

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 61, No 1 (2010)



Leptospirosis: An important re-emerging infection of animals and man

G. BISIAS (Γ. ΜΠΙΣΙΑΣ), S. K. KRITAS (Σ.Κ. ΚΡΗΤΑΣ), A. BURRIEL, B. KONTOS (Β. ΚΟΝΤΟΣ)

doi: [10.12681/jhvms.14879](https://doi.org/10.12681/jhvms.14879)

To cite this article:

BISIAS (Γ. ΜΠΙΣΙΑΣ) G., KRITAS (Σ.Κ. ΚΡΗΤΑΣ) S. K., BURRIEL, A., & KONTOS (Β. ΚΟΝΤΟΣ) B. (2017). Leptospirosis: An important re-emerging infection of animals and man. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(1), 76–84. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14879>

■ **Leptospirosis: An important re-emerging infection of animals and man**

Bisias G.¹, DVM, **Kritas S. K.²**, DVM, PhD, DipECPHM,
Burriel A.³, DVM, MSc, MSc, PhD, MRCVS, **Kontos V.⁴**, DVM, PhD

¹ *Directory of Veterinary Services of East Attica*

² *Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki*

³ *Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly*

⁴ *National School of Public Health*

■ **Λεπτοσπείρωση: Ένα «νεο-αναδυόμενο» σημαντικό νόσημα των ζώων και του ανθρώπου**

Γ. Μπίσιας¹, DVM, **Σ. Κρήτας²**, DVM, PhD, DipECPHM,
Α. Μπουριέλ³, DVM, MSc, MSc, PhD, MRCVS, **Β. Κοντός⁴**, DVM, PhD

¹ *Δ/νση Κτηνιατρικής Ανατολικής Αττικής*

² *Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*

³ *Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

⁴ *Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας*

ABSTARCT. Leptospirosis, a re-emerging infection of animals and man, is caused by one of 200 serotypes of *Leptospira* spp. The genus is currently divided into eight pathogenic species, infecting various animal species and man, either clinically or subclinically. Natural hosts of the microorganism are traditionally, but not exclusively, considered to be rodents. Infected animals excrete *Leptospira* in the environment, where it may remain for long periods of time, especially if temperatures are about 25°C. The reported prevalence of infected animals from around the world is between 2% and 46%. In Greece, recent reports show a seropositivity among abortion cases of small ruminants around 25%, while the relevant percentage among apparently healthy food producing animals is between 5.7% and 16.2%. The most prevalent serotypes were Bratislava, Australis and Copenhageni, depending on the animal species. There is a need for more systematic study of the infection in Greece (especially with the possibility of the expected climatic changes to result in a temperature rise).

Keywords: review, leptospirosis, zoonosis, farm animals

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η λεπτοσπείρωση, μια «νεο-αναδυόμενη» μόλυνση των ζώων και του ανθρώπου, προκαλείται από τον μικροοργανισμό *Leptospira* spp. Το γένος *Leptospira* περιλαμβάνει τουλάχιστον 200 ορότυπους, με μηδαμινή ή ελάχιστη αντιγονική συγγένεια, οι οποίοι ταξινομούνται σε 8 παθογόνα είδη, που προκαλούν κλινική ή υποκλινική νόσο. Φυσιική δεξαμενή του μικροοργανισμού στο περιβάλλον θεωρούνται κυρίως τα τρωκτικά, αλλά φορείς είναι και πολλά άλλα είδη ζώων. Οι φορείς απεκκρίνουν το μικροοργανισμό με τα ούρα τους, μολύνοντας το περιβάλλον. Στο περιβάλλον ο μικροοργανισμός επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα, όταν η θερμοκρασία παραμένει γύρω στους 25°C. Το ποσοστό μόλυνσης των ζώων στις διάφορες

Correspondence: Bisias G.

