

# Surveillance active de la leptospirose humaine en milieu hospitalier au Cambodge

## Hospital based active surveillance of human leptospirosis in Cambodia

A. Berlioz-Arthaud · B. Guillard · C. Goarant · S. Hem

Reçu le 4 septembre 2009 ; accepté le 12 janvier 2010  
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

**Résumé** La leptospirose est jusqu'à présent peu étudiée et probablement sous-estimée au Cambodge, où existent pourtant des conditions très favorables à sa circulation. Entre juin 2006 et juillet 2007, 612 patients, admis à l'hôpital de Takéo et à l'hôpital Calmette de Phnom Penh pour un syndrome compatible avec la leptospirose, ont été recrutés pour recherche des marqueurs biologiques de cette infection : mise en évidence de l'ADN bactérien par PCR et sérologie par Elisa-IgM et test de microagglutination (MAT). Cent quatre-vingt-trois patients (29,9 %) se sont révélés porteurs d'au moins un marqueur biologique de la leptospirose, dont 88 (14,4 %) présentaient un profil d'infection aiguë objectivé par une PCR positive. La proportion importante de patients avec un profil de phase immune (15,5 %) suggère des contacts anciens avec les leptospires et la possibilité d'infections peu ou pas symptomatiques. Treize sérogroupes de *Leptospira* ont été identifiés, avec prédominance de Panama, Pyrogenes et Australis, illustrant la grande diversité des hôtes réservoirs. Le séro groupe Icterohaemorrhagiae n'est retrouvé que dans 4 % des cas. Aucun lien significatif entre l'infection et le sexe, la classe d'âge ou l'appartenance à une catégorie socioprofessionnelle n'a pu être établi, suggérant une exposition permanente de la population dans sa vie quotidienne plutôt que l'existence de groupes à risque majoré. Cette étude, la plus vaste réalisée à ce jour sur la leptospirose au Cambodge, confirme l'importance de cette

zoonose, devant être prise en compte comme un problème réel de santé publique dans ce pays.

**Mots clés** Leptospirose · Séro groupe · Hôpital · Takéo · Phnom-Penh · Cambodge · Asie du Sud-Est

**Abstract** Leptospirosis has been so far poorly described in Cambodia and is probably underdiagnosed in the current local medical practices, although conditions to its active circulation exist in this country. Between June 2006 and July 2007, 612 patients admitted to Takeo hospital and Calmette hospital in Phnom Penh presenting clinical symptoms compatible with leptospirosis, were recruited for biological investigation of leptospirosis markers: PCR detection of bacterial DNA and serology using an Elisa-IgM test and the micro-agglutination reference test (MAT). One hundred eighty-three patients (29.9%) were found to be carrying at least one biological marker of leptospirosis, 88 (14.4%) showed an acute infection profile, evidenced by a positive PCR. The proportion of patients with an immune phase profile (15.5%) suggests former contacts with *Leptospira* and possible infections with little or no symptoms. Thirteen serogroups of *Leptospira* have been identified, with predominance of Panama, Pyrogenes and Australia, illustrating a probable wide range of animal reservoir hosts. Serogroup Icterohaemorrhagiae was found in only 4% of cases, contrasting with usual features of human leptospirosis. No significant link between infection and sex, age or occupation could be established, suggesting a permanent exposure of the population in its daily life rather than the existence of risk groups. This study, the largest conducted to date on leptospirosis in Cambodia, confirms the importance of this zoonotic disease, that must be considered a real public health issue in this country.

A. Berlioz-Arthaud (✉) · C. Goarant  
Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP 61,  
98845 Nouméa, Nouvelle-Calédonie  
e-mail : a.berlioz@afssa.fr

A. Berlioz-Arthaud  
Afssa-LERRPAS, domaine de Pixérécourt,  
BP 4009, F-54220 Malzéville, France

B. Guillard · S. Hem  
Institut Pasteur du Cambodge,  
5, boulevard Monivong, BP 983,  
Phnom-Penh, royaume du Cambodge

**Keywords** Leptospirosis · Serogroup · Hospital · Takéo · Phnom-Penh · Cambodia · South-East Asia

## Introduction

La leptospirose est une zoonose entretenue par un cycle animal où diverses espèces de mammifères sont impliquées dont les rats qui jouent un rôle disséminateur prépondérant. Le diagnostic de la leptospirose, aussi bien clinique que biologique, est difficile. Ses symptômes sont variables et vont d'un banal syndrome grippal à la maladie de Weil qui, typiquement, associe des défaillances hépatiques et rénales majeures, souvent mortelles. Les examens biologiques – isolement de la bactérie, recherche de son génome par PCR et sérologie par le test de microagglutination (MAT) – restent encore à l'heure actuelle du domaine de laboratoires spécialisés. Certains tests immunoenzymatiques simples de sensibilité et de spécificité acceptables, récemment apparus sur le marché, autorisent un dépistage sérologique rapide, sans toutefois se substituer aux techniques de référence, indispensables à mettre en œuvre pour un diagnostic biologique de certitude [6].

