- 485. Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J-M, Rahalison L, Cornet M.** First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 2010; **5**: e14111.
- 486. Natarajaseenivasan K, Vedhagiri K, Sivabalan V, Prabakaran SG, Sukumar S, Artiushin SC, Timoney JF.** Seroprevalence of *Leptospira borgpetersenii* serovar *javanica* infection among dairy cattle, rats and humans in the Cauvery river valley of southern India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2011; **42**: 679-686.
- 487. Johnson MAS, Smith H, Joseph P, Gilman RH, Bautista CT, Campos KJ, Cespedes M, Klatsky P, Vidal C, Terry H, Calderon MM, Coral C, Cabrera L, Parmar PS, Vinetz JM.** Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerging Infectious Diseases* 2004; **10**: 1016-1022.
- 488. Vanasco NB, Sequeira MD, Sequeira G, Tarabla HD.** Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; **60**: 227-235.
- 489. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, Ko AI, Reis MG.** *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica* 2008; **105**: 176-180.
- 490. da Silva EF, Félix SR, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Neto ACPS, Grassmann AA, Amaral MG, Gallina T, Dellagostin OA.** Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **83**: 336-337.
- 491. Saadi MA, Post G.** Rodent leptospirosis in Colorado. *Journal of Wildlife Diseases* 1976; **12**: 315-317.
- 492. Collares-Pereira M, Korver H, Terpstra WJ, Santos-Reis M, Ramalhinho MG, Mathias ML, Oom MM, Fons R, Libois R, Petrucci-Fonseca F.** First epidemiological data on pathogenic leptospire isolated on the Azorean islands. *European Journal of Epidemiology* 1997; **13**: 435-441.
- 493. Mohamed-Hassan SN, Bahaman AR, Mutalib AR, Khairani-Bejo S.** Serological prevalence of leptospiral infection in wild rats at the National Service Training Centres in Kelantan and Terengganu. *Tropical Biomedicine* 2010; **27**: 30-32.
- 494. Blanchard RJ, Blanchard CB.** Aggressive behavior in the rat. *Behavioral Biology* 1977; **21**: 197-224.
- 495. Doungchawee G, Phulsuksombat D, Naigowit P, Khoaprasert Y, Sangjun N, Kongtim S, Smythe LD.** Survey of leptospirosis of small mammals in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2005; **36**: 1516-1522.
- 496. Suncus murinus, Animal Diversity Web** (http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Suncus_murinus.html). Accessed November 2nd, 2011.
- 497. Aslantas O, Ozdemir V, Kiliç S, Babür C.** Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniasis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology* 2005; **129**: 187-191.
- 498. Brethes B, Puech PL, Fraisse A, Dubois P, Domenech J, Bourdin P, Moreau JP, Capdevielle P, Dessouter D, Lambert M.** Leptospirosis and environment. Study of 2 major foci in New Caledonia [in French]. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 1988; **36**: 436-442.
- 499. Jimenez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil JC, Ortega-Pacheco A.** Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. *Acta Tropica* 2008; **106**: 22-26.
- 500. Adesiyun AA, Hull-jackson C, Mootoo N, Halsall S, Bennett R, Clarke N, Whittington RCU, Seepersadsingh N.** Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. *Journal of Veterinary Medicine B* 2006; **53**: 91-99.

- 501. Everard CO, Cazabon EP, Dreesen DW, Sulzer CR.** Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad: West Indies. *International Journal of Zoonoses* 1979; **6**: 33-40.
- 502. Millan J, Candela MG, Lopez-Bao JV, Pereira M, Jimenez MA, Leon-Vizcaino L.** Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; **9**: 549-554.
- 503. Glass GE, Gardner-Santana LC, Holt RD, Chen J, Shields TM, Roy M, Schachterle S, Klein SL.** Trophic garnishes: cat-rat interactions in an urban environment. *PLoS ONE* 2009; **4**: e5794.
- 504. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM.** Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; **222**: 1230-1233.
- 505. Raghavan R, Brenner K, Higgins J, Van der Merwe D, Harkin KR.** Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Preventive Veterinary Medicine* 2011; **101**: 241-249.
- 506. Ward MP, Guptill LF, Wu CC.** Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2004; **225**: 72-77.
- 507. Ryu E.** An investigation of canine antileptospiral antibodies in Japan. *International Journal of Zoonoses* 1975; **2**: 16-34.
- 508. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Brief report: Leptospirosis after flooding of a university campus--Hawaii, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2006; **55**: 125-127.
- 509. Liverpool J, Francis S, Liverpool CE, Dean GT, Mendez DD.** Leptospirosis: case reports of an outbreak in Guyana. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2008; **102**: 239-245.
- 510. Talpada MD, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM.** Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implication for transmission to humans. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2003; **3**: 141-147.
- 511. Szyfres B.** Leptospirosis as an animal and public health problem in latin America and the Caribbean area. *PAHO Bulletin* 1976; **10**: 110-125.
- 512. Katz AR, Manea SJ, Sasaki DM.** Leptospirosis on Kauai: investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health* 1991; **81**: 1310-1312.
- 513. Martins G, Penna B, Lilenbaum W.** Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. *Veterinary Record* 2010; **167**: 629-630.
- 514. Leon LL, Garcia RC, Diaz CO, Valdez RB, Carmona GCA, Velazquez BLG.** Prevalence of leptospirosis in dairy cattle from small rural production units in Toluca Valley, state of Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; **1149**: 292-295.
- 515. Jimenez-Coello M, Ortega-Pacheco A, Guzman-Marin E, Guiris-Andrade DM, Martinez-Figueroa L, Acosta-Viana KY.** Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in Southern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; **10**: 135-141.
- 516. Thompson JA, de Miranda Henriques Leite R, Gonçalves VSP, Leite RC, Bandeira DA, Herrmann GP, Moreira ÉC, Prado PEF, Lobato ZIP, de Brito CPT, Lage AP.** Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine* 2006; **76**: 290-301.
- 517. Hadad E, Pirogovsky A, Bartal C, Gilad J, Barnea A, Yitzhaki S, Grotto I, Balicer RD, Schwartz E.** An outbreak of leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; **74**: 127-131.
- 518. Belmaker I, Alkan M, Barnea A, Dukhan L, Yitzhaki S, Gross E.** Risk of transmission of leptospirosis from infected cattle to dairy workers in Southern Israel. *Israel Medical Association Journal* 2004; **6**: 24-27.
- 519. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Corney BG, Smythe LD.** Epidemiology of *Leptospira weilii* serovar Topaz infections in Australia. *Communicable Diseases Intelligence* 2007; **31**: 216-222.
- 520. Lage AP, Leite RMH, Thompson JA, Bandeira DA, Herrmann GP, Moreira EC, Gonçalves VSP.** Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraíba, Brazil. *Arquivos Do Instituto Biologico, São Paulo* 2007; **74**: 185-190.
- 521. Odontsetseg N, Sakoda Y, Kida H.** Serological evidence of the persistence of infection with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in cattle in Mongolia. *Microbiology and Immunology* 2005; **49**: 865-869.
- 522. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Jones RT, Cutler RS, Adler B.** Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar pomona slaughtered in abattoirs in Victoria, Australia. *Veterinary Microbiology* 1998; **62**: 235-242.
- 523. Oliveira AA, Mota RA, Pereira GC, Langoni H, Souza MI, Navegantes WA, Sa ME.** Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 2001; **68**: 275-279.
- 524. Shafiqhi T, Abdollahpour G, Zahraei Salehi T, Tadjbakhsh H.** Serological and bacteriological study of leptospirosis in slaughtered cattle in north of Iran (Rasht). *African Journal of Microbiological Research* 2010; **4**: 2118-2121.

- 525. Martins G, Penna B, Hamond C, Leite R, Silva A, Ferreira A, Brandao F, Oliveira F, Lilenbaum W.** Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2011.
- 526. Sattler N, Fecteau G, Couture Y, Tremblay A.** Evaluation des équilibres potassiques chez la vache laitière et étude de ses variations journalières et selon le stade de production. *Canadian Veterinary Journal* 2001; **42**: 107-115.
- 527. Prescott JF, Miller RB, Nicholson VM, Martin SW, Lesnick T.** Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1988; **52**: 210-215.
- 528. Martins G, Penna B, Lilenbaum W.** Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2011.
- 529. Tillard E.** Approche globale des facteurs associés à l'infertilité et l'infécondité chez la vache laitière: importance relative des facteurs nutritionnels et des troubles sanitaires dans les élevages de l'île de la Réunion: Montpellier II; 2007. 484 pp.
- 530. Vinodh R, Raj GD, Govindarajan R, Thiagarajan V.** Detection of *Leptospira* and *Brucella* genomes in bovine semen using polymerase chain reaction. *Tropical Animal Health and Production* 2008; **40**: 323-329.
- 531. Lilenbaum W, Varges R, Medeiros L, Cordeiro AG, Cavalcanti A, Souza GN, Richtzenhain LJ, Vasconcellos AS.** Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Research in Veterinary Science* 2008; **84**: 14-17.
- 532. Tripathy DN, Hanson LE, Mansfield ME, Thilsted JP.** Experimental infection of lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars pomona and hardjo. *American Journal of Veterinary Research* 1985; **46**: 2512-2514.
- 533. Tripathy DN, Hanson LE, Bedoya M, Mansfield ME.** Experimental infection of pregnant and lactating goats with *Leptospira interrogans* serovars hardjo and szwajizak. *American Journal of Veterinary Research* 1985; **46**: 2515-2518.
- 534. dos Santos J, Lima-Ribeiro A, Oliveira P, dos Santos M, Júnior Á, Medeiros A, Tavares T.** Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 2012; **44**: 101-106.
- 535. Levett PN, Whittington, C.U., Camus, E.** Serological survey of leptospirosis in livestock animals in the lesser Antilles. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996; **791**: 369-377.
- 536. Grant GH, Smith GCE, Schloss W.** Seroprevalence of leptospiral antibodies in the Jamaican livestock population. *Veterinary Record* 1988; **122**: 419-420.
- 537. Leon-Vizcaino L, Hermoso de Mendoza M, Garrido F.** Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 1987; **10**: 149-153.
- 538. Keenan J, Ervin G, Aung M, McGwin G, Jolly P.** Risk factors for clinical leptospirosis from Western Jamaica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **83**: 633-636.
- 539. Milner AR, Wilks CR, Spratt DM, Presidente PJ.** The prevalence of anti-leptospiral agglutinins in sera of wildlife in southeastern Australia. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 197-202.
- 540. Perez J, Goarant C.** Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiology* 2010; **10**: 325.
- 541. Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM, Smythe LD, Donht MF, Craig SB, Burns MA.** Serosurvey of leptospirosis and investigation of a possible novel serovar Arborea in farmed deer in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 2011; **59**: 139-142.
- 542. Ayanegui-Alcérreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, Heuer C, Midwinter AC, Castillo-Alcala F.** Regional seroprevalence of leptospirosis on deer farms in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 2010; **58**: 184-189.
- 543. Niwetpathomwat A, Luengyosluetchakul S, Geawduanglek S.** A serological investigation of leptospirosis in sows from central Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2006; **37**: 716-719.
- 544. Everard COR, Cawich F, Gamble PG, Everard JD.** Prevalence of leptospirosis in Belize. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; **82**: 495-499.
- 545. Bahaman AR, Ibrahim AL, Adam H.** Serological prevalence of leptospiral infection in domestic animals in West Malaysia. *Epidemiology and Infection* 1987; **99**: 379-392.
- 546. Boqvist S, Ho Thi VT, Magnusson U.** Annual variations in *Leptospira* seroprevalence among sows in southern Vietnam. *Tropical Animal Health and Production* 2005; **37**: 443-449.
- 547. Boqvist S, Montgomery JM, Hurst M, Thu HTV, Engvall EO, Gunnarsson A, Magnusson U.** *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Veterinary Microbiology* 2003; **93**: 361-368.
- 548. Vitale M, Vitale F, Di Marco V, Currò V, Vesco G, Caracappa S.** Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2005; **57**: 25-27.