Directory of Veterinary Services of East Attica, 14th km, Marathonos Av., Pallini, Attica, Athens, Greece
Tel.: +30-210-6033391, Mob.: 6936705138, Fax: +30-210-6665703, E-mail: gbisias@yahoo.gr

Αλληλογραφία: Γ. Μπίσιας

Διεύθυνση Κτηνιατρικής Ανατολικής Αττικής
14^ο χλμ. Λεωφ. Μαραθώνος, Παλλήνη Αττικής
Τηλ.: 210-6033391, Κιν.: 6936705138, Fax: 210-6665703, E-mail: gbisias@yahoo.gr

Submission date: 13.01.2010
Approval date: 17.02.2010

Ημερομηνία υποβολής: 13.01.2010
Ημερομηνία εγκρίσεως: 17.02.2010

χώρες κυμαίνεται από 2% έως 46% ανάλογα με το είδος ζώου και την περιοχή. Στην Ελλάδα, πρόσφατες αναφορές στην οροθετικότητα περιστατικών αποβολών μικρών μηρυκαστικών, υποδηλώνουν ποσοστό μόλυνσης γύρω στο 25%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά μεταξύ φαινομενικά υγιών παραγωγικών ζώων κυμαίνεται από 5,7% έως 16,2%. Συχνότεροι ορότυποι βρέθηκαν να είναι οι Bratislava, Australis και Copenhageni. Στην Ελλάδα απαραίτητη είναι η συστηματικότερη μελέτη της λεπτοσπειρώσης, άρα και η δημιουργία επιστημονικής και τεχνολογικής υποδομής (κυρίως λόγω των πιθανών κλιματικών αλλαγών).

Λέξεις ευρετηρίασης: βιβλιογραφική ανασκόπηση, λεπτόσπειρα, ζωνόσος, εκτρεφόμενα ζώα

Ο αιτιολογικός παράγων και οι ιδιαιτερότητές του

Η λεπτοσπειρώση είναι ένα σημαντικό νόσημα των ζώων και του ανθρώπου, το οποίο προκαλείται από ορότυπους διάφορων παθογόνων ειδών του γένους *Leptospira*. Το γένος *Leptospira* ανήκει στην οικογένεια *Leptospiraceae* και αποτελείται, σύμφωνα με τις πρόσφατες ταξινομικές αναπροσαρμογές, από οκτώ παθογόνα είδη, τρία ενδιάμεσα, έξι μη παθογόνα και δύο που δεν έχουν ακόμη ικανοποιητικά ταξινομηθεί (WHO 2003, Morey et al. 2006). Το γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε περισσότερους από 200 χαρακτηριστικούς ορότυπους, οι οποίοι ανήκουν κατά κάποιους (Vijayachari et al. 2004, Morey et al. 2006) σε 23 αντιγονικά διακριτές ομάδες, ενώ κατά άλλους σε 25 (WHO, 2003). Διαχρονικά, και από την αναγνώριση του μικροοργανισμού ως σημαντικού παθογόνου στα διάφορα είδη ζώων και στον άνθρωπο (Sambasiva et al. 2003), ένας σημαντικός αριθμός ορότυπων έχει χαρακτηριστεί ως περισσότερο ή λιγότερο παθογόνος στα διάφορα είδη ζώων (Levett 2004). Ο βαθμός παθογένειας του καθενός εξ αυτών και η κατά γενική ομολογία αποδεκτή προσσαρμογή κάποιων σε συγκεκριμένα είδη ζώων (Mahajan and Chabra 2008, Vijayachari et al. 2008), δυσκολεύουν ακόμη περισσότερο την επιδημιολογική μελέτη του μικροοργανισμού, και άρα την εκτίμηση της οικονομικής του σημασίας και της αντίστοιχης σημασίας του για τη Δημόσια Υγεία (Morey et al. 2006, WHO 2006). Μάλιστα, η μελέτη της διασποράς των ορότυπων στη φύση είναι άκρως ενδιαφέρουσα, αφού καθορίζει τη επιζωτιολογία του κάθε ορότυπου στα ευπαθή είδη ζώων.