La leptospirose est certainement méconnue et sous-estimée dans les pays de l'Asie du Sud-Est, en particulier au Cambodge. L'une des études régionales les plus récentes date de 2002 et met en évidence la part sous-estimée de la leptospirose parmi les étiologies des fièvres et des syndromes icteriques en Indonésie, au Laos, au Cambodge et au Vietnam [11]. Dans ces territoires où prédominent d'autres endémies majeures (paludisme, hépatites virales, arboviroses), la leptospirose est le plus souvent ignorée. En 1998, la leptospirose était donnée pour être responsable de 21 % des hépatites aiguës non A–non B à Ventiane (Laos) [3]. Une enquête de séroprévalence conduite par l'institut Pasteur d'Ho-Chi-Minh-Ville en 1998 a retrouvé un portage d'anticorps spécifiques chez 18,8 % des patients d'un échantillonnage représentatif de la population du delta du Mékong et proposait une origine environnementale plus que professionnelle de la maladie [18]. Enfin, une étude plus ancienne (1988) conduite en Thaïlande décrit le lien entre l'incidence locale de la leptospirose et les inondations et démontrait aussi le rôle des animaux domestiques – porcs, bovins et chiens – comme sources de contamination humaine [7].

L'ensemble des facteurs sociaux, économiques, professionnels et climatiques retrouvés dans ces études, et plus généralement ceux habituellement associés aux risques de contamination par les leptospires, sont rencontrés au Cambodge. Cette situation valide la nécessité d'évaluer l'importance de la leptospirose dans ce pays et d'établir un inventaire des sérogroupes en cause.

Le but principal de cette étude était de réaliser une évaluation de la fréquence de la leptospirose humaine parmi les patients présentant un syndrome fébrile lors de leur admission en milieu hospitalier et l'identification des principaux sérogroupes rencontrés au Cambodge.

Ce travail a été réalisé en collaboration par les instituts Pasteur du Cambodge (IPC) et de Nouvelle-Calédonie (IPNC).

## Matériel et méthode

### Inclusion de patients et définition clinique de cas

L'inclusion des patients dans l'étude s'est déroulée de juin 2006 à juillet 2007. Elle a concerné, d'une part, des patients admis sans limite d'âge à l'hôpital Calmette de Phnom-Penh ou à l'hôpital de Takéo pour un syndrome infectieux compatible avec une leptospirose et, d'autre part, des patients fournis par le réseau de surveillance de la dengue, pour lesquels les tests virologiques se sont révélés négatifs. La définition retenue correspond à la norme de surveillance OMS A27 [16] qui définit la leptospirose comme une maladie fébrile aiguë comportant des céphalées, des myalgies et une prostration, associée à au moins un symptôme parmi les suivants : méningite, ictère, suffusion conjonctivale, hémorragie, éruption cutanée, syndrome rénal, cardiaque ou pulmonaire.

Pour chaque patient recruté, un recueil d'informations démographiques, épidémiologiques et cliniques a été effectué et reporté sur une fiche individuelle d'enquête.

### Prélèvements

Les patients ont fait l'objet au minimum d'un prélèvement sanguin (5 ml sur tube sec), obtenu si possible à partir du septième jour de la maladie pour que les anticorps soient décelables. Chaque fois que possible, un échantillon plus précoce, pour la recherche de l'ADN bactérien par PCR, a été collecté. Les prélèvements effectués ont été centrifugés, puis conservés à +4 °C ou –20 °C, selon le délai de conservation avant transfert par voie terrestre à l'IPC, puis aérienne sous carboglace jusqu'à l'IPNC.

### Algorithme du diagnostic biologique et tests utilisés

#### Sérologie IgM

L'IPC a utilisé une technique immunoenzymatique de détection des IgM (Leptospira IgM Elisa, PanBio, Australie). Ce test utilise une microplaque sensibilisée avec des antigènes de *Leptospira biflexa*. Il a fait l'objet de plusieurs évaluations qui ont conclu à des valeurs de sensibilité et spécificité supérieures à 90 % [19,20]. En conséquence, son utilisation est légitime pour le dépistage.

#### PCR

La PCR a été réalisée à l'IPC sur les échantillons précoces selon une technique de nested-PCR ciblant le gène *rrs* (ARN ribosomal 16s) de *Leptospira* d'après Mérien et al. [12]. La technique de confirmation en temps réel effectuée à l'IPNC utilise le gène *lfb1* selon le protocole de Mérien et al. [14].

