

Uvéites équine et leptospirose

Equine uveitis and leptospirosis

Par Anne-Marie DESBROSSE⁽¹⁾, Mélanie MIERE⁽²⁾, Stéphane PRONOST⁽³⁾ et François VALON⁽⁴⁾
(communication présentée le 3 avril 2003)

RÉSUMÉ

La relation entre l'uvéite équine et la leptospirose peut être établie de différentes manières : soit par isolement du germe, soit par la recherche d'anticorps agglutinants (test de micro-agglutination ou MAT) lors de taux très élevés obtenus d'emblée ou d'une cinétique de ces taux très positive, soit par détection des anticorps dirigés contre les protéines de leptospires autres que les lipo-polysaccharides (Dot-Blot), soit par la technique d'amplification génique (Polymerase Chain Reaction). Ce sont les résultats obtenus par ces différentes méthodes qui sont discutés ici.

Mots-clés : leptospirose équine, test de micro-agglutination sur lame ou MAT, technique de Dot-Blot, amplification génique.

SUMMARY

The connection between equine uveitis and leptospirosis can be established using various techniques: isolation of the organism; detection of agglutinative antibodies (micro-agglutination test or MAT) provided antibody levels are very high or rising very fast; detection of antibodies directed against leptospiral proteins other than lipopolysaccharides (Dot-Blot); and finally by genic amplification (Polymerase Chain Reaction). The results obtained with these various methods are discussed here.

Key words: equine leptospirosis, micro-agglutination test, Dot-Blot, Polymerase Chain Reaction.

Note

(1) 61, Av. de Paris – 78000 Versailles ;

(2) 31, rue Santos Dumont – 75015 Paris ;

(3) Labo Franck Duncombe – 14053 Caen cedex 04 ;

(4) clinique vét. du parc de Brière – 44117 St-André-des-Eaux

• INTRODUCTION

L'uvéite est la première cause de cécité dans l'espèce équine. Dans notre propre clientèle d'ophtalmologie équine (cas référés de la moitié nord de la France en majorité), les uvéites représentent 36,5 % des cas d'ophtalmologie : soit 365 chevaux sur 1000 chevaux examinés en 16 ans. Sur l'ensemble des cas d'uvéites, 1/3 sont des uvéites « actives » (aiguës ou sub-aiguës, ou récidives avec inflammation) et 2/3 sont des complications ou des séquelles (cataracte, glaucome avec ou sans luxation du cristallin, hypoglobulie, phtisi bulbi, synéchies iriennes) entraînant souvent la perte visuelle du côté atteint. L'origine leptospirique de l'uvéite est recherchée par des méthodes indirectes : test de Micro-Agglutination (MAT), Dot-Blot ou Western Blot, à partir de différents prélèvements oculaires (sérum, humeur aqueuse, vitré) ou par des méthodes directes : isolement de leptospires pathogènes (à partir de l'humeur aqueuse et surtout du vitré, plus rarement de l'urine) et utilisation de la Polymerase Chain Reaction (PCR) sur des prélèvements de sang (sérum), de l'humeur aqueuse, du vitré ou de cellules conjonctivales (écouvillons conjonctivaux, raclages de conjonctive). Le but de cet exposé est de donner, dans un premier temps, un résumé des travaux de recherche effectués par nos confrères allemands et américains ces dernières années et les conclusions auxquelles ils sont parvenus. Dans un deuxième temps, nous parlerons des résultats des différents examens effectués sur les chevaux atteints d'uvéite qui nous ont été référés.

• MÉTHODES

Le test de Micro-Agglutination (MAT):

Mis au point par Martin et Pettit en 1918, il consiste à évaluer le degré d'agglutination provoqué par des anticorps (Ac) sériques sur une culture de leptospires. Cette technique permet le titrage des anticorps ainsi que l'identification des souches incriminées. Elle permet d'observer des résultats positifs 10 à 12 jours après l'apparition des signes cliniques. Il est usuel de procéder à deux examens à 2 ou 3 semaines d'intervalle afin de mettre en évidence une cinétique des anticorps (JEULLAIN, 1996). Le seuil de détection des Ac est de 1/200 chez le cheval. Un taux de 1/400 au minimum, voire plutôt 1/800, est considéré comme significatif d'une infection en cours. En général le nombre de serovars diminue entre les deux prélèvements, car les co-agglutinines sont de moins en moins nombreuses (ANDRE-FONTAINE, 1998). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle demande un entretien rigoureux et permanent des souches de leptospires d'une part, et qu'elle est très opérateur-dépendant d'autre part car l'interprétation des résultats est basée sur le pourcentage de leptospires agglutinés, la taille des agglutinats et le nombre de leptospires libres sur la préparation observée au micro-