- 549. Berlioz-Arthaud A, Guillard B, Goarant C, Hem S.** Hospital-based active surveillance of human leptospirosis in Cambodia [in French]. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 2010; **103**: 111-118.
- 550. Van CT, Thuy NT, San NH, Hien TT, Baranton G, Perolat P.** Human leptospirosis in the Mekong delta, Viet Nam. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1998; **92**: 625-628.
- 551. Alexander AD, Smith DJ.** *Leptospira robinsoni*, a new serotype of the pyrogenes serogroup. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 1962; **40**: 81-84.
- 552. Roth EE, Adams MW, Greer B, Sanford GE, Moore M, Newman K.** New leptospiral serotype in the pyrogenes serogroup. *Public Health Reports* 1963; **78**: 727-730.
- 553. Feresu SB, Bolin CA, Korver H, Terpstra WJ.** Classification of leptospire of the Pyrogenes serogroup isolated from cattle in Zimbabwe by cross-agglutinin absorption and restriction fragment length polymorphism analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; **44**: 541-546.
- 554. McClintock CS, McGowan MR, Corney BG, Colley J, Smythe L, Dohnt M, Woodrow M.** Isolation of *Leptospira interrogans* serovars hardjo and zanoi from a dairy herd in north Queensland. *Australian Veterinary Journal* 1993; **70**: 393-394.
- 555. Emanuel ML, Mackerras IM, Smith DJW.** The epidemiology of leptospirosis in North Queensland. I. General survey of animal hosts. *Journal of Hygiene, Cambridge* 1964; **62**: 451-484.
- 556. Myburgh JG, Posnett SJ, Lawrence JV.** Serological survey for canine leptospirosis in the Pretoria area. *Journal of the South African Veterinary Association* 1993; **64**: 37-38.
- 557. Cisneros Puebla MA, Moles Cervantes LP, Rosas DG, Serranía NR, Torres Barranca JI.** Diagnostic serology of swine leptospirosis in Mexico 1995-2000 [in Spanish]. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2002; **54**: 28-31.
- 558. Rocha T.** A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* 1998; **17**: 699-712.
- 559. Vashi N, A., Reddy P, Wayne D, B., Sabin B.** Bat-associated leptospirosis. *Journal of General Internal Medicine* 2010; **25**: 162-164.
- 560. Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM.** Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **63**: 255-258.
- 561. Matthias MA, Diaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, Pacheco V, Gotuzzo E, Gilman RH, Vinetz JM.** Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **73**: 964-974.
- 562. Lourdault K, Aviat F, Picardeau M.** Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology* 2009; **58**: 648-655.
- 563. Pereira MM, Da Silva JJP, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, Lenzi HL, Marchevsky RS.** Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **72**: 13-20.
- 564. Bonilla-Santiago R, Nally JE.** Rat model of chronic leptospirosis. *Current Protocols in Microbiology* 2011; **Chapter 12**: 12E.13.
- 565. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Mañé MC.** Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting of the urinary proteins. *Journal of Comparative Pathology* 2003; **129**: 169-178.
- 566. Jauréguiberry S, Roussel M, Brinchault-Rabin G, Gacouin A, Le Meur A, Arvieux C, Michelet C, Tattevin P.** Clinical presentation of leptospirosis: a retrospective study of 34 patients admitted to a single institution in metropolitan France. *Clinical Microbiology and Infection* 2005; **11**: 391-394.
- 567. Daher EDF, Abreu KLSd, Silva Junior GBd.** Leptospirosis-associated acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2010; **32**: 408-415.
- 568. Tucunduva de Faria M, Athanazio DA, Gonçalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, Ko AI.** Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *Journal of Comparative Pathology* 2007; **137**: 231-238.
- 569. Lefèvre A, Adler H, Lieber CS.** Effect of ethanol on ketone metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 1970; **49**: 1775-1782.
- 570. Monahan AM, Miller, I. S., Nally, J. E.** Leptospirosis: risks during recreational activities. *Journal of Applied Microbiology* 2009; **107**: 707-716.
- 571. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C.** Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011; **5**: e1361.
- 572. Hathaway SC, Blackmore DK, Marshall RB.** Leptospirosis in free-living species in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases* 1981; **17**: 489-496.

- 573. Gorresen PM, Willig MR.** Population and community-level responses of phyllostomid bats to landscape structure: the importance of scale. *Journal of Mammalogy* 2004; **85**: 688-697.
- 574. Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT, ten Have J, Donnellan SC, Austin J, Frost A, Gonzalez JP, Herbreteau V, Catzeffis F, Soubrier J, Fang Y-P, Robins J, Matisoo-Smith E, Bastos ADS, Maryanto I, Sinaga MH, Denys C, Van Den Bussche RA, Conroy C, Rowe K, Cooper A.** Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26357.
- 575. Luniak M.** *Synurbization - adaptation of animal wildlife to urban development*. In: Shaw W, Harris LK, Vandruuff L, eds. *Proceedings 4th International Urban Wildlife Symposium*. Tucson (Arizona), 2004: 50-55.
- 576. Tarnaud L, Simmen B.** A major increase in the population of brown lemurs on Mayotte since the decline reported in 1987. *Oryx* 2002; **36**: 297-300.
- 577. Tonnabel J, Tattersall I, Simmen B, Tarnaud L.** Decline and demographic changes in the population of the Near Threatened brown lemur *Eulemur fulvus* on Mayotte. *Oryx* 2011; **45**: 608-614.
- 578. Smythe LD, Field HE, Barnett LJ, Smith CS, Dohnt MF, Symonds ML, Moore MR, Rolfe PF.** Leptospiral antibodies in flying foxes in Australia. *Journal of Wildlife Diseases* 2002; **38**: 182-186.
- 579. O'Brien J.** Bats of the Western Indian Ocean Islands. *Animals* 2011; **1**: 259-290.
- 580. Tulsiani SM, Cobbold RN, Graham GC, Dohnt MF, Burns M-A, Leung LK-P, Field HE, Smythe LD, Craig SB.** The role of fruit bats in the transmission of pathogenic leptospires in Australia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2011; **105**: 71-84.
- 581. Shi Z.** Bat and virus. *Protein & Cell* 2010; **1**: 109-114.
- 582. Omatsu T, Watanabe S, Akashi H, Yoshikawa Y.** Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2007; **30**: 357-374.
- 583. Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez J-P, Swanepoel R.** Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 2005; **438**: 575-576.
- 584. Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, Epstein JH, Rahman SA, Hughes T, Smith C, Field HE, Daszak P, Group HER.** Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **85**: 946-951.
- 585. Baulu J, Everard CO, Everard JD.** Leptospires in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops* Sabaeus) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 1987; **23**: 60-66.
- 586. Pinna MH, Martins G, Pinheiro ACO, Almeida DS, Oriá AP, Lilenbaum W.** Detection of anti-Leptospira antibodies in captive nonhuman primates from Salvador, Brazil. *American Journal of Primatology* 2012; **74**: 8-11.
- 587. Perolat P, Poingt J-P, Vie J-C, Jouaneau C, Baranton G, Gysin J.** Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; **46**: 538-545.
- 588. Lilenbaum W, Varges R, Moraes IA, Ferreira AMR, Pissinatti A.** Leptospiral antibodies in captive lions tamarins (*Leontopithecus* sp) in Brazil. *Veterinary Journal* 2005; **169**: 462-464.
- 589. Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI.** An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *The Veterinary Journal* 2011; **188**: 237-239.
- 590. Minette HP, Shaffer MF.** Experimental leptospirosis in monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1968; **17**: 202-212.
- 591. Sigaud MA.** Bilan sanitaire et épidémiologique d'une population semi-captive de lémurs bruns (*Eulemur fulvus*) sur l'îlot M'Bouzi (Mayotte) [thesis]. Paris: Faculté de Médecine de Créteil; 2007. 142 pp.
- 592. Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H.** Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 2009; **58**: 1227-1230.
- 593. Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H.** First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. *Microbiology and Immunology* 2006; **50**: 429-434.
- 594. Scialfa E, Bolpe J, Bardón JC, Ridao G, Gentile J, Gallicchio O.** Isolation of *Leptospira interrogans* from suburban rats in Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; **42**: 126-128.
- 595. Bhardwaj P, Kosambiya J, Desai V.** A case control study to explore the risk factors for acquisition of leptospirosis in Surat city, after flood. *Indian Journal of Medical Sciences* 2008; **62**: 431-438.
- 596. de Figueiredo CM, Mourão AC, de Oliveira MA, Alves WR, Ooteman MC, Chamone CB, Koury MC.** Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach [in Portuguese]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2001; **34**: 331-338.
- 597. Murray CK, Gray MR, Mende K, Parker TM, Samir A, Rahman BA, Habashy EE, Hospenthal DR, Pimentel G.** Use of patient-specific *Leptospira* isolates in the diagnosis of leptospirosis employing microscopic

- agglutination testing (MAT). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **105**: 209-213.
- 598. Everard COR, Bennett S.** Persistence of leptospiral agglutinins in Trinidadian survey subjects. *European Journal of Epidemiology* 1990; **6**: 40-44.
- 599. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF.** Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; **25**: 426-432.
- 600. Richardson GF SE, MacAulay EB.** Serological survey of four *Leptospira* serovars in dairy cows on Prince Edward Island. *Canadian Veterinary Journal* 1995; **36**: 769-770.
- 601. Barmettler R, Schweighauser A, Bigler S, Grooters AM, Francey T.** Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2011; **238**: 183-188.
- 602. Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayaki K, Raja SSS, Ratnam S.** Human leptospirosis in Erode, South India: serology, isolation, and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2004; **57**: 193-197.
- 603. Aguirre AA, Keefe TJ, Reif JS, Kashinsky L, Yochem PK, Saliki JT, Stott JL, Goldstein T, Dubey JP, Braun R, Antonelis G.** Infectious disease monitoring of the endangered hawaiian monk seal. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **43**: 229-241.
- 604. Thurmond MC, Picanso JP, Hietala SK.** Prospective serology and analysis in diagnosis of dairy cow abortion. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1990; **2**: 274-282.
- 605. Galton MM.** Methods in the laboratory diagnosis of leptospirosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1962; **98**: 675-685.
- 606. de Azevedo SS, Alves CJ, de Andrade JSL, dos Santos FA, Freitas TD, de S.A. Batista C.** Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. *Arquivos Do Instituto Biologico, São Paulo* 2004; **71**: 383-385.
- 607. Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, Michault A.** Seroprevalence of human leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) assessed by microscopic agglutination test on paper disc-absorbed whole blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; **85**: 1097-1099.
- 608. Kingscote BF.** Leptospirosis survey in a white-tailed deer herd in Ontario: comparative use of fluid and paper disc-absorbed blood. *Journal of Wildlife Diseases* 1969; **5**: 68-72.
- 609. Fenollar F, Raoult D.** Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999; **6**: 483-488.
- 610. Ferraz A, Belo E, Coutinho L, Oliveira A, Carmo A, Franco D, Ferreira T, Yto A, Machado M, Scola M, De Gaspari E.** Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in *Neisseria meningitidis* serotyping by Dot-blot ELISA. *BMC Infectious Diseases* 2008; **8**: 30.
- 611. Handali S, Rodriguez S, Noh J, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, Roberts JM, Hancock K, Tsang VCW.** A simple method for collecting measured whole blood with quantitative recovery of antibody activities for serological surveys. *Journal of Immunological Methods* 2007; **320**: 164-171.
- 612. Demeke T, Jenkins G.** Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; **396**: 1977-1990.
- 613. Cheke A, Hume J.** *Lost Land of the Dodo*. London: T & AD Poyser and A&C Black Publishers, 2008: 480 pp.
- 614. Probst JM, Brial P.** *Récits anciens de naturalistes à l'île Bourbon. Le 1^{er} guide des espèces disparues de La Réunion (Reptiles, Oiseaux et Mammifères)*. Association Nature & Patrimoine ed. Le Port (La Réunion), 2002: 109 pp.
- 615. Licerias de Hidalgo J, Sulzer KR.** Six new leptospiral serovars isolated from wild animals in Peru. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; **19**: 944-945.
- 616. Mgone GF, Machang'u RS, Goris MGA, Engelbert M, Sondji S, Hartskeerl RA.** New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; **56**: 593-597.
- 617. Jones CJ, Sulzer KR, Everard CO, Vaughn AW, Innis VA.** Bim, a new serovar of *Leptospira interrogans* isolated from a dog in Barbados. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; **19**: 946.
- 618. Feresu SB.** Isolation of *Leptospira interrogans* from kidneys of Zimbabwe beef cattle. *Veterinary Record* 1992; **130**: 446-448.
- 619. Feresu SB, Bolin A, Van de Kemp H, Korver H.** Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1999; **289**: 19-29.
- 620. Feresu SB, Bolin CA, Korver H.** A new leptospiral serovar, ngavi, in the Tarassovi serogroup isolated from Zimbabwe oxen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1998; **48**: 207-213.