#### MAT

La confirmation des patients positifs en IgM et la détermination présomptive des sérovars ont été effectuées par le test de

référence mis en œuvre à l'IPNC sur les échantillons positifs en IgM transmis par l'IPC. Le MAT dérive de l'ancienne réaction d'agglutination-lyse mise au point par Martin et Pettit en 1918, utilisant des souches vivantes de *Leptospira* [6,13]. Les sérogroupes circulant au Cambodge étant inconnus, une batterie complète de 23 sérovars a été utilisée [14]. Ce panel comprend un sérovar de l'espèce *L. biflexa*, germe saprophyte qui réagit habituellement par réaction croisée avec l'ensemble des sérogroupes incluant les espèces de *Leptospira* pathogènes. La dilution de dépistage est le 1/50, le seuil de positivité le 1/100 et l'identification présomptive du séroroupe infectant correspond au sérovar ayant donné le plus haut titre agglutinant.

### Classification biologique des cas

La classification proposée reprend celles utilisées à Hawaï [8] et en Nouvelle-Calédonie [2].

#### Cas probable

Patient ayant présenté sur un prélèvement unique ou sur deux successifs, mais sans variation significative, un test sérologique positif (IgM ou MAT à un titre supérieur au 1/100 pour un sérovar pathogène). Même si des arguments épidémiologiques ou cliniques peuvent renforcer la présomption du diagnostic, ce type de résultat peut correspondre à la cicatrice immunologique d'une leptospirose ancienne, en particulier pour les MAT avec un titre inférieur au 1/800.

#### Cas confirmé

Défini par au moins l'une des situations ci-après :

- mise en évidence du génome de la bactérie (PCR) sur un échantillon précoce ;
- séroconversion en IgM ou MAT sur deux prélèvements itératifs, avec dans le cas du MAT le passage d'un titre agglutinant négatif à au moins 1/400 ;
- ascension nette du titre en MAT : variation d'un facteur 4 entre deux prélèvements itératifs du titre agglutinant pour un sérovar pathogène.

### Éthique médicale

Le projet a reçu l'accord du comité d'éthique du ministère de la Santé du Cambodge, lors de sa session de mai 2006.

Chaque patient a été informé de l'enquête. Son inclusion était conditionnée par son consentement éclairé ou celui d'un tuteur légal pour les mineurs.

### Exploitation statistique

L'ensemble des données démographiques, épidémiologiques et biologiques ont été traitées de façon anonyme par les logiciels ÉpiInfo™ 2000 et Microsoft Office Excel 2003.

## Résultats

### Patients

Six cent douze patients ont été inclus dans l'étude entre juin 2006 et juillet 2007. Il s'agit, en grande majorité, de personnes recrutées à l'hôpital de Takéo (86 %), les participations de l'hôpital Calmette et du réseau de surveillance de la dengue ne représentant respectivement que 4 et 10 %. Cette population se compose de 299 hommes (49 %) et 313 femmes (51 %), d'âge moyen 37,1 ans (extrêmes : 9 mois–84 ans). Les hommes recrutés sont significativement plus jeunes que les femmes (moyennes respectives : 35,3 et 38,8 ans ;  $p = 0,025$ ).

### Prélèvements

Selon les données recueillies, le prélèvement sanguin initial a été obtenu 4,3 jours après le début des symptômes (délai connu pour 410 patients), le second à 6,9 jours (délai connu pour 365 des 541 patients ayant fait l'objet de deux prélèvements).

Si ces délais moyens sont acceptables pour la détection par PCR sur l'échantillon précoce et la recherche d'anticorps sur le second, ils sont en revanche trop rapprochés pour objectiver une variation significative de titres du fait de la brièveté de l'hospitalisation.

### Résultats biologiques globaux

Trente pour cent des patients (183 sur 612) sont porteurs d'au moins un marqueur biologique de la leptospirose. Quatre-vingt-huit d'entre eux montrent une PCR positive, 111 ont présenté des IgM et 16 patients sont porteurs simultanément des deux marqueurs.

Les échantillons positifs en IgM ont fait l'objet d'un MAT, après transfert des sérums vers l'IPNC. Parmi eux, 50 % (56) ont montré un taux d'agglutinines détectable vis-à-vis d'au moins un sérovar pathogène du panel utilisé. Enfin, parmi les 55 prélèvements dont le résultat du MAT a été considéré négatif, 21, soit 38 %, montrent des agglutinines à un titre supérieur ou égal au 1/100 avec la souche témoin de l'espèce *L. biflexa* (souche *L. semaranga* patoc Patoc I).

### Classification biologique des cas de leptospirose identifiés

Selon les critères décrits précédemment, 88 patients sont des cas confirmés et 95 des cas probables (Tableau 1).