scope à fond noir. Sur le plan biologique, le MAT ne détecte que les Ac agglutinants, ne différencie pas les animaux infectés de ceux vaccinés et ne peut donner de résultat positif que pour les souches testées. Une souche pathogène inhabituelle peut donc ne pas être mise en évidence : c'est le cas de la souche Pomona non testée au laboratoire de Madame André-Fontaine à Nantes. De même un individu ayant une faible réponse immunitaire ne sera pas considéré comme infecté s'il ne possède pas suffisamment d'anticorps. Enfin, pour les uvéites, les Ac agglutinants ne sont pas toujours présents dans le sérum à des titres significatifs, surtout si l'animal a reçu des antibiotiques. Enfin le MAT ne détecte que les Ac induits par le lipopolysaccharide (LPS). D'autres Ac dirigés contre la membrane externe des leptospires seraient plus spécifiques de l'état d'infectiosité de l'animal et ce, à des stades chroniques ou tardifs. Ces protéines ont notamment été étudiées par la technique du Dot-Blot, par Mme Fontaine (GITTON *et al.*, 1992 ; ANDRE -FONTAINE, 1998).

La technique de Dot-Blot :

Méthode de diagnostic indirect, elle permet la détection d'Ac dirigés contre des protéines de leptospires obtenues dans un extrait dépourvu de LPS. Les antigènes (Ag) sont fixés au préalable sur une membrane de nitrocellulose et après fixation des anticorps spécifiques, le complexe Ag-Ac est révélé par une réaction colorimétrique sous forme d'un point coloré (dot). Ce test est plus sensible que le MAT et plus facile à interpréter. Les premiers résultats obtenus tendent à montrer que ces anticorps détectés correspondraient à une réaction spécifique lors de cas récidivants. Cette technique permettrait donc la mise en évidence de cas chroniques lorsque souvent le résultat du MAT est faible (GITTON *et al.*, 1992 ; BREM *et al.*, 1998 ; BREM *et al.*, 1999 ; GERHARDS, WOLLANKE et BREM, 1999).

La technique de PCR :

La PCR ou « Polymerase Chain Reaction » a été découverte par Kary Mullis en 1983 et depuis cette date plusieurs tests spécifiques des leptospires ont été développés (MERIEN *et al.*, 1993 ; MERIEN, BARANTON et PEROLAT, 1995). La PCR ou amplification génique consiste en une synthèse d'ADN *in vitro*. Cette étape permet la visualisation de matériel génétique présent initialement en trop faible quantité. Après une phase d'extraction des acides nucléiques à partir d'un prélèvement biologique suspect, un ou plusieurs fragment(s) du génome extrait sont amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques. A chaque cycle d'amplification, la quantité de matériel génétique ciblé est multiplié par deux. On réalise classiquement 35 à 40 cycles d'amplification pour obtenir 2^{35} à 2^{40} copies. Il est ensuite possible de visualiser par différentes techniques,

Note

(1) Monsieur Roland Moal, Inspecteur Général Honoraire des Services Vétérinaires, 14 Résidence du Clos de Verrières, 91370 Verrières le Buisson.

dont la plus classiquement utilisée est l'électrophorèse en gel d'agarose, la présence de fragments de génome. L'amplification génique est donc une méthode directe au même titre que la culture, par opposition aux méthodes indirectes que sont le MAT ou le Dot-Blot. C'est une technique d'une grande sensibilité et spécificité qui est rapide à mettre en oeuvre. Jusqu'alors, ce test permettait la détection de tous les leptospires mais ne permettait pas de différencier les leptospires pathogènes des non pathogènes (PRONOST *et al.*, 2000). Des tests sont actuellement en développement pour permettre une détection plus spécifique. LUCCHESI, PARMA et ARROYO (2002) s'attachent à amplifier un fragment codant pour une protéine dont certains épitopes sont similaires à des protéines de la cornée (renforçant l'hypothèse de l'existence de phénomènes auto-immuns dans le mécanisme des uvéites récidivantes (ERU = Equine Recurrent Uveitis des Anglo-Saxons). L'équipe de Mme André-Fontaine travaille sur des fragments codant pour des protéines externes de la membrane capables d'induire une protection croisée contre de nombreux sérogroupe pathogènes (BRANGER *et al.*, 2001).