- 621. Dikken H, Timmer VEA, Njenga R.** Three new leptospiral serovars from Kenya. *Tropical and Geographical Medicine* 1981; **33**: 343-346.
- 622. Abdelkrim J, Pascal M, Samadi S.** Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology* 2005; **14**: 2923-2931.
- 623. Weinstein P, Judge D, Carver S.** Biological and cultural coevolution and emerging infectious disease: Ross River virus in Australia. *Medical Hypotheses* 2011; **76**: 893-896.
- 624. Woolhouse MEJ, Webster JP, Domingo E, Charlesworth B, Levin BR.** Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 2002; **32**: 569-577.
- 625. Kurtenbach K, Hanincová Kr, Tsao JI, Margos G, Fish D, Ogden NH.** Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nat Rev Micro* 2006; **4**: 660-669.
- 626. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J-P.** An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunological Reviews* 2011; **240**: 211-234.
- 627. Shames SR, Auweter SD, Finlay BB.** Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; **41**: 380-389.
- 628. Barreiro LB, Quintana-Murci L.** From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nature Reviews Genetics* 2010; **11**: 17-30.
- 629. Thomson EC, Smith JA, Klenerman P.** The natural history of early hepatitis C virus evolution; lessons from a global outbreak in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Journal of General Virology* 2011; **92**: 2227-2236.
- 630. Waller AS, Paillot R, Timoney JF.** *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *Journal of Medical Microbiology* 2011; **60**: 1231-1240.
- 631. Kilpatrick AM.** Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* 2011; **334**: 323-327.
- 632. Quintana-Murci L, Alcaïs A, Abel L, Casanova J-L.** Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nature Immunology* 2007; **8**: 1165-1171.
- 633. Quintana-Murci L, Barreiro LB.** The role played by natural selection on Mendelian traits in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; **1214**: 1-17.
- 634. Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L.** Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annual Review of Immunology* 2011; **29**: 447-491.
- 635. Levene H.** Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *American Naturalist* 1953; **87**: 331-333.
- 636. Barcellos C, Lammerhirt CB, de Almeida MAB, dos Santos E.** Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. *Cadernos de Saúde Pública* 2003; **19**: 1283-1292.
- 637. Soares TSM, Latorre MdRrDdO, Laporta GZ, Buzzar MR.** Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. *Revista de Saude Publica* 2010; **44**: 283-291.
- 638. Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC.** Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects [in Portuguese]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; **34**: 261-267.
- 639. Romero EC, Bernardo CC, Yasuda PH.** Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2003; **45**: 245-248.
- 640. Henry RA, Johnson RC.** Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology* 1978; **35**: 492-499.
- 641. Viau EJ, Boehm AB.** Quantitative PCR-based detection of pathogenic *Leptospira* in Hawai'ian coastal streams. *Journal of Water and Health* 2011; **9**: 637-346.
- 642. Schmidt DR, Winn RE, Keefe TJ.** Leptospirosis. Epidemiological features of a sporadic case. *Archives of Internal Medicine* 1989; **149**: 1878-1880.
- 643. Prescott J.** Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Veterinary Record* 2011; **169**: 187-188.
- 644. Vincent C, Munger C, Labrecque O, Lévesque IJ, Desjardins F.** La leptospirose : cas de transmission d'un chien à un humain. *Raizo, bulletin zoosanitaire* 2007; **51**: 5.
- 645. Jansen A, Schneider T.** Weil's disease in a rat owner. *Lancet Infectious Diseases* 2011; **11**: 152.
- 646. Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, Bolin CA.** Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2007; **230**: 1657-1664.
- 647. Barr SC, McDonough PL, Scipioni-Ball RL, Starr JK.** Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *American Journal of Veterinary Research* 2005; **66**: 1780-1784.
- 648. Brem S, Kopp H, Meyer P.** *Leptospira* antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988 [in German]. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift* 1990; **103**: 6-8.

- 649. Hartman EG.** Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 1984; **258**: 350-359.
- 650. Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM.** Vaccination for leptospirosis improved the weaning percentage of 2-year-old farmed red deer hinds in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 2011; **59**: 191-196.
- 651. Menges RW.** Control of leptospirosis in man and animals. *Public Health Reports* 1959; **74**: 149-152.
- 652. Alexopoulos C, Fthenakis GC, Burriel A, Bourtzi-Hatzopoulou E, Kritas SK, Sbiraki A, Kyriakis SC.** The effects of the periodical use of in-feed chlortetracycline on the reproductive performance of gilts and sows of a commercial pig farm with a history of clinical and subclinical viral and bacterial infections. *Reproduction in Domestic Animals* 2003; **38**: 187-192.
- 653. Ellis WA, Songer JG, Montgomery J, Cassels JA.** Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. *Veterinary Record* 1986; **118**: 11-13.
- 654. Ellis WA, Cassels JA, Doyle J.** Genital leptospirosis in bulls. *Veterinary Record* 1986; **118**: 333.
- 655. Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L.** Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence [in German]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2011; **124**: 345-359.
- 656. Masri SA, Nguyen PT, Gale PS, Hoxard CJ, Jung S-C.** A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1997; **61**: 15-20.
- 657. Althouse GC, Rossow K.** The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reproduction in Domestic Animals* 2011; **46**: 64-67.
- 658. Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Van Soom A.** Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology* 2008; **70**: 1337-1345.
- 659. Hunter P, van der Vyver FH, Selmer-Olsen A, Henton MM, Herr S, de Lange JF.** Leptospirosis as a cause of "white spot" kidney in South African pig abattoirs. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1987; **54**: 59-62.
- 660. Wang QK, Zhang JG, Du R, Wang SZ, Wilson P.** Observations of renal histopathology associated with leptospirosis in farmed deer. *Journal of Jilin Agricultural University* 1999; **21**: 63-65.
- 661. Uzal FA, Dobrenov B, Smythe L, Norris M, Dohnt M, Symonds M, O'Boyle D, Schouten F, Kelly WR.** A study of "white spotted kidneys" in cattle. *Veterinary Microbiology* 2002; **86**: 369-375.
- 662. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, Mead LJ, Jones RT, Adler B.** Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 1992; **30**: 151-163.
- 663. Delbem ACB, de Freitas JC, Bracarense APFRL, Müller EE, de Oliveira RC.** Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; **33**: 174-177.
- 664. Martinez J, Segales J, Aduriz G, Atxaerandio R, Jaro P, Ortega J, Peris B, Corpa JM.** Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. *Research in Veterinary Science* 2006; **81**: 92-98.
- 665. Souza VM, Arsky MD, Castro AP, Araujo WN.** Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil [in Portuguese]. *Revista de Saude Publica* 2011; **45**: 1001-1008.
- 666. Grollier B, Soufflet O.** Lutter contre les ravageurs. *Caro Canne* 2011; **25**.
- 667. Wang Z, Jin L, Wegrzyn A.** Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories* 2007; **6**: 39.
- 668. Davis S, Calvet E, Leirs H.** Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2005; **5**: 305-314.
- 669. Thornley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW.** Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiology and Infection* 2002; **128**: 29-36.
- 670. Pavan ME, Brihuega B, Pettinari MJ, Cairo F.** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia* 2011; **43**: 251-255.
- 671. Parker J, Walker M.** Survival of a pathogenic *Leptospira* serovar in response to combined in vitro pH and temperature stresses. *Veterinary Microbiology* 2011; **152**: 146-150.
- 672. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Smythe L.** An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *Journal of Medical Microbiology* 2006; **55**: 1549-1557.
- 673. Vijayachari P, Ahmed A, Sugunan AP, Ghousunnissa S, Rao KR, Hasnain SE, Sehgal SC.** Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**: 3575-3580.
- 674. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Craig SB, Smythe LD.** Molecular epidemiology of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea, Queensland, Australia, 1998-2005. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **83**: 820-821.

- 675. Corney BG, Colley J, Djordjevic SP, Whittington R, Graham GC.** Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; **31**: 2927-2932.
- 676. Ramadass P, Meerarani S, Venkatesha MD, Senthilkumar TMA, Nachimuthu K.** Characterization of leptospiral serovars by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; **47**: 575-576.
- 677. Galloway RL, Levett PN.** Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; **4**: e824.
- 678. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL.** Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 2009; **48**: 623-627.
- 679. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I.** Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; **30**: 1696-1702.
- 680. Pavan ME, Cairo F, Brihuega B, Samartino L.** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Leptospira interrogans* serovar pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2008; **31**: 37-45.
- 681. Cerqueira GM, McBride AJA, Hartskeerl RA, Ahmed N, Dellagostin OA, Eslabao MR, Nascimento ALTO.** Bioinformatics describes novel loci for high resolution discrimination of *Leptospira* isolates. *PLoS ONE* 2010; **5**: e15335.
- 682. Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, Hartskeerl RA.** Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS ONE* 2008; **3**: e2752.
- 683. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG.** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; **95**: 3140-3145.
- 684. Nicolas L, Milon G, Prina E.** Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods* 2002; **51**: 295-299.
- 685. Gundry C, N., Vandersteen J, G., Reed G, H., Pryor R, J., Chen J, Wittwer C, T.** Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 2003; **49**: 396-406.
- 686. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ.** High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 2003; **49**: 853-860.
- 687. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C.** Genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Clinical Chemistry* 2004; **50**: 1156-1164.
- 688. Tulsiani SM, Craig SB, Graham GC, Cobbold RC, Dohnt MF, Burns M-A, Leung LKP, Field HE, Smythe LD.** High-resolution melt-curve analysis of random-amplified polymorphic-DNA markers, for the characterisation of pathogenic *Leptospira*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2010; **104**: 151-161.
- 689. Tollenaere C, Duplantier JM, Rahalison L, Ranjalaly M, Brouat C.** AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) from Madagascar: detecting genetic markers undergoing plague-mediated selection. *Molecular Ecology* 2011; **20**: 1026-1038.
- 690. Male D.** *Immunologie. Aide-mémoire illustré.* Traduction de la 3ème édition anglaise, Paul Fonteneau ed. Paris, Bruxelles: DeBoeck Université, 1998: 129 pp.
- 691. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry N, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M.** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; **13**: 1-46.

ANNEXES

Annexe A : Taxonomie des animaux étudiés à La Réunion et à Mayotte.

Annexe B : Photographies des espèces sauvages étudiées dans nos travaux de recherche.

Annexe C : Autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins scientifiques de *Mormopterus francoismoutoui*.

Annexe D : Autorisation de capture et de prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée.

Annexe E : Arrêté n°029/DAF/def/2007 portant autorisation de capture, manipulation, de prélèvement et d'exportation de tout ou partie de spécimens d'espèces animales protégées à des fins scientifiques sur le territoire de la Collectivité Départementale de Mayotte.

Annexe F : Arrêté n°005/CAB/2007 portant régulation administrative des populations de chiens errants à Mayotte.

Annexe G : Certificats CITES d'autorisation d'exportation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.

Annexe H : Certificats CITES d'autorisation d'importation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.