Quatre-vingt-sept des 111 patients porteurs d'IgM ont bénéficié d'un deuxième prélèvement. Aucune séroconversion ou augmentation significative du titre définissant un cas confirmé n'a pu être constatée, probablement en raison du délai moyen trop court entre les deux échantillons. Parmi les 56 qui

**Tableau 1** Profils biologiques de la leptospirose retrouvés chez les patients recrutés (enquête leptospirose au Cambodge, 2006–2007) / *Leptospirosis biological profiles among 612 patients recruited (hospital based leptospirosis survey, Cambodia, 2006–2007)*

Diagnostic sérologique et moléculaire de la leptospirose	PCR	IgM	MAT (résultat titre agglutinant le plus élevé)			Provenance				
			> 50 pour le serovar non pathogène seul <sup>a</sup>	> 50 et < 800 pour un serovar pathogène	≥ 800 pour un serovar pathogène	Site hôpital de Takeo	Site hôpital Calmette	Patients réseau dengue	Total	
Profil négatif	Neg <sup>b</sup>	Neg	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	365	15	49	429	
Profils observés	Profils de phase aiguë	POS <sup>c</sup>	Neg	Non réalisé	Non réalisé	71	1	0	72	
		POS	POS	Non	Non	4	0	0	4	
		POS	POS	Oui	Non	Non	2	0	0	2
	Profils de phase immune :	POS	POS	Indifférent	Oui	Non	8	0	0	8
		POS	POS	Indifférent	Non	Oui	2	0	0	2
		Neg	POS	Non	Non	Non	20	1	9	30
		Neg	POS	Oui	Non	Non	16	1	2	19
	Total profils négatifs	Neg	POS	Indifférent	Oui	Non	31	4	3	38
		Neg	POS	Indifférent	Non	Oui	6	1	1	8
							365	15	49	429
						(70,1 %)				
Total profils de phase aiguë						87	1	0	88 (14,4 %)	
Total profils de phase immune						73	7	15	95 (15,5 %)	
Total porteurs d'au moins un marqueur biologique de la leptospirose						160	8	15	183	
						(29,9 %)				

<sup>a</sup> *Leptospira biflexa* (souche Semarang patoc Patoc I). <sup>b</sup> Négatif. <sup>c</sup> Positif.

présentent simultanément des IgM et un MAT positif, seulement dix montrent des titres agglutinants au 1/800 ou plus. Deux de ces patients montrent en particulier des titres très élevés : 1/25 600 et 1/102 400 (séro groupe Australis) ; le patient avec le titre le plus élevé présente également une PCR positive.

### Caractéristiques épidémiologiques des 183 patients porteurs d'au moins un marqueur biologique de la leptospirose

#### Sexe

Ces patients se répartissent en 85 hommes et 98 femmes, soit 28,4 % de l'ensemble des hommes de l'étude et 31,3 % des femmes. Les profils précoces, avec une PCR positive, représentent 14 % des hommes et 14,7 % des femmes. Aucune de ces différences de proportions entre les deux sexes n'est significative.

#### Âge

L'âge moyen de ces patients est de 37,2 ans avec des extrêmes de 3,5 et 84,5 ans (donnée disponible pour 179 des 183 patients, Tableau 2). Les femmes sont significativement plus âgées (moyenne : 39,9 ans et 34 chez les hommes,  $p = 0,029$ ). Cette différence est superposable à celle décrite

dans la population totale recrutée. De même, la courbe de répartition des porteurs d'ADN et/ou d'IgM par classes d'âges, présentée à la Figure 1, montre une distribution bimodale, superposable à celle de la population d'étude.

#### Profession

L'étude des catégories socioprofessionnelles, lorsqu'elles sont déclarées sur les fiches de renseignement des 612 patients de l'étude, fait état d'une forte majorité d'agriculteurs (80,3 %), suivis par la catégorie des jeunes de moins de 20 ans (7,2 %). L'appartenance à ces deux groupes n'est pas significativement associée à un risque majoré vis-à-vis de la leptospirose (Tableau 3).

#### Autres données

Les facteurs d'exposition environnementaux et les données cliniques sont trop souvent absents des questionnaires ou imprécis pour pouvoir donner lieu à une interprétation significative et ne sont de fait pas rapportés.