Διασπορά του μικροοργανισμού στη φύση

Πολλά είδη ζώων, τρωκτικών και μη, θεωρούνται φυσικοί ξενιστές του μικροοργανισμού (Bunnell et al. 2000, Michel et al. 2002, Turk et al. 2003, Cox et al. 2005, WHO 2006). Ο μικροοργανισμός εγκαθίσταται και παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα στα εσπειραμένα σωληνάκια του νεφρού (WHO 2003). Μέσω αυτών περνάει στα ουροφόρα σωληνάκια, στο

ούρο και τελικά στο περιβάλλον (Monahan et al. 2009). Στους νεφρούς των ζώων-φορέων, ο μικροοργανισμός μπορεί να μείνει για το υπόλοιπο της ζωής του ζώου, το οποίο καθίσταται με τον τρόπο αυτό μόνιμη πηγή μόλυνσης του περιβάλλοντος (WHO 2003, WHO 2006). Το έδαφος και οι συλλογές ύδατος μολύνονται, με αποτέλεσμα να γίνονται πηγές μόλυνσης για άλλα είδη ζώων, ευπαθή και μη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σε αυτό το περιβάλλον ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση του μικροοργανισμού, κυρίως όταν η μέση ετήσια θερμοκρασία είναι 22°C και η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ θέρους και χειμώνα δεν υπερβαίνει τους 5°C (WHO 2006). Άρα, η λεπτοσπειρώση είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό νόσημα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Pappas et al. 2008), ενώ στον υπόλοιπο κόσμο εμφανίζει εξάρσεις εποχικές (άνοιξη και φθινόπωρο) ή μετά από βροχόπτωση μεγάλης διάρκειας (Sanders et al. 1999, Leal-Castellanos et al. 2003, Levett 2004).

Η μελέτη της διασποράς του μικροοργανισμού στη φύση αποκαλύπτει την έκταση του ποσοστού μόλυνσης των διαφόρων ειδών ζώων από έναν ή περισσότερους ορότυπους του γένους *Leptospira* (Baker T.F. 1989, Ciceroni et al. 2000, Epsi et al. 2000, Burriel et al. 2002, Burriel et al. 2003, Szeredi et al. 2006, Hamir et al. 2001, Richardson and Gauthier 2003, Ortega-Pacheco et al. 2008, Kawaguchi et al. 2008). Η διασπορά αυτή διαφέρει από χώρα σε χώρα, αλλά και από περιοχή σε περιοχή εντός της ίδιας χώρας. Η τόσο μεγάλη διακύμανση στη συχνότητα παρουσίας των ορότυπων εγείρει πολλά ερωτηματικά για τους παράγοντες που την επηρεάζουν. Μεταξύ αυτών ιδιαίτερη σημασία έχει η προσσαρμογή των ορότυπων στο είδος του ζώου, η φυσική αντοχή των ξενιστών ζώων σε έναν ορότυπο, πιθανότατα αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (κλίμα, υγρασία, γεωργική δραστηριότητα), αλλά και τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού, που ορίζουν την παθογένεια του κάθε ορότυπου και έχουν ελάχιστα μελετηθεί

(Plank and Dean 2000, Szeredi and Haake 2006, Faria et al. 2007, Ortega-Pacheco et al. 2008).

Παθογενετικοί μηχανισμοί του γένους *Leptospira*

Η μόλυνση ενός ζώου ή του ανθρώπου από έναν παθογόνο ορότυπο εκδηλώνεται με δύο μορφές:

Την οξεία ή ικτερική και τη χρόνια ή μη ικτερική.

Και οι δύο μορφές είναι ανάλογες του είδους του ζώου, των συνθηκών διαβίωσης, κυρίως όταν πρόκειται για παραγωγικά ζώα, του κτηνιατρικού ιστορικού του ζώου ή της ομάδας ζώων (εμβολιασμένα ή μη, προηγούμενη πιθανή μόλυνση ή μη) και βέβαια, όπως προαναφέρθηκε, της λοιμογόνου ικανότητας του μολύνοντα ορότυπου (Plank et al. 2000, Szeredi and Haake 2006, WHO 2006, Faria et al. 2007, Ortega-Pacheco et al. 2008).