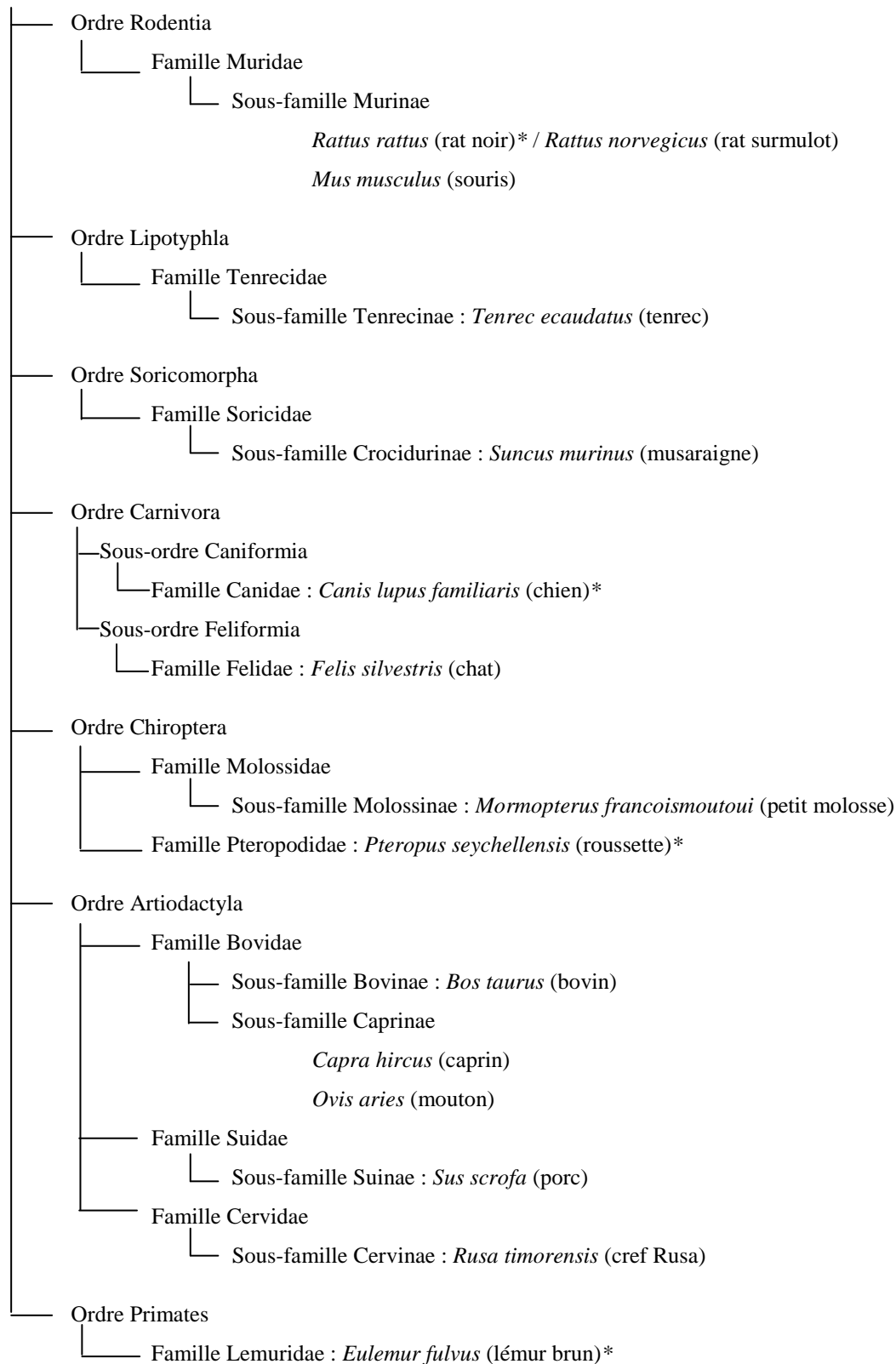
Annexe I : Animaux de La Réunion - Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

Annexe J : Animaux de Mayotte - Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

Annexe K : Article - Le tanrec (*Tenrec ecaudatus*) réservoir animal de leptospires ?

Annexe A : Taxonomie des animaux étudiés à La Réunion et à Mayotte.

Classe Mammalia



* Espèces échantillonnées à Mayotte.

Annexe B : Espèces sauvages étudiées dans nos travaux de recherche.



Rattus rattus capturé dans un piège Manufrance®.



Suncus murinus.



Tenrec ecaudatus.



Photographie S. Caceres (ONCFS), La Réunion 2008

Mormopterus francoismoutoui (capture au filet, 2009).



Eulemur fulvus.



Photographie © Punelle, Mayotte 2007

Pteropus seychellensis.

Annexe C : Autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins scientifiques de *Mormopterus francoismoutoui*.



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

PRÉFECTURE DE LA RÉUNION

Direction Régionale
de l'Environnement

LA REUNION

*Autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins scientifiques de *Mormopterus francoismoutoui*.*

Le Préfet de la Réunion
Officier de la Légion d'Honneur

VU le Code de l'Environnement - livre IV – titre 1^{er} notamment ;

VU les décrets n° 97-34 du 15 janvier 1997 et 97-1206 du 19 décembre 1997 relatifs à la déconcentration des décisions administratives individuelles ;

VU les décrets n° 97-1204 du 19 décembre 1997 et 99-251 du 31 mars 1999 pris pour l'application de l'article 2-1 du décret du 15 janvier 1997 concernant les décisions administratives relevant du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement ;

VU l'arrêté du 22 décembre 1999 fixant les conditions de demande et d'instruction des autorisations exceptionnelles d'activités portant sur des spécimens d'espèces protégées ;

VU l'arrêté du 17 février 1989 fixant la liste des espèces animales protégées dans le département de la Réunion ;

VU l'arrêté préfectoral n° 0089 du 10 janvier 2008 portant délégation de signature à M. Bertrand GALTIER, Directeur Régional de l'Environnement;

VU la demande de dérogation pour une autorisation de capture temporaire avec relâcher sur place à des fins scientifiques de spécimens de *Mormopterus francoismoutoui* (petit molosse) présentée par le Centre de recherche et de veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), en date du 5 décembre 2008;

VU l'avis de l'expert délégué du Conseil National de la Protection de la Nature du 24 février 2009 ;

SUR proposition du Directeur Régional de l'Environnement;

.../...

DECIDE :

ARTICLE 1 – OBJET DE L'AUTORISATION

Le CRVOI est autorisé à procéder à la capture temporaire avec relâcher sur place de spécimens de *Mormopterus francoimoutoui*, à des fins d'inventaire des pathogènes de la faune sauvage et d'identification de réservoirs animaux, et d'étude de la diversité, de l'écologie et de l'épidémiologie des leptospires pathogènes dans la région Océan Indien, selon les modalités présentées dans le dossier de demande; cette capture temporaire s'accompagnera en particulier d'un prélèvement sanguin.

ARTICLE 2 – CONDITIONS

L'autorisation est donnée pour la capture au filet de 100 spécimens au maximum, sur les territoires communaux de Trois-Bassins, la Possession, Saint-Philippe; l'opération sera dirigée par Melle Amélie DEVARS, vétérinaire au CRVOI, assistée de M. Jean-Michel PROBST, écologue au Parc National de la Réunion.

ARTICLE 2 – DUREE DE L'AUTORISATION

Cette autorisation est valable jusqu'au 31 décembre 2010; les dates précises des opérations seront communiquées préalablement à leur réalisation à la DIREN.

ARTICLE 3 - COMPTE RENDU D'EXECUTION

Un compte rendu des opérations de capture sera fourni à la DIREN annuellement, et un rapport final sur les résultats obtenus et les connaissances acquises lui sera adressé à la fin de l'opération.

ARTICLE 4 – DELAIS DE RECOURS

La présente décision ne peut être déférée qu'au Tribunal Administratif de SAINT-DENIS de la REUNION.

Le délai de recours est de deux (2) mois pour le pétitionnaire. Ce délai commence à courir le jour où cette décision lui a été notifiée.

ARTICLE 5 – EXECUTION

Le Directeur Régional de l'Environnement est chargé de l'exécution de la présente décision qui sera notifiée au pétitionnaire.

La présente autorisation sera publiée au recueil des actes administratifs de la Préfecture de la Réunion.

Fait à Saint-Denis, le 10 MARS 2009

Le Préfet,
Pour le Préfet et par délégation,
Le Directeur Régional de l'Environnement

Bertrand GALTIER

Annexe D : Autorisation de capture et de prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée.



PREFECTURE DE LA REUNION

Pôle Économie Agricole et
Monde Rural

Direction de l'agriculture
et de la forêt de La Réunion

Service Aménagement du
Territoire et Environnement
UENA

Dossier suivi par : Bruno DEBENAY

Tél. : 02 62 30 89 78
Fax : 02 62 30 89 88

Réf. : BD/BS n° 012

Monsieur le DIRECTEUR du CENTRE
de RECHERCHE et de VEILLE sur les MALADIES
EMERGENTES dans l'OCEAN INDIEN (CRVOI)
2, Rue Maxime Rivière
97490 SAINTE-CLOTILDE

A l'attention d'Amélie DESVARS.

Courriel : bruno.debenay@agriculture.gouv.fr

Objet : **Autorisation de capture et de prélèvement dans le milieu naturel
d'animaux vivants d'espèces dont la chasse est autorisée (Art. L.
424-11 du CE et Arrêté du 07 Juillet 2006).**

Viréf. : Votre lettre de demande du 02 Décembre 2008.

Saint-Denis, le 13 JAN. 2009

AUTORISATION
de capture et de prélèvement à des fins scientifiques
de spécimens de tangués (*Tenrec ecaudatus*) à la Réunion.

Suite à l'instruction de votre demande du **02 Décembre 2008** et à l'accord de la Fédération des Chasseurs de la Réunion, l'autorisation de capture et de prélèvement à des fins scientifiques de spécimens de tangués (*Tenrec ecaudatus*), selon l'article L. 424-11 du Code de l'Environnement et l'arrêté du 07 Juillet 2006 modifié portant sur le prélèvement dans le milieu naturel d'animaux vivants dont la chasse est autorisée, est délivrée à :

Identification du destinataire :

Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes dans l'Océan Indien (CRVOI) représenté par son Directeur, Monsieur Koussay DELLAGI – 2, Rue Maxime Rivière – 97490 SAINTE-CLOTILDE.

Nombre d'animaux :

Capture manuelle de 100 spécimens de tangués (*Tenrec ecaudatus*) vivants faisant partie des espèces gibier dont la chasse est autorisée dans le département de la Réunion (AM du 25 Juillet 1991).

Finalité du prélèvement :

Procéder dans le cadre d'une thèse de Doctorat Universitaire (*Université de la Réunion*) sur le site de capture à des prélèvements sanguins et d'organes (*reins*) de chaque animal pour analyse afin d'étudier et compléter les données préliminaires obtenues sur les tangués en 2007 et l'éventuel rôle de réservoir de leptospirose que pourrait jouer cette espèce (cf. note n° 3219, « *Le tanrec : réservoir animal de leptospires ?* », *Bulletin Soc. Pathol. Exot.*, 2008, « *Epidémiologie* »).

.../

DIRECTION DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET – BOULEVARD DE LA PROVIDENCE – 97489 SAINT-DENIS CEDEX
Tél. : 02.62.30 89 89 – Fax. : 02.62.30 89 99

S:\environnement\CHASSE\chasse-prerelevement\LL_CRVOI-prerelevement-lang.odt

- Recherche d'acide nucléique viral et bactérien sur le sérum et les organes (PCR) ;
- Recherche d'anticorps anti-leptospires (MAT).

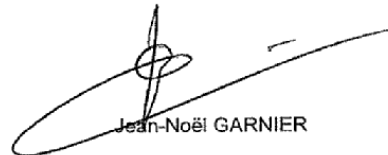
□ **Période et lieu de la capture :**

Réalisation des captures à partir de la date d'ouverture de la saison de chasse au tangué à la Réunion jusqu'à la date de fermeture, soit du **15 Février 2009 au 15 Avril 2009** (cf. AP n° 1268 du 30 Mai 2008). Les captures seront réalisées dans le milieu naturel sur tout le territoire réunionnais.

□ **Modalités techniques :**

Amélie DESVARS, vétérinaire doctorante, se chargera des prélèvements sur le terrain avec la collaboration de la Brigade Nature de l'Océan Indien et après l'accord de l'ONCFS et de la Fédération des Chasseurs de la Réunion (conduite des prélèvements en période autorisée de chasse).

Pour le directeur
de l'agriculture et de la forêt
et par délégation
Le Chef du S.A.T.E.,



Jean-Noël GARNIER

Annexe E : Arrêté n°029/DAF/def/2007 portant autorisation de capture, manipulation, de prélèvement et d'exportation de tout ou partie de spécimens d'espèces animales protégées à des fins scientifiques sur le territoire de la Collectivité Départementale de Mayotte.