• RÉSULTATS

Test de Micro-Agglutination (MAT):

Utilisé en sérologie dès 1940, ce test a montré que les taux d'anticorps anti-leptospires étaient plus élevés chez les animaux atteints d'uvéite, que chez les chevaux normaux (HALLIWEL et HINES, 1985 ; HALLIWEL *et al.*, 1985 ; MATTHEWS, WAITKINS et PALMER, 1987 ; DWYER, CROCKETT et KALSOW, 1995 ; WOLLANKE, RORHBACH et GERHARDS, 2001). Pour nous, entre 1994 et 2002, sur 150 chevaux testés, 42% sont nettement positifs avec des titres supérieurs ou égaux à 1/800 ; 28% ont des titres faibles (1/200, 1/400) ; 30% sont négatifs. Par contre, les équipes allemandes des universités de Munich et de Hanovre (WOLLANKE *et al.*, 1998 ; WOLLANKE, RORHBACH et GERHARDS, 2001) ont montré qu'à partir de prélèvements de vitré, sur 270 yeux de chevaux atteints d'uvéite, 80% ont des titres d'anticorps très élevés (1/800, 1/1600... jusqu'à 1/102400 soit 512 fois le taux de départ de 1/200). Dans le sérum, seulement 44% de ces mêmes chevaux ont des titres supérieurs ou égaux à 1/400. Sur 37 chevaux sains, 19% ont une sérologie supérieure ou égale à 1/400 ; dans le vitré, seulement deux chevaux sur 37 ont eu un titre d'anticorps de 1/100. Par ailleurs, ces chercheurs ont pu isoler le germe *Leptospira Interrogans* à partir du vitré de 120 chevaux sur 229 atteints d'uvéite (126 yeux sur 252, soit 50%). Ceci montre bien que le vitré est un réservoir terminal de leptospires, au même titre que les tubules rénaux.

« Polymerase Chain Reaction » ou PCR :