Ειδικότερα, ως κλινικές εκδηλώσεις της οξείας μορφής μπορούν να θεωρηθούν, πέραν του θανάτου, η εμφάνιση ίκτερου και αιμοσφαιρινουρίας, η μηνιγγίτιδα, η γενική κατάρρευση λόγω νεφρικής ανεπάρκειας, ακόμη και η αμφοτερόπλευρη αγγαξία των μαστών των μηρυκαστικών (Plank et al. 2000, WHO 2006, Szeredi and Haake 2006, Ortega-Pacheco et al. 2008). Ως κλινικές εκδηλώσεις της χρόνιας μορφής μπορούν να θεωρηθούν οι πιο ήπιες εκδηλώσεις της αντίστοιχης οξείας μορφής, καθώς επίσης οι αποβολές και γεννήσεις νεκρών ή ασθενικών νεογνών (Vemulapalli et al. 2005, Bomfim and Koury 2006, Leon et al. 2006, Szeredi and Haake 2006, Saglam et al. 2008). Επίσης, κλινική εκδήλωση της χρόνιας μορφής θεωρείται και η χαρακτηριστική πανοφθαλμίτιδα των σαρκοφάγων (Townsend et al. 2006), του ανθρώπου (Gupta et al. 2007) και των ιπποειδών (Faber et al. 2000).

Ανεξάρτητα της κλινικής εικόνας της χρόνιας μορφής, ιδιαίτερη σημασία για την εργαστηριακή διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης έχει η μακροχρόνια εγκατάσταση του μικροοργανισμού σε ιστούς που συνήθως προσβάλλει, όπως οι νεφροί (Baker et al. 1989, Faria et al. 2007, Ortega-Pacheco et al. 2008, Monahan et al. 2009) και το γεννητικό σύστημα των ζώων (Szeredi and Haake 2006, Saglam et al. 2008). Αυτή η εντόπιση, αλλά και οι ιδιαιτερότητες απομόνωσής της λεπτόσπειρας δυσκολεύουν πολύ την εργαστηριακή διερεύνηση της λοίμωξης (Vemulapalli et al. 2005, Szeredi and Haake 2006, Bomfim and Koury 2006, Leon et al. 2006, Ortega-Pacheco et al. 2008, Saglam et al. 2008). Για τους ίδιους λόγους είναι

δύσκολο να εντοπιστούν τα ζώα φορείς, που μπορεί να παραμείνουν αφανείς δεξαμενές του μικροοργανισμού, αλλά και να νοσήσουν, αν κάποιοι παράγοντες καταπόνησης επιτρέψουν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου.

Άρα, η μελέτη της διασποράς των ορότυπων στη φύση και οι μηχανισμοί παθογένειας του μικροοργανισμού εξαρτώνται από πληθώρα παραγόντων, που είναι δύσκολο να προσδιοριστούν, να ταξινομηθούν και να διερευνηθούν σε βάθος, ώστε να επιτρέψουν την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης βλάβης των ιστών ξεχωριστά από τους διάφορους ορότυπους. Το αποτέλεσμα αυτών των δυσκολιών είναι:

1. Η μη συστηματική μελέτη του μικροοργανισμού σε χώρες που δεν έχουν την οικονομική και τεχνολογική υποδομή να τον απομονώσουν και να τον μελετήσουν ερευνητικά

2. Ο περιορισμός των μελετών στην απλή ορολογική διερεύνηση των ορότυπων του μικροοργανισμού στα διάφορα είδη ζώων και

3. Η παραγωγή τεχνογνωσίας (εμβόλια) που είναι αποτέλεσμα των ευρημάτων της ερευνητικής δραστηριότητας των χωρών αυτών που την χρηματοδοτούν, της οποίας η χρήση μπορεί να μην είναι αποτελεσματική σε άλλες χώρες και περιοχές.