PREFECTURE DE MAYOTTE



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Liberté Egalité Fraternité

DIRECTION DE L'AGRICULTURE
ET DE LA FORÊT

ARRETE n° ^{56 f/} 029/DAF/2007

portant autorisation de capture, de manipulation,
de prélèvement et d'exportation de tout ou partie
de spécimens d'espèces animales protégées
à des fins scientifiques sur le territoire
de la Collectivité Départementale de Mayotte

**LE PREFET DE MAYOTTE
CHEVALIER DE LA LEGION D'HONNEUR**

- VU la loi n° 2001-616 du 11 juillet 2001 relative à Mayotte ;
- VU le décret n° 99-1021 du 13 avril 1999 relatif à la délégation des pouvoirs propres au Représentant du Gouvernement à Mayotte ;
- VU le décret du 1^{er} février 2007 du Président de la République, nommant Monsieur Vincent BOUVIER, Préfet de Mayotte ;
- VU l'arrêté du 1^{er} octobre 2004 de Monsieur le Ministre de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales et de Monsieur le Ministre de l'Ecologie et du Développement Durable portant nomination de Monsieur Wilfrid FOUSSE, ingénieur en chef du génie rural, des eaux et des forêts, en qualité de directeur du Service d'Etat de l'Agriculture à Mayotte ;
- VU l'arrêté n° 25 SG/MMC/2007 du 27 février 2007 portant délégation de signature à Monsieur Wilfrid FOUSSE ;
- VU l'arrêté du 29 avril 1994 portant création du service d'état de l'agriculture, de la forêt et de la pêche ;
- VU le Code de l'Environnement applicable à Mayotte, notamment l'article L.411-2 ;
- VU le décret n° 2003-768 du 1^{er} août 2003 relatif à la partie Réglementaire du livre II du Code Rural qui devient le Livre II (partie Réglementaire) du Code de l'Environnement ;
- VU l'arrêté du 22 décembre 1999 fixant les conditions de demande et d'instruction des autorisations exceptionnelles (d'opérations) portant sur des spécimens d'espèces protégées ;
- VU l'arrêté n° 347/DAF du 7 août 2000 fixant la liste des espèces animales terrestres (et tortues marines) protégées et les mesures de protection de ces espèces animales représentées dans la Collectivité Départementale de Mayotte complétant les listes nationales ;

Considérant le projet « CHIKANI » présenté le 15 février 2007 par Mademoiselle Amélie DESVARS, Responsable du projet à La Réunion, pour le compte de l'INRA, Unité d'Epidémiologie Animale, CIRAD 3P, 7 chemin Irat – Ligne Paradis 97410 St Pierre, La Réunion ;

SUR PROPOSITION DU DIRECTEUR DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET

ARRETE

- Article 1er** Les membres de la mission scientifique « CHIKANI » à Mayotte :
- Amélie DESVARS, chef de mission,
 - Thomas DUVAL,
 - et Clément PUNELLE,
- accompagnés de :
- Franck CHARLIER, Technicien de l'Environnement et représentant de l'ONCFS à Mayotte,
 - et Anthony GROLLEAU, Agent Technique de l'Environnement à l'ONCFS de Mayotte,
- sont autorisés, du 15 mars au 30 mai 2007 sur l'ensemble du territoire de Mayotte, à effectuer des captures, des manipulations et des prélèvements sanguins sur un maximum de 100 spécimens de chacune des espèces animales protégées suivantes :
- lémuriens bruns de Mayotte, appartenant à l'espèce *Eulemur fulvus mayottensis*,
 - tadarides, appartenant à l'espèce *Chaerephon pumila*,
 - et roussettes, appartenant à l'espèce *Pteropus seychellensis mayottensis*.
- Cette autorisation concerne également les agents de la Direction de l'Agriculture et de la Forêt les accompagnant.
- Article 2** Au début et à la fin de la mission, le chef de la mission en informera le chef du service environnement et forêt de la direction de l'agriculture et de la forêt. A l'issue de ses travaux, le chef de la mission s'engage à remettre à Monsieur le directeur de l'agriculture et de la forêt un rapport comportant notamment la liste des spécimens échantillonnés, leurs caractéristiques physiques et biométriques ainsi que les dates, lieux et modalités de capture. La présente autorisation devra être présentée à toute réquisition des agents chargés de la police de l'environnement, accompagnée des pièces d'identité des membres de la mission en cours.
- Article 3** La présente dérogation ne dispense pas les bénéficiaires des autorisations requises au titre de l'application de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction.
- Article 4** Le Secrétaire Général, le commandant de la compagnie de gendarmerie, le directeur de l'agriculture et de la forêt, le chef du service des douanes, le chef du service de la police, le représentant de l'ONCFS sont chargés, chacun en ce qui les concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs.

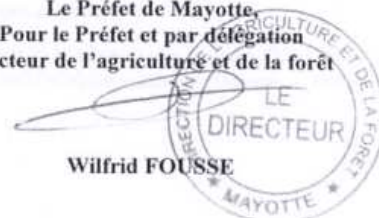
POUR INFORMATION

SGA1
 DAF1
 Aff. Mar.1
 Gendarmerie1
 Douanes1
 ONCFS.....1
 Préfecture : RAA.....1
 Archives.....2
 Chrono2
 Intéressés5

A Mamoudzou, le 6 avril 2007


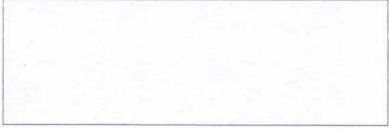

Le Préfet de Mayotte,
 Pour le Préfet et par délégation
 Le Directeur de l'agriculture et de la forêt

Wilfrid FOUSSE




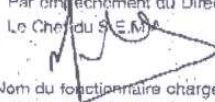
Annexe F : Certificats CITES d'autorisation d'exportation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.

COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE		cerfa N°10592*02													
Original	1 1. Exportateur/réexportateur ONCFS - BRIGADE NATURE DE MAYOTTE BP 67 97670 COCONI - MAYOTTE FRANCE	PERMIS/CERTIFICAT <input type="checkbox"/> IMPORTATION <input checked="" type="checkbox"/> EXPORTATION <input type="checkbox"/> RÉEXPORTATION	N° FR0797600003-E 2. Dernier jour de validité 16/10/2007												
	3. Importateur INRA Mademoiselle DESVARS Amélie CIRAD 3 P 7 Chemin de l'ira Ligne Paradis 97410 SAINT-PIERRE RÉUNION (ÎLE DE LA)	Convention sur le commerce international des espèces de flore et de faune sauvages menacées d'extinction													
	6. Emplacement autorisé des spécimens vivants des espèces inscrites à l'annexe A, prélevés dans leur milieu naturel	4. Pays (ré)exportateur FRANCE	5. Pays importateur RÉUNION (ÎLE DE LA)												
	7. Autorité de délivrance Préfecture de MAYOTTE 97600 MAMOUDZOU														
1	8. Description des spécimens (marques, sexe/date de naissance des animaux vivants) sérums + snag total sur buvard SPE	9. Masse nette (kg) -----	10. Quantité 50												
	11. Annexe CITES I	12. Annexe CE A	13. Origine W	14. Objet S											
	15. Pays d'origine MAYOTTE	16. Numéro du permis 4055-E-170177		17. Date de délivrance -----											
	18. Pays de dernière réexportation -----		19. Numéro du certificat -----												
20. Date de délivrance -----															
21. Nom scientifique de l'espèce <p style="text-align: center;">Eulemur fulvus</p>															
22. Nom commun de l'espèce <p style="text-align: center;">Lemur brun</p>															
23. Conditions spéciales <p style="font-size: small;">Ce permis/certificat n'est valable que si les animaux vivants sont transportés conformément aux lignes directrices de la CITES en matière de transport et de préparation à l'envoi d'animaux sauvages vivants ou, en cas de transport aérien, conformément à la réglementation sur les animaux vivants publiée par l'Association du transport aérien international (IATA)</p>															
24. La documentation de (ré)exportation délivrée par le pays de (ré)exportation <input type="checkbox"/> a été présentée à l'autorité de délivrance <input type="checkbox"/> doit être présentée au bureau de douane frontalier d'introduction <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 50px; margin: 10px auto;"></div>		25. <input type="checkbox"/> L'importation <input checked="" type="checkbox"/> L'exportation <input type="checkbox"/> La réexportation des marchandises décrites ci-dessus est autorisée. Signature et cachet officiel : Nom du fonctionnaire chargé de la délivrance : W. FOUSSIER													
26. Numéro du connaissance/de la lettre de transport aérien :		Lieu et date de délivrance : MAMOUDZOU, le 16/04/2007													
27. Réservé à la douane <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; border: 1px solid black; font-size: x-small;">Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée</td> <td style="width: 25%; border: 1px solid black; font-size: x-small;">Nombre d'animaux morts à l'arrivée</td> <td style="width: 50%; border: none;">Document douanier</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">Type :</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">Numéro :</td> </tr> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">Date :</td> </tr> </table>				Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée	Document douanier			Type :			Numéro :			Date :
Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée	Document douanier													
		Type :													
		Numéro :													
		Date :													

COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE		cerfa		N°10592*02	
Original	1. Exportateur/réexportateur ONCFS - BRIGADE NATURE DE MAYOTTE BP 67 97670 COCONI - MAYOTTE FRANCE	PERMIS/CERTIFICAT		N° FR079760004-E	
		<input type="checkbox"/> IMPORTATION <input checked="" type="checkbox"/> EXPORTATION <input type="checkbox"/> RÉEXPORTATION		2. Dernier jour de validité 16/10/2007	
		 Convention sur le commerce international des espèces de flore et de faune sauvages menacées d'extinction			
	3. Importateur INRA Mademoiselle DESVARS Amélie CIRAD 3 P 7 chemin de l'Irat Ligne paradis 97410 ST PIERRE RÉUNION (ÎLE DE LA)	4. Pays (ré)exportateur FRANCE		5. Pays importateur RÉUNION (ÎLE DE LA)	
	6. Emplacement autorisé des spécimens vivants des espèces inscrites à l'annexe A, prélevés dans leur milieu naturel	7. Autorité de délivrance Préfecture de MAYOTTE 97600 MAMOUDZOU			
1	8. Description des spécimens (marques, sexe/date de naissance des animaux vivants) Serum+ sang total sur buvard SPE	9. Masse nette (kg) -----	10. Quantité 80		
		11. Annexe CITES II	12. Annexe CE B	13. Origine W	14. Objet S
		15. Pays d'origine MAYOTTE		16. Numéro du permis 4055-E-170175	
		17. Date de délivrance -----		18. Pays de dernière réexportation -----	
		19. Numéro du certificat -----		20. Date de délivrance -----	
	21. Nom scientifique de l'espèce Pteropus seychellensis				
	22. Nom commun de l'espèce				
	23. Conditions spéciales Ce permis/certificat n'est valable que si les animaux vivants sont transportés conformément aux lignes directrices de la CITES en matière de transport et de préparation à l'envoi d'animaux sauvages vivants ou, en cas de transport aérien, conformément à la réglementation sur les animaux vivants publiée par l'Association du transport aérien international (IATA)				
	24. La documentation de (ré)exportation délivrée par le pays de (ré)exportation <input type="checkbox"/> a été présentée à l'autorité de délivrance <input type="checkbox"/> doit être présentée au bureau de douane frontalier d'introduction	25. <input type="checkbox"/> L'importation <input checked="" type="checkbox"/> L'exportation <input type="checkbox"/> La réexportation des marchandises décrites ci-dessus est autorisée.			
		Signature et cachet officiel  Nom du fonctionnaire : W. F. CITES			
	26. Numéro du connaissance/de la lettre de transport aérien :	Lieu et date de délivrance : MAMOUDZOU, le 16/04/2007			
	27. Réserve à la douane	Signature et cachet officiel :			
	Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée	Document douanier Type : Numéro : Date :		

Annexe G : Certificats CITES d'autorisation d'importation des prélèvements sur Lémuriens et Roussettes de Mayotte.