FABER *et al.* (2000) ont identifié l'ADN leptospiroïque dans l'humeur aqueuse de 21 des 30 chevaux atteints d'uvéite, soit 70% des cas (33 yeux sur 55) ; sur 16 chevaux sans uvéite, 1 seul cheval a été positif, et ils ont isolé le germe *Leptospira Interrogans* sur 5 de ces chevaux. Il résulte de ces études que les leptospires persistent dans les tissus et les sites immunologiques privilégiés que sont la chambre antérieure de l'œil et le vitré. Dans sa thèse, Mélanie MIERE (2000) a comparé les résultats des deux méthodes diagnostiques que sont la PCR et le MAT obtenus à la fois sur 70 chevaux atteints d'uvéite en 2000 et 2001 et sur 77 chevaux exempts de tout symptôme de maladie oculaire et en bon état général (population témoin) pendant la même période. Sur les 70 chevaux à uvéites, 77% ont au moins un résultat positif (soit en MAT, soit en PCR, soit avec les deux techniques). En MAT, sur 62 chevaux testés, 30 ont une positivité supérieure ou égale à 1/200 (48% de positifs). Les serovars les plus représentés sont surtout australis (21%) et bratislava (17%). Puis 372 (séro-groupe australis), grippotyphosa, 19 (séro-groupe ictéro-hémorragiae). En PCR, sur les 70 chevaux testés, 46 sont positifs (soit 65%). Cependant, la répartition des positifs en PCR n'est pas corrélée significativement avec celle des MAT et ce, quel que soit le type de prélèvement utilisé : sérum, urine, écouvillonnages conjonctivaux ou raclages de conjonctive. Il faut préciser que le sérum est exceptionnellement positif en PCR ; l'urine est fréquemment positive dans les cas chroniques ; les écouvillons conjonctivaux se trouvent plus fréquemment positifs dans les cas aigus ou sub-aigus. Pour ce qui est de la population témoin, l'urine est positive en PCR dans 28,5 % des cas ; le MAT est positif à 1/200 dans 48 % des cas. Si on prend le taux de 1/800, il y a seulement 18 % de positifs sur un effectif de 82 chevaux (Ecole Militaire de Paris). On peut conclure que les chevaux à uvéite ont un plus fort taux de positivité dans les deux tests réunis (MAT et PCR), qu'ils ont un pourcentage de positivité plus grand en MAT seul, par rapport à la population-témoin et également un pourcentage de positivité plus important en PCR seule ; mais la correspondance entre les positifs forts en MAT et en PCR n'existe pas. Désormais des tests plus spécifiques de la recherche de leptospires pathogènes par PCR se mettent en place dans différents laboratoires, en France et à l'étranger et nous permettront peut-être de mieux appréhender le rôle de la leptospirose dans les uvéites équinées. Ce sera sans doute l'objet d'une nouvelle étude à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRE-FONTAINE G (1998) *Leptospirose*. Rapport d'activité diagnostique, Unité de Pathologie Infectieuse, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 1994-1998.
- BRANGER C, SONRIER C, CHATRENET B, KLONJKOWSKI B, RUOVEN-CLOUET N, AUBERT A, ANDRE-FONTAINE G, ELOIT M (2001) Identification of the hemolysis-associated protein I as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immunol.* **69** (11), 6831-8.
- BREM S, GERHARDS H, WOLLANKE B, MEYER P, KOPP H (1998) Demonstration of leptospires within the eyes of four horses with recurrent iridocyclitis. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.*, **111**, 415-417.
- BREM S, MEYER P, KOPP H, WOLLANKE B, GERHARDS H (1999) Intraocular leptospira isolation in horses suffering from ERU. In : International Leptospirosis Society, 2nd Meeting, Marysville, Australia.
- DWYER AE, CROCKETT RS, KALSOW CM (1995) Association of leptospiral activity and elevated aqueous humour antibody titer to *Leptospira Interrogans* serovar autumnalis. *Equine Pract.*, **11**, 41-43.
- FABER NA, CRAWFORD M, LEFEBVRE RB, MADIGAN JE, BUYUKMIHCI NC (2000) Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humour of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol.*, **38**, 2731-2733.
- GERHARDS H, WOLLANKE B, BREM S (1999) Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis. In: *AAEP Proceedings*, Albuquerque, **45**, 89-93.
- GITTON X, DAUBIE MB, ANDRE F, GANIERE JP, ANDRE-FONTAINE G (1992) Immunoblotting study of antigenic relationships among eight serogroups of *Leptospira*. *Vet. Microbiol.*, **32**, 293-303.
- HALLIVEL RE, HINES MT (1985) Studies in recurrent uveitis. I: levels of immunoglobulin and albumin in the aqueous humor of horses with and without intraocular disease. *Curr. eye res.*, **4**, 1023-1031.
- HALLIVEL RE, BRIM TA, HINES MT (1985) II: the role of infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *Curr. eye res.*, **4**, 1033-1040.
- JEULLAIN D (1996) La Leptospirose équine : exploitation d'une enquête sérologique. Thèse Méd.Vet., Nantes ; 150 pages.
- LUCCHESI PM, PARMA AE, ARROYO GH (2002) Serovar distribution of DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *BMC Microbiol.*, **2**, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/3>.
- MATTHEWS AG, WAITKINS SA, PALMER MF (1987) Serological study of leptospiral infections and endogenous uveitis among horses and ponies in the United Kingdom. *Equine Vet. J.*, **19**, 125-128.
- MERIEN F, BARANTON G, PEROLAT P (1995) Comparison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination test and Culture for diagnosis of *Leptospira*. *J. Infect. Dis.*, **172**, 281-285.
- MERIEN F, PEROLAT P, MANCEL E, PERSAN D, BARANTON G (1993) Detection of *Leptospira* DNA by Polymerase Chain Reaction in aqueous humor from a patient with unilateral uveitis. *J. Infect. Dis.*, **168**, 1335- 1336.
- MIERE M (2002) *Contribution à l'étude de la leptospirose chez le cheval : confrontation de deux méthodes diagnostiques (MAT et PCR) dans le cadre des uvéites*. Thèse Med. Vet., Alfort ; 138 pages.
- PRONOST S, MAILLARD K, LEGENDRE MF, FORTIER G *et al.* (2000) Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la Leptospirose. In : *Congrès AVEF*, Strasbourg, 8, 9, 10 déc. 2000.
- WOLLANKE B, ROHRBACH BW, GERHARDS H (2001) Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira Interrogans* from horses with recurrent uveitis. *JAVMA*, **219**, (6), 795 – 800.
- WOLLANKE B, GERHARDS H, BREM S *et al.* (1998) Intraocular and serum antibody titers of leptospiral serovars in 150 horses subjected to vitrectomy because of equine recurrent uveitis (ERU). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.*, **111**, 134-139.