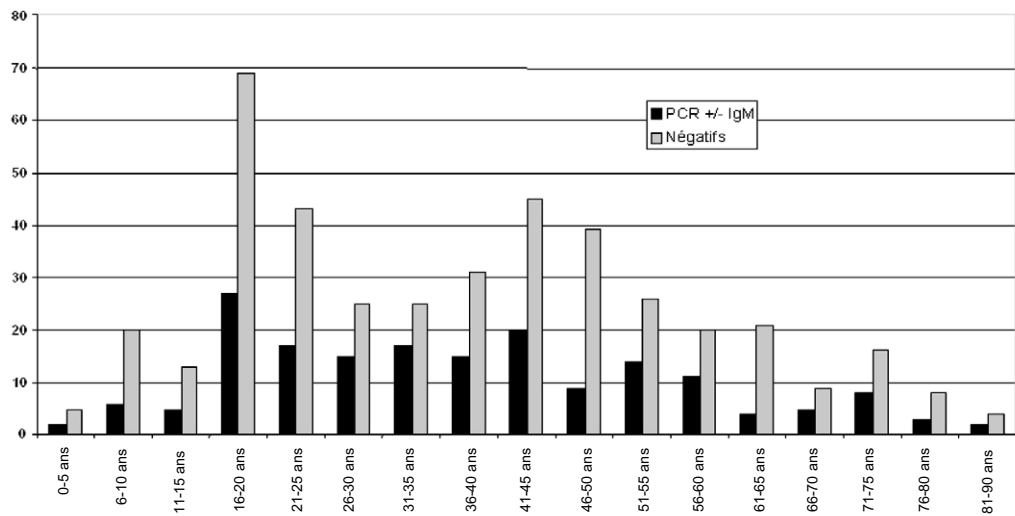
#### Distribution des sérogroupes pathogènes de *Leptospira* rencontrés

Les 56 prélèvements ayant présenté un MAT positif ont permis d'identifier de façon présomptive 13 sérogroupes

**Tableau 2** Âge moyen (ans), selon le sexe, des patients porteurs ou non d'un marqueur biologique de la Leptospirose (données connues pour 599 des 612 patients, enquête leptospirose au Cambodge, 2006–2007) / *Mean age (years) of patients exhibiting or not leptospirosis biological markers, according to their sex (data available for 599 patients among 612, hospital based leptospirosis survey, Cambodia, 2006–2007)*

	Population totale de l'étude		Patients positifs en PCR et/ou IgM		Patients négatifs en PCR et IgM		$p^a$
	Effectif	Âge moyen	Effectif	Âge moyen	Effectif	Âge moyen	
Femmes	311	38,8	98	39,9	213	38,2	ns
Hommes	288	35,2	81	34	207	35,7	ns
Total	599	37,1	179	37,2	420	37	ns

<sup>a</sup> Comparaisons de moyennes, test de Student.



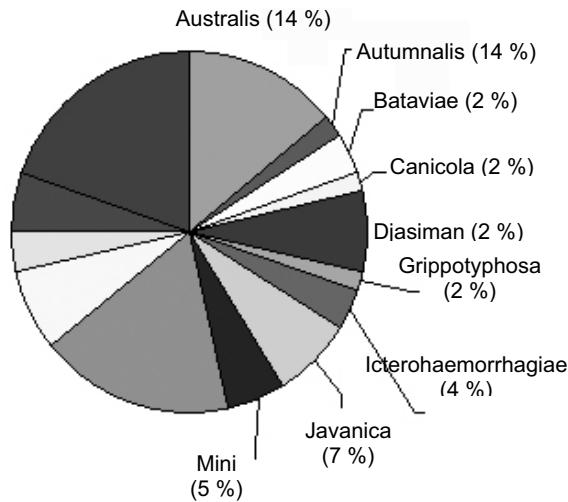
**Fig. 1** Répartition par classes d'âges des patients porteurs ou non du génome de *Leptospira* et/ou d'IgM spécifiques (enquête leptospirose au Cambodge, 2006–2007) / *Age class distribution of patients with or without Leptospira biological markers (hospital based leptospirosis survey, Cambodia, 2006–2007)*

**Tableau 3** Répartitions des patients porteurs ou non du génome de *Leptospira* et/ou d'IgM spécifiques selon le sexe ou la catégorie socioprofessionnelle (enquête leptospirose au Cambodge, 2006–2007) / *Distribution of patients with or without Leptospira biological markers according to their occupation and sex (hospital based leptospirosis survey, Cambodia, 2006–2007)*

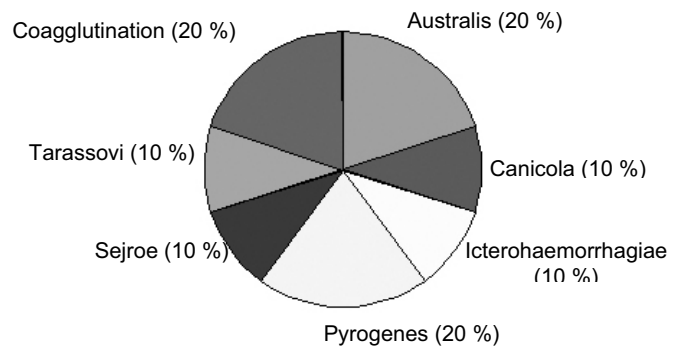
Patients ( $n = 612$ )		Effectif total	Effectif positif en PCR et/ou IgM	Pourcentage	$p^a$
Profession	Employé du bâtiment	3	0	–	–
	Fonctionnaire	3	1	–	–
	Ouvrier	1	1	–	–
	Paysan	471	147	31,2	0,14 (ns)
	Enfants < 18 ans	66	14	21,2	0,09 (ns)
	Commerce et services	4	1	–	–
	Retraité	1	1	–	–
	Non renseignée	63	18	28,6	–
Sexe	Homme	299	85	28,4	0,43 (ns)
	Femme	313	98	31,3	

<sup>a</sup> Test de  $\chi^2$  de Mantel Haenszel.