N°10592*02

COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE		N°10592*02			
Original	1. Exportateur/réexportateur ONCFS - BRIGADE NATURE DE MAYOTTE BP 67 97670 COCONI MAYOTTE	PERMIS/CERTIFICAT <input checked="" type="checkbox"/> IMPORTATION <input type="checkbox"/> EXPORTATION <input type="checkbox"/> RÉEXPORTATION	N° : FR0797400112-1 2. Dernier jour de validité 31/10/2007		
	3. Importateur INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE Mademoiselle DESVARS Amélie CIRAD 3P 7 chemin de l'Irat Ligne Paradis 97410 SAINT-PIERRE FRANCE	 Convention sur le commerce international des espèces de flore et de faune sauvages menacées d'extinction			
	4. Pays (ré)exportateur MAYOTTE	5. Pays importateur FRANCE			
6. Emplacement autorisé des spécimens vivants des espèces inscrites à l'annexe A, prélevés dans leur milieu naturel	7. Autorité de délivrance Direction Régionale de l'Environnement de la Réunion 12, allée de la Forêt 97400 SAINT-DENIS				
8. Description des spécimens (marques, sexe/date de naissance des animaux vivants) Sérums et sang total sur buvard SPE	9. Masse nette (kg) 50	10. Quantité 50			
	11. Annexe CITES I	12. Annexe CE A	13. Origine W		
	14. Objet S				
	15. Pays d'origine MAYOTTE				
	16. Numéro du permis 4055-E-1710177	17. Date de délivrance 16/04/2007			
	18. Pays de dernière réexportation				
	19. Numéro du certificat	20. Date de délivrance			
21. Nom scientifique de l'espèce Eulemur fulvus					
22. Nom commun de l'espèce Lémur brun					
23. Conditions spéciales Ce permis/certificat n'est valable que si les animaux vivants sont transportés conformément aux lignes directrices de la CITES en matière de transport et de préparation à l'envoi d'animaux sauvages vivants ou, en cas de transport aérien, conformément à la réglementation sur les animaux vivants, publiée par l'Association du transport aérien international (IATA)					
24. La documentation de (ré)exportation délivrée par le pays de (ré)exportation <input type="checkbox"/> a été présentée à l'autorité de délivrance <input checked="" type="checkbox"/> doit être présentée au bureau de douane frontalier d'introduction	25. <input checked="" type="checkbox"/> L'importation <input type="checkbox"/> L'exportation <input type="checkbox"/> La réexportation des marchandises décrites ci-dessus est autorisée.				
L'original du PERMIS N°4055-E-1710177, du 16/04/2007 doit impérativement être retourné par la douane à l'autorité de délivrance du présent permis.: Direction Régionale de l'Environnement.	Signature et cachet officiel : Pour le préfet de la Réunion et par délégation, Par empochement du Directeur Régional de l'Environnement, Le Chef du S.E.M.A.  Nom du fonctionnaire chargé de la délivrance : Aurélie MESTRES				
26. Numéro du connaissement/de la lettre de transport aérien :	Lieu et date de délivrance : SAINT-DENIS, le 03/05/2007				
27. Réserve à la douane	Signature et cachet officiel :				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée</td> <td style="width: 50%;">Nombre d'animaux morts à l'arrivée</td> </tr> </table>	Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée	Document douanier Type : Numéro :		
Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée				

COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE		cerfa N°10592*02		
Original	1. Exportateur/réexportateur ONCFS - BRIGADE NATURE DE MAYOTTE BP 67 97670 COCONI MAYOTTE	PERMIS/CERTIFICAT <input checked="" type="checkbox"/> IMPORTATION <input type="checkbox"/> EXPORTATION <input type="checkbox"/> RÉEXPORTATION	N° FR079740111-1 2. Dernier jour de validité 04/11/2007	
	3. Importateur INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE Mademoiselle DESVARS Amélie CIRAD 3P 7 chemin de l'Irat Ligne Paradis 97410 SAINT-PIERRE FRANCE	4. Pays (ré)exportateur MAYOTTE	5. Pays importateur FRANCE	
	6. Emplacement autorisé des spécimens vivants des espèces inscrites à l'annexe A, prélevés dans leur milieu naturel	7. Autorité de délivrance Direction Régionale de l'Environnement de la Réunion 12, allée de la Forêt 97400 SAINT-DENIS		
8. Description des spécimens (marques, sexe/date de naissance des animaux vivants) sérum et sang total sur buvard SPE	9. Masse nette (kg) -----	10. Quantité 80		
	11. Annexe CITES II	12. Annexe CE B	13. Origine W	
	14. Objet S			
	15. Pays d'origine MAYOTTE			
	16. Numéro du permis 4055-E-170175		17. Date de délivrance 16/04/2007	
	18. Pays de dernière réexportation -----			
	19. Numéro du certificat -----		20. Date de délivrance -----	
21. Nom scientifique de l'espèce Pteropus seychellensis				
22. Nom commun de l'espèce				
23. Conditions spéciales Ce permis/certificat n'est valable que si les animaux vivants sont transportés conformément aux lignes directrices de la CITES en matière de transport et de préparation à l'envoi d'animaux sauvages vivants ou, en cas de transport aérien, conformément à la réglementation sur les animaux vivants publiée par l'Association du transport aérien international (IATA)				
24. La documentation de (ré)exportation délivrée par le pays de (ré)exportation <input type="checkbox"/> a été présentée à l'autorité de délivrance <input checked="" type="checkbox"/> doit être présentée au bureau de douane frontalier d'introduction		25. <input checked="" type="checkbox"/> L'importation <input type="checkbox"/> L'exportation <input type="checkbox"/> La réexportation des marchandises décrites ci-dessus est autorisée.		
L'original du PERMIS N°4055-E-170175, du 16/04/2007 doit impérativement être retourné par la douane à l'autorité de délivrance du présent permis : Direction Régionale de l'Environnement		Signature et cachet officiel : Pour le préfet de la Réunion et par délégation, Par empêchement du Directeur Régional de l'Environnement, Le Chef du S.E.M.A. Nom du fonctionnaire chargé de la délivrance : Aurélien MESTRES		
26. Numéro du connaissance/de la lettre de transport aérien :		Lieu et date de délivrance : SAINT-DENIS, le 04/05/2007		
27. Réserve à la douane Signature et cachet officiel :				
Quantité/masse nette (kg) réellement importée ou (ré)exportée	Nombre d'animaux morts à l'arrivée	Document douanier Type : Numéro :		

Annexe H : Arrêté n°005/CAB/2007 portant régulation administrative des populations de chiens errants à Mayotte.



PRÉFECTURE DE MAYOTTE

ARRÊTÉ n° 005/CAB/2007
portant régulation administrative des populations de chiens errants

LE PREFET DE MAYOTTE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

- VU** la loi n°2001-616 du 11 juillet 2001 relative à Mayotte ;
- VU** le décret n° 99-1021 du 1er décembre 1999 relatif à la délégation des pouvoirs propres du Représentant du Gouvernement à Mayotte ;
- VU** le décret du 1er février 2007 du Président de la République, nommant Monsieur Vincent BOUVIER, Préfet de Mayotte
- VU** le décret du 2 février 2005 du Président de la République, nommant Monsieur Guy MASCRES, Sous-préfet, Secrétaire Général de la préfecture de Mayotte ;
- VU** le décret du 24 octobre 2005 du président de la République nommant Monsieur Dominique DUFOUR, Sous-préfet chargé de mission auprès de Préfet de Mayotte ;
- VU** l'arrêté n°01/SG/MMCC/2007 du 27 février 2007 portant délégation de signature à Monsieur Guy MASCRES
- VU** l'arrêté n°02/SG/MMCC/2007 du 27 février 2007 portant délégation de signature à Monsieur Dominique DUFOUR;
- VU** l'article R 263-1 du code de l'environnement relatif aux dispositions applicables à Mayotte au titre du livre II intitulé « Protection de la nature » ;
- VU** l'article L 2215-1 du Code Général des Collectivités Territoriales ;
- VU** l'arrêté n° 007/DAF/SV/2006 du 27 février 2006 portant nomination d'un lieutenant de louveterie à Mayotte ;
- VU** l'arrêté n°22/DRLP/BECAR/2005 du 23 mai 2005 modifié portant dérogation et autorisation à l'importation, la détention et le port d'armes et de munitions à Mayotte dans le cadre du déploiement des missions d'un lieutenant de louveterie et d'un agent de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage ;

Considérant que la présence de meutes de chiens errants sur les sites de ponte de tortues marines, sur les communes d'ACOUA, de BANDRABOUA et de BOUENI, constitue une menace pour les spécimens d'espèces protégées ;

Considérant la présence d'une meute de chiens errants attaquant le bétail signalée par le Maire de la commune de M'TZAMBORO et des éleveurs de TSINGONI (Combani).

Considérant la présence d'une meute de chiens errants signalée par le service sécurité de la décharge de Hamaha, sise sur la commune de Mamoudzou ;

Considérant la mobilité de ces meutes de chiens ;

Considérant le risque d'introduction de rage canine à Mayotte en provenance d'autres pays de la sous région de l'Océan Indien où la maladie sévit à l'état enzootique, d'une part, et le rôle de vecteur potentiel des chiens errants de l'infection rabique, d'autre part ;

Considérant le danger imminent que constitue ces meutes pour la sécurité, la salubrité et la tranquillité publiques ;

Considérant le fait que la plupart des chiens errants à l'origine des attaques et des nuisances ont un comportement totalement sauvage rendant leur capture impossible et considérant le danger que représenterait pour les agents , mais aussi pour les animaux eux mêmes, les tentatives de captures si elle étaient conduites;

Considérant qu'il convient de remédier dans l'urgence par tout moyen approprié à cet état de fait ;

SUR proposition de Monsieur le Secrétaire Général

A R R E T E

Article 1er :

Une opération administrative de destruction des chiens errants, nécessitant le recours à des armes à feu, est ordonnée le vendredi 6 avril, de 18 heures à 6 heures, sur les communes de , Acoua , Bandraboua, Bouéni, M'Tzamboro, Tsingoni (Combani) et la décharge de Hamaha, sise sur le commune de Mamoudzou

Article 2 :

Le Lieutenant de Louveterie et les agents de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage sont requis pour réaliser cette opération sous la coordination opérationnelle du directeur des services vétérinaires.

La Gendarmerie et la Police Municipale pourront être requises par les intervenants pour leur prêter aide et assistance.

Article 3 :

Lors de la réalisation de l'opération administrative visée à l'article 1er, le véhicule immatriculé 976D1310A est utilisé par les agents mentionnées à l'article 2,

Article 4 :

Un compte-rendu de mission sera dressé à l'issue de l'opération par le Lieutenant de louveterie et le Chef de service départemental de l'ONCFS et remis au Directeur des Services Vétérinaires.

Article 5 :

Le Secrétaire Général, le Lieutenant-colonel commandant la gendarmerie de Mayotte, le Commissaire Principal Directeur de la sécurité publique de Mayotte, le Chef du Service des Douanes, le Directeur de l'Agriculture et de la Forêt, le Directeur des services vétérinaires, le Lieutenant de Louveterie et le Chef de service de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage sont chargés, chacun en ce qui les concerne de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au Recueil des Actes Administratifs.

DIFFUSION :

DDCL		1	Fait à Mamoudzou,
Directeur de l'Agriculture et de la Forêt	1		
Directeur des Services Vétérinaires	1		Le Préfet de Mayotte
Lieutenant de Louveterie	1		
ONCFS		1	
Procureur de la République (TPI)	1		
Gendarmerie de Mayotte	1		
Commissaire de Police		1	
Bureau du Courrier (RAA)	1		
Mairie des communes concernées	1		

Annexe I : Animaux de La Réunion - Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

Tableau I : Résultats par sexe et âge chez les rats noirs à La Réunion.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Sérologie														qPCR sur reins			qPCR sur urines				
				Sérogroupe														Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)		
				Ictero	Canicola	Sejroo	Ictero-Tara ^a	Mini	Bataviae-Ictero ^a	Canic-Ictero ^a	Ballum-Ictero-Pyrog-Tara ^a	Canic-Ictero-Tara ^a	Canic-Ictero-Mini ^a	Cynopteri	Grippo-Ictero ^a	Sejroo-Ictero-Hebdomadis ^a	Canic-Ictero-Mini-Pomona ^a	Positif à 5 sérogroupe ou plus ^a							
Sexe																									
Femelle	32 (21A, 11J)	28	24 (85,7)	11	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	3	32	0	23 (71,9)	8	0	2 (25,0)	
Mâle	47 (31A, 16J)	38	28 (73,7)	11	5	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	6	47	3	27 (61,4)	27	0	10 (37,0)	
Sexe non déterminé	1	0	0 (0,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0 (0,0)	1	0	0 (0,0)	
Age																									
Juvénile	28 (11F, 16M, 1na)	18	15 (83,3)	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	28	2	16 (61,5)	14	0	1 (7,1)	
Adulte	52 (21F, 31M)	48	37 (77,1)	17	4	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	52	2	34 (68,0)	22	0	11 (50,0)	
Total	80	66	52 (78,8)	22	7	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	9	80	4	50 (62,5)	36	0	12 (33,3)		

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM@-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau II : Résultats par sexe et âge chez les rats surmulots à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie								qPCR sur reins			qPCR sur urines		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Ictero	Sérogroupe				Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe														
Femelle	3 (2A, 1J)	3	2 (33,3)	0	1	1	0	0	3	1	1 (50,0)	0	0	0 (0,0)
Mâle	4 (3A, 1J)	4	4 (100,0)	1	0	1	1	1	4	0	3 (75,0)	2	0	1 (50,0)
Age														
Juvenile	2 (1F, 1M)	2	2 (100,0)	1	1	1	0	0	2	0	1 (50,0)	1	0	1 (100,0)
Adulte	5 (2F, 3M)	5	4 (80,0)	0	0	2	1	1	5	1	3 (60,0)	1	0	0 (0,0)
Total	7	7	6 (85,7)	1	1	2	1	1	7	1	4 (66,6)	2	0	1 (50,0)

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau III : Résultats par sexe et âge chez les souris à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie						qPCR sur reins			qPCR sur urines		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Sérogroupe			Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe				Canicola-Ictero	Ictero	Canicola-Pyrogenes ^a						
Femelle	6 (4A, 2J)	1	1 (100,0)	1	0	0	6	1	5 (100,0)	2	0	0 (0,0)
Mâle	7 (5A, 2J)	1	1 (100,0)	0	1	0	7	0	5 (71,4)	3	0	2 (66,6)
Sexe non déterminé	1 (1A)	1	1 (100,0)	0	0	1	1	0	1 (100,0)	0	0	0
Age												
Juvenile	4 (2F, 2M)	0	0	0	0	0	4	0	3 (75,0)	1	0	0 (0,0)
Adulte	10 (4F, 5M, 1na)	3	3 (100,0)	1	1	1	10	1	8 (88,8)	4	0	2 (50,0)
Total	14	3	3 (100,0)	1	1	1	14	1	11 (84,6)	5	0	2 (40,0)

A : adulte ; J : juvenile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau IV : Résultats par sexe et âge chez les musaraignes à La Réunion.