Η αδυναμία εθνικών φορέων να επενδύσουν οικονομικά στη συστηματική μελέτη των επιπτώσεων της μόλυνσης από το μικροοργανισμό οδηγεί σε έλλειψη σημαντικών επιδημιολογικών και επιζωτιολογικών πληροφοριών ως προς τη διασπορά των κυριότερων ορότυπων σε κάθε είδος ζώου ξεχωριστά και για συγκεκριμένες περιοχές. Η έλλειψη αυτή, καθώς και η μη διερεύνηση της σημαντικότητας αυτών σε θέματα οικονομίας και Δημόσιας Υγείας, έχει ως αποτέλεσμα ελλείψεις ως προς την ικανοποιητική προφύλαξη από τον μικροοργανισμό. Για παράδειγμα, τα εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα για την προστασία των σκύλων δεν καλύπτουν το 60%, αφού είναι οροθετικοί και σε μη εμβολιασμένους ορότυπους. Το ίδιο αναμένεται και για τα παραγωγικά ζώα, αν οι παραγωγοί χρησιμοποιήσουν προληπτικά τα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια, αφού φαίνεται ότι οι ορότυποι που είναι σημαντικοί στην Ελλάδα διαφέρουν αυτών άλλων χωρών (Burriel et al. 2003).

Τα προβλήματα αυτά θα μπορούσαν να ξεπεραστούν, αν υπήρχε ειδικός φορέας αφιερωμένος στη μελέτη του μικροοργανισμού, μέσω του οποίου θα

ήταν δυνατή η απομόνωση και διατήρηση σημαντικών ορότυπων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή αποτελεσματικότερων εμβολίων (αντεμβολίων). Για να δημιουργηθεί, όμως, τέτοιος φορέας στην Ελλάδα, πρέπει πρώτα να γίνει αποδεκτή η μεγάλη σημασία της λεπτοσπείρωσης στη Δημόσια Υγεία και οι μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις της.

Η σημασία της λεπτοσπείρωσης στη δημόσια υγεία

Ο άνθρωπος μολύνεται από την άμεση ή έμμεση επαφή του με τα ζώα φορείς, κατοικίδια και άγρια. Επειδή το υγρό περιβάλλον και θερμοκρασίες γύρω από τους 25°C (WHO 2006) συντηρούν το μικροοργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, η λεπτοσπείρωση ήταν γνωστή ως νόσημα των φτωχών αγροτών των τροπικών και υποτροπικών χωρών, κυρίως αυτών που εργάζονται στους ορυζώνες. Επίσης, είναι πολύ συχνή μεταξύ των κτηνοτρόφων, οι οποίοι προσβάλλονται είτε από το μολυσμένο περιβάλλον είτε από την άμεση επαφή τους με μολυσμένα υλικά που αποβάλλονται κατά τον τοκετό ή την αποβολή (Natarajaseenivasan et al. 2002, WHO 2002). Σε αυτήν τη στερεοτυπική αντίληψη των ομάδων πληθυσμών υψηλού κινδύνου έρχεται να προστεθεί η ομάδα των φυσιολατρών, κυρίως όσων ασχολούνται με τα υδάτινα σπόρ και την ορειβασία ή τους περιπάτους σε ορεινές περιοχές. Σε όλες τις παραπάνω ομάδες πλειοψηφούν οι άνδρες, άρα είναι αυτοί που καταλήγουν συχνότερα στο νοσοκομείο από λεπτοσπείρωση. Στην Ελλάδα, τα δηλωμένα στο **Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων** (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ) περιστατικά ανδρών είναι εξαπλάσια των γυναικών (προσωπική επαφή).

Επιπλέον, τα δηλωμένα στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ζώων (ΟΙΕ) κρούσματα επιβεβαιωμένης λεπτοσπείρωσης για το 2008, που αφορούν στην Ελλάδα, ανέρχονται σε 13 ανά 100.000 κατοίκους, ήτοι ποσοστό 0.122%. Το ποσοστό αυτό κατατάσσει τη λεπτοσπείρωση στη χώρα μας πέμπτη σε σειρά σημαντικότητας μεταξύ των κυριότερων ζωνοδόσων του ανθρώπου. Από τα δηλωμένα κλινικά κρούσματα στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ φαίνεται μια σαφής ετήσια αύξηση των περιστατικών κατά τη δεκαετία 1998-2008, με το συνολικό δηλωμένο αριθμό να ξεπερνά τα 250 άτομα (Μπουριέλ, προσωπική επαφή). Αυτή μπορεί μεν να οφείλεται στην παγκοσμίως παρατηρούμενη τάση αύξησης των δηλωμένων κρουσμάτων, λόγω πιθανώς αύξησης των ποσοστών μόλυνσης, αλλά είναι πιθα-

νότερα αποτέλεσμα του αυξημένου επιστημονικού ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω ύπαρξης νέων και πιο εύχρηστων μεθόδων ορολογικής διερεύνησης της μόλυνσης (Sanders et al. 1999, Plank et al. 2000, Leal-Castellanos et al. 2003, Natarajaseenivasan et al. 2004, Dounghawee et al. 2008, Pappas et al. 2008).