2a



2b



**Fig. 2** Répartition des sérogroupes de *Leptospira* identifiés parmi 56 patients présentant un test MAT positif pour au moins un sérovar pathogène (Fig. 2a) et parmi les dix montrant un titre élevé ( $\geq 1/800$ ), compatible avec une infection en cours ou récente (Fig. 2b). (Enquête Leptospirose au Cambodge, 2006–2007) / Distribution of *Leptospira* serogroups, identified among 56 patients presenting with a positive MAT test for at least one pathogenic serovar (Fig. 2a) and among 10 of them showing titers  $\geq 1/800$ , compatible with an acute or recent infection (Fig. 2b) [hospital based leptospirosis survey, Cambodia, 2006–2007]

différents circulant au sein de cette population (Fig. 2a). Six de ces sérogroupes se retrouvent chez les dix patients avec un titre agglutinant élevé (1/800 ou plus) compatible avec une infection actuelle ou récente (Fig. 2b).

Les sérogroupes retrouvés le plus souvent sont *L. panama* (17,9 %), *L. australis* (14,3 %), *L. djasiman* (7,1 %) et *L. javanica* (7,1 %). Le sérotype *L. icterohaemorrhagiae* ne concerne que 3,6 % des 56 patients présentant un MAT positif. Ces données sont toutefois susceptibles d'une sous-évaluation en raison de coagglutinations, ne permettant pas de désigner le sérotype le plus vraisemblablement responsable de l'infection dans 19 % des profils sérologiques.

## Discussion

### Données préexistantes sur la leptospirose au Cambodge

La littérature ne recense actuellement que deux publications sur la leptospirose au Cambodge.

Parmi les études régionales mentionnées plus haut, celle de Laras et al., en 2002, inclut un groupe de 202 patients recrutés à l'hôpital national pédiatrique de Phnom-Penh par le réseau de surveillance de la dengue et des fièvres hémorragiques en 1999–2001. Dépistés selon un algorithme identique à celui de la présente étude, 24 patients (12 %) se sont

révélés porteurs d'IgM, cinq montraient une PCR positive, et enfin le MAT n'a été retrouvé positif que pour deux d'entre eux à des titres faibles (sérogroupes *L. icterohaemorrhagiae* et *L. hurstbridge*) [11]. Plus récemment, l'étude de Seng et al., en 2007, montrait une prévalence de 9,1 % des marqueurs de la leptospirose (MAT ou PCR) parmi 121 patients de l'hôpital de Takéo, recrutés en 2003 selon la définition de cas de l'OMS. Quatre seulement d'entre eux avaient un MAT positif, également à un titre faible, pour les sérogroupes *L. javanica* et *L. australis* [17].

Avec 612 patients recrutés, dont 29,9 % sont porteurs d'un marqueur biologique de la leptospirose, notre étude est donc à ce jour la plus vaste menée au Cambodge sur cette pathologie.

De nombreuses études conduites dans des populations rurales de la zone intertropicale retrouvent des taux de séroprévalence en MAT et/ou IgM du même ordre : 18,8 % au Vietnam, delta du Mékong (1998) [18], 15 % au Nicaragua (2000) [1], 15,2 % au Brésil (2008) [10] et jusqu'à 23,9 % dans une zone inondable du Laos (2008) [9].

### Qualification des cas de leptospirose dépistés

Dans une population recrutée sur des critères cliniques évocateurs, la prévalence des marqueurs biologiques de la leptospirose s'est révélée significative (29,9 %). Près de la moitié de ces patients (88 sur 183) présente un profil compatible avec une infection aiguë, objectivée par une PCR positive, qui rend clairement compte de l'importance de cette

pathologie, pourtant méconnue au Cambodge. Cette proportion est de plus probablement sous-évaluée en raison de conditions préanalytiques non optimales de conservation et de transport des prélèvements, souvent difficiles à contrôler, qui ont pu être à l'origine de faux-négatifs par dégradation de l'ADN bactérien.

Les 95 patients présentant un profil de phase immune, et notamment les 87 montrant simultanément des IgM et un MAT négatif ou positif à titre faible, peuvent s'interpréter comme des séroconversions débutantes ou atténuées par la prise précoce d'antibiotiques [6]. Il peut également s'agir de profils cicatriciels d'une leptospirose plus ancienne pouvant dater de quelques mois à un an, compte tenu de la persistance habituelle des anticorps par les deux méthodes (un an après une infection aiguë, Brandão et al. retrouvent des anticorps détectables dans 100 % des cas par MAT et dans 67 % par Elisa-IgM [5]).