Données épidémiolo- giques	Nb prélevés	Nb testés	Sérologie			qPCR sur reins			qPCR sur urines		
			Nb séropositifs (%)	Ictero	Bataviae	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)
Sexe											
Femelle	31 (25A, 6J)	1	0 (0,0)	0	0	31	5	9 (34,6)	12	0	0 (0,0)
Mâle	31 (28A, 3J)	2	2 (100,0)	1	1	31	9	6 (27,3)	10	0	0 (0,0)
Age											
Juvenile	9 (6F, 3M)	1	1 (100,0)	0	1	9	1	1 (12,5)	5	0	0 (0,0)
Adulte	53 (25F, 28M)	2	1 (50,0)	1	0	53	13	14 (35,0)	17	0	0 (0,0)
Total	62	3	2 (66,6)	1	1	62	14	15 (31,25)	22	0	0 (0,0)

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau V : Résultats par sexe et âge chez les tenrecs à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie						qPCR sur reins			qPCR sur urines		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Ictero	Sérogroupe		Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)
Sexe												
Femelle	25 (15A, 10J)	25	2 (8,0)	0	1	1	25	2	0 (0,0)	23	2	0 (0,0)
Mâle	13 (5A, 8J)	13	3 (23,1)	3	0	0	13	2	0 (0,0)	12	0	0 (0,0)
Age												
Juvenile	18 (10F, 8M)	18	4 (22,2)	2	1	1	18	2	0 (0,0)	18	1	0 (0,0)
Adulte	20 (15F, 5M)	20	1 (5,0)	1	0	0	20	2	0 (0,0)	17	1	0 (0,0)
Total	38	38	5 (13,2)	3	1	1	38	4	0 (0,0)	35	2	0 (0,0)

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau VI : Résultats par sexe et âge chez les chiens errants à La Réunion.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Sérologie							qPCR sur reins			qPCR sur urines		
				Sérogroupe							Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)
Sexe				Bata	Cani	Ball	Sejroe	Ictero	Pana	Tara						
Femelle	24 (19A, 5J)	23	9 (39,1)	0	4	1	1	3	0	0	15	2	5 (38,5)	12	0	1 (8,3)
Mâle	27 (21A, 6J)	27	14 (51,8)	1	6	2	0	2	3	2	15	4	2 (18,2)	15	0	1 (6,6)
Age																
Juvénile	11 (5F, 6M)	11	3 (27,3)	0	1	0	0	0	2	0	8	2	0 (0,0)	7	0	0 (0,0)
Adulte	40 (19F, 21M)	39	20 (51,3)	1	9	3	1	5	1	2	21	4	7 (41,2)	20	0	2 (10,0)
Total	51	50	23 (46,0)	1	10	3	1	5	3	2	30	6	7 (29,2)	27	0	2 (7,4)

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau VII : Résultats par sexe et âge chez les chats errants à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie									qPCR sur reins			qPCR sur urines		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	Austr-Canic-Ball-Ictero-Mini ^a	Sérogroupes	Pana-Pomo-Pyro ^a	Pana-Pyro ^a	Pomo-Pyro ^a	Cani-Pana-Tara ^a	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe															
Femelle	16 (9A, 7J)	16	4 (25,0)	1	1	0	1	1	0	16	4	3 (25,0)	8	0	0 (0,0)
Mâle	14 (8A, 6J)	14	4 (28,6)	0	0	1	2	0	1	14	5	3 (33,3)	10	0	0 (0,0)
Age															
Juvénile	13 (7F, 6M)	13	3 (23,1)	0	0	1	1	1	0	13	4	3 (33,3)	8	0	0 (0,0)
Adulte	17 (9F, 8M)	17	5 (29,4)	1	1	0	2	0	1	17	5	3 (25,0)	10	0	0 (0,0)
Total	30	30	8 (26,7)	1	1	1	3	1	1	30	9	6 (28,6)	18	0	0 (0,0)

A : adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau VIII : Résultats par sexe et âge chez les bovins à La Réunion.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropo. (%)	Sérogroupe											qPCR sur reins		
				Pana	Pyro	Pyro-Tara ^a	Tara	Canis	Canis-Pyro ^a	Canis-Sejroe-Ictero ^a	Ballum	Sejroe	Sejroe-Pyro-Mini ^a	Sejroe-Mini ^a	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe																	
Femelle	24 (11A, 11S, 2J / 15bv allait, 9 bov laitier)	23	13 (56,5)	1	2	1	1	0	0	0	0	7	1	0	24	4	3 (15,0)
Mâle	67 (4A, 30S, 33J / 37 bov allait, 30 bov laitier)	65	17 (26,2)	1	0	0	0	1	1	1	1	10	0	2	65	8	11 (19,3)
Age																	
Juvenile	35 (2F, 33M / 5 bov allait, 30 bov laitier)	34	2 (5,9)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	33	6	2 (7,4)
Sub-adulte	41 (11F, 30M / 40 bov allait, 1bov laitier)	39	19 (48,7)	0	0	0	0	1	1	1	1	13	0	2	41	4	9 (24,3)
Adulte	15 (11F, 4M / 7 bov allait, 8 bov laitier)	15	9 (60,0)	1	2	1	1	0	0	0	0	3	1	0	15	2	3 (23,1)
Catégorie																	
Veau	35 (2F, 33M / 5 bov allait, 30 bov laitier)	34	2 (5,9)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	33	6	2 (7,4)
Taurillon	30 (29 bov allait, 1 bov laitier)	29	16 (55,2)	0	0	0	0	1	1	1	1	10	0	2	30	2	9 (32,1)
Génisse	11 (11 bov allait)	10	3 (30,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	11	2	0 (0,0)
Vache	11 (3 bov allait, 8 bov laitier)	11	9 (81,8)	1	2	1	1	0	0	0	0	3	1	0	11	2	2 (22,2)
Taureau	4 (4 bov allait)	4	0 (0,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1 (25,0)
Type																	
Allaitant	52 (15F, 37M)	50	23 (46,0)	0	1	1	0	1	1	1	1	15	0	2	51	6	12 (26,6)
Laitier	39 (9F, 30M)	38	7	2	1	0	1	0	0	0	0	2	1	0	38	6	2 (6,3)
Race																	
Blonde d'Aquitaine	1 (1 taureau élev allait)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0 (0,0)
Brune	1 (1 vache laitière)	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0 (0,0)
Charolaise	1 (1 taurillon élev allait)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0 (0,0)
Limousine	19 (7F, 12M / 1A, 18S / 19 bov allait)	19	10	0	0	0	0	0	0	1	1	7	0	1	19	3	6 (37,5)
Croisée	30 (8F, 22M / 5A, 20S, 5J / 30 bov allait)	28	13	0	1	1	0	1	1	0	0	8	0	1	29	3	6 (23,1)
Montbelliarde	1 (1 taurillon élev laitier)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0 (0,0)
Prim'Holstein	37 (8F, 29M / 7A, 30J, 37 bov laitier)	36	6	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	36	6	2 (5,9)
Total	91	87	30 (34,5)	2	2	1	1	1	1	1	1	17	1	2	88	12	14 (18,4)

A : adulte ; S : sub-adulte ; J : juvénile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau IX : Résultats par sexe et âge chez les caprins à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie								qPCR sur reins		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropo. (%)	Sérogroupe					Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe				Panama	Panama-Pyrogenes ^a	Pyrogenes	Autumnalis	Ballum-Panama ^a			
Femelle	51 (51A)	51	30 (58,8)	19	3	6	1	1	51	11	12 (30,0)
Mâle	9 (A)	9	6 (66,6)	6	0	0	0	0	9	0	1 (11,1)
Total	60	60	36 (60,0)	25	3	6	1	1	60	11	13 (26,5)

A : adulte ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau X : Résultats par sexe et âge chez les ovins à La Réunion.

Données épidémiologiques	Sérologie			qPCR sur reins		
	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropo. (%)	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)
Sexe						
Femelle	5 (5J)	0	0	0	0	0
Mâle	5	0	0	0	0	0
Total	5	0	0	0	0	0

J : juvénile.

^a Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau XI : Résultats par chez les cerfs Rusa à La Réunion (aucune donnée de sexe et d'âge n'était disponible pour cette espèce).

Sérologie										qPCR sur reins		
Sérogroupe												
Nb prélevés	Nb testés	Nb séropo. (%)	Ictero	Ictero-Panama ^a	Ictero-Pyrogenes ^a	Panama	Panama-Pyrogenes ^a	Pyrogenes	Mini	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
41	34	21 (61,8)	2	1	1	8	3	5	1	41	9	6 (18,7)

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Tableau XII : Résultats par sexe et âge chez les porcins à La Réunion.

Sérologie																	qPCR sur reins			
Sérogroupe																				
Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropo. (%)	Aust-Cyno-Pana ^a	Ictero	Ballum	Panama	Panama-Pyrogenes ^a	Panama-Tarassovi ^a	Pyrogenes	Mini	Panama-Autum ^a	Autum-Ballum ^a	Can-Pana-Pyro ^a	Ballum-Panama ^a	Cynopteri	Sejroe-Panama ^a	Nb testés	Nb non amplif. ^b	Nb positifs (%)
Sexe																				
Femelle	89 (89A)	88	42 (47,7)	1	2	1	16	2	1	11	2	1	1	1	0	2	1	89	7	12 (14,6)
Mâle	1 (1A)	1	1 (100,0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (100,0)
Total	90	89	43 (48,3)	1	2	1	16	2	1	11	2	1	1	1	1	2	1	90	7	13 (15,6)

A : adulte ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coagglutinations.

^b Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR. Le témoin d'amplification (plasmide pGEM®-T contenant un fragment d'ADN du VZV) n'a pas pu être amplifié, probablement à cause de la présence d'inhibiteurs.

Annexe J : Animaux de Mayotte– Résultats par espèce en fonction des données épidémiologiques.

Tableau I : Résultats de sérologie par sexe et par âge chez les roussettes à Mayotte.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	200901489 (Pyrogenes)	201001128 (Grippotyphosa)
Sexe					
Femelle	31 (18A, 13J)	31	2 (6,4)	2	0
Mâle	18 (12A, 5J, 1na)	18	3 (16,6)	2	1
Age					
Juvenile	18 (13F, 5M)	18	0	0	0
Adulte	30 (18F, 12M)	30	5 (16,6)	4	1
Age na	1 (M)	1	0	0	0
Total	49	49	5 (10,2)	4	1

na : Donnée non disponible (*not available*).

A : adulte ; J : juvenile ; F : femelle ; M : mâle.

Tableau II : Résultats de sérologie par sexe et par âge chez les lémuriens à Mayotte.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	201001125 (Pyrogenes) + 200901489 (Pyrogenes) ^a
Sexe				
Femelle	25 (21A, 4J)	25	0 (0,0)	0
Mâle	25 (20A, 1J, 1na)	25	1(4,0)	1
Age				
Juvenile	8 (4F, 4M)	8	0 (0,0)	0
Adulte	41 (21F, 20M)	41	1(2,4)	1
Age na	1 (M)	1	0 (0,0)	0
Total	50	50	1 (2,0)	1

na : Donnée non disponible (*not available*).

A : adulte ; J : juvenile ; F : femelle ; M : mâle.

^a Coaglutinations.