Φαίνεται, όμως, ότι τα κρούσματα που δηλώνονται είναι μάλλον «η κορυφή του παγόβουνου», κάτι που ίσως να ισχύει και για τη χώρα μας.

Η οικονομική σημασία της λεπτοσπείρωσης των παραγωγικών ζώων

Από τη διεθνή βιβλιογραφία διαφαίνεται ότι το ποσοστό μόλυνσης των ζώων στις διάφορες χώρες κυμαίνεται από 2% έως 46% ανάλογα με το είδος ζώου (Ciceroni et al. 2000, Epsi et al. 2000, Burriel et al. 2002, Michel et al. 2002, Burriel et al. 2003, Leal-Castellanos et al. 2003, Talbada et al. 2003, Richardson and Gauthier 2003, Faria et al. 2007, Salina-Melendez et al. 2007, Kawaguchi et al. 2008). Με δεδομένη αυτήν την τεράστια διακύμανση του συνολικού επιπολασμού, που εξαρτάται άμεσα από τη χώρα, την περιοχή και το είδος του ζώου, δύσκολα μπορεί να αποφανθεί κάποιος για το ποιοι ορότυποι έχουν τη μεγαλύτερη επιδημιολογική σπουδαιότητα.

Από τις κλινικές εκδηλώσεις, οικονομικά σημαντικότερες για τους εκτροφείς φαίνεται να είναι αυτές που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα (Levett 2004, Bomfim M.R. Q 2006, Saglam Y.S. 2008). Τα προβλήματα αγονιμότητας και αποβολών των μηρυκαστικών, τα οποία μπορούν να πάρουν επιζωτιολογική μορφή μαζικότητας (θύελλα αποβολών), έχουν διττή οικονομική επίπτωση, αφού τελικά καταλήγουν σε μείωση της κρεατοπαραγωγής όσο και της γαλακτοπαραγωγής – η μόλυνση των μηρυκαστικών εκδηλώνεται και ως αγαλαξία (Guitian et al. 2001, WHO 2002, Tooloei et al. 2008). Από τη σκοπιά της ετήσιας απόδοσης σε κρέας ανά ζώο – όπως «μεταφράζεται» από τον αριθμό των τοκετών – φαίνεται ότι οι εκτροφές βοοειδών και χοίρων είναι αυτές που υφίστανται τις μεγαλύτερες οικονομικές επιπτώσεις. Αυτά δε τα είδη παραγωγικών ζώων είναι και μεταξύ των περισσότερων ευπαθών στη λεπτοσπείρωση. Τα πρόβατα θεωρούνται ανθεκτικότερα, ακόμα και από τις αίγες (ΟΙΕ Terrestrial Manual 2008, Lilenbaum et al. 2009). Ωστόσο, ούτε αυτά είναι απαλλαγμένα του κινδύνου της οικονομικής ζημιάς, κυρίως αν βοσκήσουν σε περιοχές υψηλού κινδύνου.