Concernant les patients n'ayant montré qu'un test IgM isolément positif, trois situations peuvent rendre compte d'un tel profil :

- l'existence de faux-positifs par la technique Elisa, quoi que les données de spécificité publiées pour ce test soient régulièrement satisfaisantes (94 et 98 %, respectivement dans les études de Zochowski et al. [20] et de Winslow et al. [19] : en conséquence, cette situation est possible dans notre série, mais probablement marginale ;
- le décalage de la positivité des deux techniques sérologiques en début d'infection : l'Elisa IgM est positif dès le sixième ou septième jour suivant l'apparition des symptômes, alors que le MAT ne l'est habituellement que vers neuf à dix jours [5,6] ;
- une infection par un séovar immunologiquement distant de ceux inclus dans la batterie d'antigènes utilisée pour le MAT. En effet, bien que celle-ci couvre l'ensemble des sérogroupes de l'espèce *L. interrogans*, il est possible que les souches représentatives choisies ne reconnaissent pas certains leptospires en circulation au Cambodge. Cette hypothèse est confortée par la forte proportion de prélèvements montrant une agglutination isolée avec la souche représentative de *L. biflexa* à un titre au 1/100 ou plus (19 des 49 patients présentant des IgM, mais un MAT négatif pour les séovars pathogènes, soit 39 %). Cette hypothèse ne pourrait être vérifiée que par l'isolement de souches locales obtenues par mise en culture de prélèvements précoces.

### Importance des formes infra- ou subcliniques

La mise en évidence de profils sérologiques compatibles avec une leptospirose plus ou moins ancienne suggère l'existence au Cambodge de fréquentes présentations cliniques indifférenciées, voire asymptomatiques, l'inclusion des

patients résultant alors des diagnostics différentiels de la leptospirose, nombreux dans le contexte cambodgien. Cette notion a été confirmée par des études réalisées dans des zones considérées comme fortement endémiques. Une enquête cas-témoins conduite aux Seychelles en 1999, retrouve, parmi les 101 patients témoins, 37 % de séropositifs en MAT [4]. Une enquête en population générale faite au Nicaragua au décours d'une épidémie montre que seulement 29 % de patients séropositifs en IgM rapportent un épisode fébrile dans les deux mois précédant le prélèvement [1]. Enfin, parmi 43 personnes surexposées en Thaïlande lors du curage d'un étang (probable situation d'hyperexposition) et présentant des IgM, seules 17 (39 %) ont fait une forme clinique de la maladie [15]. Ces situations suggèrent qu'une exposition permanente en zone d'endémie pourrait conduire à l'acquisition d'une protection immune partielle, limitant de façon significative l'expression clinique d'infections successives par les leptospires.

### Modes d'exposition et répartition des cas par âges et sexes

Le mode d'exposition aux leptospires n'a pas fait l'objet d'analyses poussées dans cette étude. Cependant, il semble assez évident que les populations rurales du Cambodge, parmi lesquelles ont été recrutés les patients de cette étude, sont exposées de façon continue dans leur vie quotidienne, comme décrit dans les publications régionales déjà citées concernant le Vietnam [18], le Laos [9] ou la Thaïlande [15]. Venant corroborer ce type de contamination, plus environnemental que lié à un exercice professionnel particulier, aucun lien statistique n'a pu être mis en évidence entre le portage d'un marqueur de la leptospirose et l'appartenance à un sexe, une classe d'âge ou une catégorie socioprofessionnelle particulière. On peut donc assimiler la population exposée aux leptospires à la population générale.

### Distribution des sérogroupes pathogènes

La mise en évidence de 13 sérogroupes différents reflète la variété d'hôtes réservoirs présents au Cambodge et justifie la mise en œuvre d'études vétérinaires pour mieux les décrire. Le séro groupe *L. panama* est retrouvé avec une fréquence de 18 %, comparable à ce qui avait été trouvé (15,2 %) dans le delta du Mékong en 1999 [18]. Le séro groupe *L. bataviae*, prédominant dans cette même étude et également le plus fréquent dans l'étude régionale de Laras et al. [11], n'est retrouvé qu'à hauteur de 4 % au Cambodge. Enfin, on remarquera la faible proportion représentée par le séro groupe *L. icterohaemorrhagiae*, habituellement dominant dans la plupart des séries et classiquement associé aux formes graves de la maladie.