Tableau III : Résultats de sérologie en fonction du sexe, du type et du statut vaccinal chez les chiens à Mayotte.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropos. (%)	201001127	Canic	Canic +200901489	Ictero	Ictero + Canic	Ictero + 200701203	200701203	200803703	Ictero	200701203 +200803703	200901118
				+200901489								+200701203		+200803703
Sexe														
Femelle	12 (11dom, 1err)	12	11 (91,6)	1	2	1	5	0	1	0	1	0	0	0
Mâle	15 (8dom, 7err)	15	13 (86,6)	0	2	0	3	1	1	4	0	0	1	1
Sexe na	10 (10 dom)	10	10 (100)	0	0	0	3	6	0	0	0	1	0	0
Type														
Domestique vacciné	22 (7F, 5M, 10 sexe indéterminé)	22	21 (95,5)	0	1	0	10	6	2	0	0	1	0	1
Domestique non vacciné	7 (4F, 3M)	7	6 (85,7)	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
Errant	8 (1F, 7M / vaccination inconnue)	8	7 (87,5)	1	2	0	0	0	0	3	0	0	1	0
Total	37	37	34 (91,9)	1	4	1	11	7	2	4	1	1	1	1

200701203 : séro groupe Mini

200803703 : séro groupe Mini/Hebdomadis

201001127, 200901489, 200901122 : séro groupe Pyrogenes

200901118 : séro groupe Pomona

201001128, 200801774: séro groupe Grippytyphosa.

dom : chien domestique ; err : chien errant ; F : femelle ; M : mâle.

Tableau IV : Résultats de sérologie par sexe et âge chez les rats noirs à Mayotte.

Données épidémiologiques	Nb prélevés	Nb testés	Nb séropositifs (%)	201001125, 201001127, 200701203, 200803703 ^a	200701203, 200801774 ^a	200701203, 200803703 ^a	201001127, 200801774	200701203 (Mini)	200801774 (Grippe.)	200803703 (Mini/Hebd-omadis)	200901122 (Pyrogenes)	201001128 (Grippe.)
Sexe												
Femelle	87 (56A, 31J)	68	8 (11,8)	1	1	1	0	3	1	0	1	0
Mâle	68 (36A, 32J)	56	6 (10,7)	0	0	2	1	0	1	1	0	1
Sexe na	1 (J)	1	0 (0,0)	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Age												
Juvenile	64 (31F, 32M)	57	9 (15,8)	1	0	3	0	1	2	0	0	1
Adulte	92 (56F, 36M)	68	5 (7,3)	0	1	0	1	2		1	1	0
Total	156	125	14 (11,2)	1	1	3	1	3	2	1	1	1

A : adulte ; J : juvenile ; F : femelle ; M : mâle.

201001125 : Pyrogenes ; 201001127 : Pyrogenes ;

^a Coaglutinations.

Tableau V : Résultats des qPCR sur reins, par sexe et âge chez les rats noirs à Mayotte.

Données épidémiologiques	Nb testés	Nb non amplif. ^a	Nb positifs (%)
Sexe			
Femelle	87	9	27 (34,6)
Mâle	68	6	15 (24,2)
Sexe na	1	0	0 (0,0)
Age			
Juvenile	64	7	11 (19,3)
Adulte	92	8	31 (36,9)
Total	156	15	42 (29,8)

^a Nombre de prélèvements non amplifiables par PCR.

Annexe K : Article - Le tanrec (*Tenrec ecaudatus*) réservoir animal de leptospires ?

ÉPIDÉMIOLOGIE

Le tanrec (*Tenrec ecaudatus*) : réservoir animal de leptospires ?

M. Sigaud (1), S. Caceres (1), M. Picard (2), A. Desvars (3) & A. Michault (2)

(1) Office national de la chasse et de la faune sauvage, Cellule technique océan Indien s/c DIREN Réunion, 12 allée de la Forêt, Parc de la Providence 97400 Saint-Denis, la Réunion.

(2) Service de bactériologie parasitologie virologie et hygiène CHR GHSR BP350, 97448 Saint-Pierre cedex, la Réunion.

Tél. : 0262359100, fax : 0262359110, e-mail : a.michault@ch-sudreunion.fr.

(3) INRA de Theix, Unité d'épidémiologie animale, 63122 St-Genès-Champanelle, France.

Courte note n° 3219. "Épidémiologie". Reçue le 22 janvier 2008. Acceptée le 18 mars 2008.

Summary: Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*): natural maintenance host of leptospires?

In order to know if the Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*), endemic insectivorous mammal of Madagascar and present only on Indian Ocean islands, is a natural maintenance host of leptospires carrier in La Reunion, we conducted a research of anti-leptospirose antibodies by microagglutination test in 37 individuals. 81.1% of serums tested were positive, (>1/50) with the highest titers for the Icterohaemorrhagiae serogroup. So, in la Reunion, the Tailless tenrec can be suspected of being a reservoir of leptospires. A more detailed study, should confirm or not this hypothesis and should possibly quantify its importance.

**Tailless tenrec
Tenrec ecaudatus
leptospirose
la Réunion
Indian Ocean**

**tanrec
Tenrec ecaudatus
leptospirose
la Réunion
océan Indien**

Introduction

La leptospirose est une des zoonoses les plus répandues dans le monde. L'incidence est plus élevée en zone tropicale et subtropicale, en raison des fortes pluviométries rencontrées dans ces régions. L'incidence et la séroprévalence de la leptospirose humaine à la Réunion sont élevées et les formes graves, dont les formes pulmonaires, fréquentes (1, 4).

La contamination de l'homme se fait essentiellement de façon indirecte, par le biais d'un environnement souillé par les urines d'un animal excréteur (en particulier via l'eau) ou encore par contact direct avec de l'urine contaminée.

De très nombreux animaux sauvages sont sources d'infections, mais certains jouent un rôle épidémiologique plus important comme les rongeurs (rats, souris), certains animaux domestiques (chiens, bovins, porcs, plus rarement moutons, chèvres et chevaux), les insectivores (musaraignes, hérissons) ainsi que les chiroptères.

Photo 1.

Tanrec (*Tenrec ecaudatus*).
Tailless tenrec (*Tenrec ecaudatus*).



Dans cette étude, nous avons cherché à savoir si le tanrec ou tangué (*Tenrec ecaudatus*), mammifère anciennement classé dans l'ordre des Insectivores, maintenant placé parmi les Afrosoricidés, endémique d'Afrique et de Madagascar, introduit dans certaines îles de l'océan Indien, pouvait être porteur de leptospires.

Matériel et méthodes

C'est au cours de la période d'ouverture 2007 de la chasse aux tangués (nom vernaculaire donné localement au tanrec) sur l'île de la Réunion que 37 individus ont été capturés et prélevés, sur 3 sites différents (site 1 « Maïdo » : X = 0330244, Y = 7670386, alt. = 1 733 m; site 2 « plaine des Cafres » : X = 0351255, Y = 7648168, alt. = 1 175 m; site 3 « volcan » : X = 0358799, Y = 7655999, alt. = 2 140 m).

Les campagnes de captures ont été effectuées en collaboration avec des chasseurs de tangués. Après leur capture, chacun des individus a été sacrifié et du sang a été prélevé par voie intracardiaque sur tube sec. Le sérum recueilli après centrifugation a été conservé à -80 °C.

Le sérodiagnostic a été réalisé par la technique du MAT (micro-agglutination test) qui est le « gold standard » pour le diagnostic de la leptospirose en testant les souches de références (CNR-IPP) pour les sérogroupes *Australis*, *Canicola*, *Grippityphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Panama*, *Pyrogenes*, *Sejroe*, *Wolfi*, *Hardjo*, *Cynopteri*. Deux souches du séro-groupe *Icterohaemorrhagiae*, isolées chez des patients atteints de leptospirose à la Réunion, ont été ajoutées afin d'améliorer la sensibilité.

Une souche saprophyte (*Leptospira biflexa* sérovar patoc) a également été testée pour rechercher un éventuel sérovar non

testé dans le panel, cette souche donnant des réactions croisées avec les anticorps de la majorité des sérovars pathogènes. La première dilution de sérum testé en MAT était au 1/50.

Résultats

Parmi les 37 tangles testés en MAT, 34 (soit 92 %) avaient des anticorps anti-leptospire (titre 1/50 ou plus) et 30 (soit 81 %) un titre supérieur ou égal à 1/100, seuil de positivité généralement utilisé. Les titres en anticorps les plus élevés ont toujours été trouvés pour le sérotype *Icterohaemorrhagiae* (IH).

Discussion

Tenrec ecaudatus est un petit mammifère terrestre (photo 1) appartenant à la famille des *Tenrecidae* qui comprend 10 genres regroupés en 3 sous-familles dans lesquelles se répartissent 29 espèces. *Tenrec ecaudatus* (sous-famille des *Tenrecinae*), seule espèce du genre *Tenrec*, est endémique de Madagascar (2). C'est le plus gros représentant de sa famille (longueur totale du corps : 28,5-40 cm ; longueur de la queue : 1-1,5 cm ; poids : 1-2 kg). Très prolifique, des portées comprenant jusqu'à 31 petits ont été observées en captivité, mais en milieu naturel les portées sont en moyenne composées de 12 à 16 petits.

À Madagascar, on le trouve au sein d'un large éventail d'habitats, du niveau de la mer jusqu'à 900 m d'altitude, dans tous les types de forêts, préférant les zones de broussailles et de sous-bois (3). Il a été introduit dans certaines des îles de l'océan Indien (la Réunion, Maurice, Seychelles ou encore Comores) principalement en tant que source de nourriture. Son introduction à la Réunion remonte au XIX^e siècle.

Les résultats des sérodiagnostics montrent que le tangle est un animal potentiellement réservoir de leptospires. Pour pouvoir l'affirmer et peut-être le quantifier, une recherche de leptospires par culture d'échantillons d'urines ou de reins est nécessaire. À la Réunion, le tangle pourrait être un hôte naturel du sérotype IH et contribuer au maintien de la circulation de ce sérotype.

Le pourcentage élevé de tangles ayant une sérologie positive pourrait être expliqué par une transmission congénitale ou néonatale par le biais des urines de la mère. Il est possible que les animaux trouvés négatifs en MAT soient aussi porteurs, mais que le taux d'anticorps soit trop faible pour être détecté.

Le tangle étant l'un des mammifères les plus prolifiques connus, l'existence d'une transmission congénitale ou néonatale

permettrait d'avoir un nombre important de tangles porteurs et donc de maintenir le sérotype IH sur l'île.

La transmission horizontale entre tangles est certainement possible en raison de leur mode de vie, mais est probablement insuffisante pour expliquer à elle seule le fort pourcentage d'animaux positifs. Par ailleurs, le rat, hôte naturel du sérotype *Icterohaemorrhagiae*, dont deux espèces sont présentes et porteuses de leptospires à la Réunion (*Rattus norvegicus*, *R. rattus*), pourrait aussi transmettre de façon directe ou indirecte par les urines les leptospires aux tangles, dans les zones où ils partagent un type d'habitat semblable.

Les animaux excréteurs peuvent être source d'infection pour d'autres espèces, dont l'homme. À la Réunion, l'homme est en contact avec le tangle, puisqu'il le chasse et le mange sous forme de civet.

Les tangles vivent le plus souvent en zone couverte et humide favorable à la survie des leptospires dans l'eau. À la Réunion, on les trouve également, dans des milieux dégradés en bordure d'agglomérations.

Si le tangle s'avère être un réservoir de leptospires, la transmission tangle-eau-homme est donc envisageable pour l'ensemble des usagers de la nature, comme avec les rats, omniprésents.

Conclusion

Le tangle est, à la Réunion, un réservoir potentiel de leptospires. Une étude plus approfondie doit être envisagée de manière à confirmer ou non cette hypothèse.

Références bibliographiques

1. DUVAL G, MICHAULT A, BARANTON G, LAW-KOUNE JD, FOLIO G et al. - Étude séroépidémiologique de la leptospirose humaine à l'île de La Réunion. *Rev Epidemiol Santé Publ*, 1991, 39, 135-141.
2. GARbutt N - Tenrecs, Order Insectivora. In: BISHOP I & COLLAR N (Eds), *Mammals of Madagascar*. Yale University Press, New Haven, 1999, pp. 69-96.
3. NICOLL ME - *Tenrec ecaudatus*, Tenrec, Tandraka, Tandraka. In: GOODMAN S & BENSTEAD JP (Eds), *The Natural History of Madagascar*. University of Chicago Press, 2004, pp. 1283-1287.
4. PAGANIN F, BOURDIN A, DALBAN C, COURTIN JP, POU-BEAU P et al. - Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases. *Intensive Care Med*, 2007, 33, 1959-1966.