Στην Ελλάδα, οι οικονομικές επιπτώσεις από τη λεπτοσπείρωση των ζώων δεν είναι γνωστές. Η λεπτοσπείρωση αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1932 (Petzetakis 1932), ενώ μια δεύτερη αναφορά γίνεται το 1955 (Karakasevic 1955). Το 1987 γίνεται η πρώτη αναφορά σε σημαντικούς ορότυπους, που αφορούσαν στη μόλυνση χοίρων (Sarris et al. 1987). Οι Burriel et al. (2002) διαπίστωσαν μεταξύ μικρών μηρυκαστικών ότι από τα 129 πρόβατα που απέβαλαν, τα 31 ήταν θετικά σε έναν ή περισσότερους ορότυπους της *Leptospira* spp, ενώ από τις 109 αίγες που απέβαλαν, οι 25 ήταν θετικές. Οι ορότυποι που εμφανίζονταν συχνότερα ήταν οι Bratislava, Australis, Autumnalis και Copenhageni. Το 2003, ορολογική διερεύνηση στην Ελλάδα επεκτάθηκε σε περισσότερα είδη ζώων (Burriel et al. 2003) και αφορούσε φαινομενικά σε υγιή βοοειδή (277), πρόβατα (282), αίγες (198), χοίρους (516) και σκύλους (254). Το ποσοστό των οροθετικών ζώων σε έναν ή περισσότερους ορότυπους ήταν αντίστοιχα 2,6%, 5,7%, 16,2%, 17,8% και 11,4%, ενώ συχνότεροι ορότυποι στα βοοειδή, στα πρόβατα και στους χοίρους ήταν οι Bratislava και Australis, στις αίγες οι Bratislava και Copenhageni και στους σκύλους ο Copenhageni.

Συνεκτιμώντας τα διεθνώς δημοσιευμένα ευρήματα, που αφορούν στις επιπτώσεις της λεπτοσπείρωσης στην παραγωγή και στην ορολογική διερεύνηση της μόλυνσης, που αφορά στην Ελλάδα για τα παραγωγικά ζώα, συμπεραίνεται ότι στην Ελλάδα η λεπτοσπείρωση φαίνεται να είναι μεν σημαντική ως προς τις οικονομικές της επιπτώσεις, δεν είναι, όμως, συστηματικά διερευνημένη, αν και έχει σημασία στη Δημόσια Υγεία. Όπως και σε άλλες χώρες, προφανώς, ο κυριότερος λόγος που δεν διερευνάται είναι οι σημαντικές δυσκολίες που πρέπει να ξεπεραστούν κατά τη μελέτη του μικροοργανισμού.

Τα προβλήματα της μελέτης της λεπτοσπείρωσης

Η μόλυνση των ζώων και του ανθρώπου από παθογόνους ορότυπους του γένους *Leptospira* διερευνάται με **άμεσες** και **έμμεσες** εργαστηριακές μεθόδους αιτιολογικής διάγνωσης.

Οι άμεσες μέθοδοι διάγνωσης περιλαμβάνουν: α) την απομόνωση του μικροοργανισμού από προσβεβλημένους ιστούς και σωματικά υγρά, β) την ανίχνευση αντιγόνων του με μεθόδους ανοσοφθορισμού/ανοσοϊστοχημείας και γ) την ανίχνευση γενετικού του υλικού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) (WHO 2006, Levett 2004).

Η έμμεση διάγνωση βασίζεται σε μεθόδους που ανιχνεύουν στον ορό αίματος τα αντισώματα είτε του μικροοργανισμού, χωρίς διάκριση ως προς τον μολύνοντα ορότυπο, όπως είναι οι μέθοδοι ELISA, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Saglam et al. 2008) και η εστιακή συγκόλληση (spot agglutination test) (Lilenbaum et al. 2002, WHO 2002, Doungchawee et al. 2008) είτε αντισώματα για κάθε ορότυπο, όπως είναι η δοκιμή μικροσκοπικής συγκόλλησης (Microscopic Agglutination Test-MAT) (Levett 2004, WHO 2006). Η τελευταία μέθοδος είναι και διεθνώς η μέθοδος αναφοράς.