## Conclusion

Cette étude est, à ce jour, la plus vaste conduite au Cambodge sur la leptospirose. Le protocole ciblant en priorité des formes hospitalisées typiques de leptospirose (selon la définition OMS) a permis d'évaluer la fréquence des infections en cours à 14,4 % des patients recrutés. L'existence de profils sérologiques compatibles avec des infections anciennes confirme le caractère endémique de cette infection, probablement lié à une exposition permanente et intense de la population. L'absence de mise en évidence de groupes surexposés confirme bien cette notion. Dans ce faciès épidémiologique, décrit dans la zone intertropicale, notamment en Asie du Sud-Est, les formes asymptomatiques ou indifférenciées de la maladie sont probablement nombreuses. Elles n'excluent cependant pas la survenue d'une forme grave, qui doit être évoquée comme diagnostic différentiel des autres pathologies infectieuses majeures et endémiques au Cambodge. Cette situation justifie pleinement la nécessité d'une expertise biologique disponible localement pour le diagnostic de confirmation de la leptospirose.

Enfin, cette étude suggère la nécessité de travaux complémentaires pour décrire les réservoirs animaux et la caractérisation précise des souches locales de *Leptospira*.

**Remerciements** Les auteurs tiennent à remercier les médecins hospitaliers impliqués dans cette étude : Dr J.B. Dufourcq à l'hôpital Calmette, les Drs Mam. Mony et Me Piseth de l'hôpital de Takéo, les personnels des instituts Pasteur, en particulier : Dr P. Buchy, Dr Ong Sivuth, Dr Srey Chan Than et Dr Son Sary de l'IPC et à l'IPNC ; l'équipe des diagnostics spécialisés : Mmes Lecuyer, Giraut, Massenet.

Ce travail a bénéficié d'un financement de la fondation de l'Institut Pasteur (ACIP A/6/2005).

**Conflit d'intérêt** : aucun.

## Références

- Ashford DA, Kaiser RM, Spiegel RA, et al (2000) Asymptomatic infection and risk factors for Leptospirosis in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63:249–254
- Berlioz-Arthaud A, Merien F, Baranton G (2007) Bilan de cinq années de surveillance biologique de la leptospirose humaine en Nouvelle-Calédonie (2001–2005). *Bull Soc Pathol Exot* 100: 133–8 [[http://www.pathexo.fr/SPE/abstract.php?id\\_article = 4371](http://www.pathexo.fr/SPE/abstract.php?id_article = 4371)]
- Bounlu K, Insiengmay S, Vanthanouvong K, et al (1998) Acute jaundice in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Clin Infect Dis* 27:717–21
- Bovet P, Yersin C, Merien F, et al (1999) Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *Int J Epidemiol* 28:583–90
- Brandão AP, Camargo ED, da Silva ED, et al (1998) Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 36:3138–42
- Brouqui P, Baranton G, Raoult D (1990) Les leptospiroses. Éditions Techniques. *Maladies infectieuses* 8039 Q<sup>10</sup>. *Encycl Med Chir (Paris-France)*:1–10
- Heisey GB, Nimmanitya S, Karnchanachetane C, et al (1988) Epidemiology and characterization of leptospirosis at an urban and provincial site in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 19:317–22
- Katz AR, Effler PV (2003) "Probable" versus "confirmed" leptospirosis: an epidemiologic and clinical comparison utilizing a surveillance case classification. *Ann Epidemiol* 13:196–203
- Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, et al (2008) Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg* 78:957–61
- Lacerda HG, Monteiro GR, Oliveira CC, et al (2008) Leptospirosis in a subsistence farming community in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:1233–8
- Laras K, Cao BV, Bounlu K, et al (2002) The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg* 67:278–86
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, et al (1992) Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30:2219–24
- Mérien F, Berlioz-Arthaud A (2005) La leptospirose, une zoonose sous surveillance en Nouvelle-Calédonie et dans le Pacifique. *Rev Fr Lab* 374:45–50
- Mérien F, Portnoi D, Bourhy P, et al (2005) A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 249:139–47
- Phraisuwan P, Whitney EA, Tharmaphornpilas P, et al (2002) Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg Infect Dis* 12:1455–9
- OMS/WHO (2000) WHO recommended surveillance standards, World Health Organization, second ed. WHO/CDS/CSR/ISR/99.2: A27 Leptospirosis
- Seng H, Sok T, Tangkanakul W, et al (2007). Leptospirosis in Takeo Province, Kingdom of Cambodia, 2003. *J Med Assoc Thai* 90:546–51
- Van CT, Thuy NT, San NH, et al (1998) Human leptospirosis in the Mekong delta, Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 625–8
- Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL (1997) Evaluation of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of immunoglobulin M Antibody in Diagnosis of Human Leptospirosis. *J Clin Microbiol* 35:1938–42
- Zochowski WJ, Palmer MF, Coleman TJ (2001) An evaluation of three commercial kits for use as screening methods for the detection of leptospiral antibodies in the UK. *J Clin Pathol* 54:25–30