Για τη μελέτη των χαρακτηριστικών του μικροοργανισμού (παθογένεια, μηχανισμοί παθογένειας, δομή, προϊόντα κ.λπ.) απαραίτητη είναι η απομόνωση του παθογόνου από τους ιστούς που συνήθως μολύνει. Μετά την απομόνωση απαραίτητη είναι η ταξινόμησή του σε ομοιογενείς ομάδες (ορολογικές ή μοριακές). Αυτή η ταξινόμηση του γένους *Leptospira* απαιτεί εξειδικευμένη γνώση και τεχνική δυνατότητα (Freitas et al. 2004, Morey et al. 2006, Langoni et al. 2008, Slack et al. 2009), αλλά και επιτυχή απομόνωση από σωστά επιλεγμένα δείγματα, η επιλογή και συλλογή των οποίων αξιολογείται συνεκτιμώντας την κλινική εικόνα. Ειδικότερα, αν το ζώο είναι ζωντανό, τα καλύτερα δείγματα είναι σωματικά υγρά (αίμα, ούρο, γάλα) (Freitas et al. 2004). Αν είναι νεκρό, τα καλύτερα δείγματα είναι μη αυτολυμένοι ιστοί με ύποπτες αλλοιώσεις, όπως νεφρός, ήπαρ, πνεύμονας και εγκέφαλος (Sitprija et al. 1980, Baker et al. 1989, Hamir et al. 2001). Στην περίπτωση αποβολής, τα καταλληλότερα δείγματα είναι τα μη αυτολυμένα προϊόντα της αποβολής και κυρίως το έμβρυο. Από την απομόνωση του μικροοργανισμού από τα εσωτερικά όργανα του εμβρύου συνεπάγεται και η μόλυνση της μητέρας (Vemulapalli et al. 2005, Saglam et al. 2008).

Η απομόνωση του μικροοργανισμού γίνεται εφικτή με τη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων, των οποίων η σωστή παρασκευή και σύνθεση τα καθιστά ιδιαίτερα ακριβά (Hookey 1992, Ellis 1986). Τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα επωάζονται στους 29 +/-1°C για τουλάχιστον 16 εβδομάδες και σε περιπτώσεις μη ανάπτυξης του μικροοργανισμού μέχρι και 26 εβδομάδες. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από τον ορότυπο, αλλά και τον αρχικό αριθμό μικροοργανισμών στο δείγμα. Οι λιγότερο επιλεκτικοί ορότυποι, όπως οι Pomona και Grippotyphosa, απαιτούν χρόνο επώασης καλλιέργειών περίπου 10 ημερών (Ellis 1986, Letocart et al. 1997). Άρα, λόγω της αναγκαίας μακροχρόνιας

επώασης των ενοφθαλμισμένων υποστρωμάτων, είναι απαραίτητη η αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων που επιμολύνουν τα θρεπτικά υλικά ή τη θερμοκρασία επώασης (μύκητες). Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται με την προσθήκη διάφορων αντιμικροβιακών ουσιών, οι οποίες, όμως, μπορούν να αναστείλουν και την ανάπτυξη κάποιων ορότυπων του γένους *Leptospira* (Adler et al. 1986, Ellis 1986).

Από τη συνοπτική αναφορά στις καλλιεργητικές απαιτήσεις του μικροοργανισμού, αλλά και των μεθόδων διερεύνησης της μόλυνσης, φαίνεται ότι η περαιτέρω εργαστηριακή και κλινική του μελέτη δεν είναι καθόλου εύκολη υπόθεση. Απαιτεί χρόνο, χρήμα, εξοπλισμό και αφιερωμένο στο σκοπό αυτό επιστημονικό προσωπικό. Άλλωστε η καλλιέργεια του βακτηρίου δεν είναι μόνο διαγνωστική μέθοδος. Αποτελεί και τον μοναδικό τρόπο εργαστηριακού πολλαπλασιασμού του μικροοργανισμού, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για άλλες μεθόδους διάγνωσης (MAT) ή για την παραγωγή αποτελεσματικών εμβολίων (αυτεμβολίων). Άρα, η απομόνωση αποτελεί μια αναντικατάστατη μέθοδο εργαστηριακής μελέτης του μικροοργανισμού, η οποία όμως δεν είναι πάντα εφικτή.

Προσπάθειες ανίχνευσης του μικροοργανισμού έχουν γίνει και με μεθόδους, που διερευνούν την παρουσία αντιγόνων του στους ιστούς. Παραδείγματα είναι οι μέθοδοι του ανοσοφθορισμού (Ellis 1986, Faine et al. 2000) και της ανοσοϊστοχημείας (Saglam et al. 2008, Cox et al. 2005). Η ευαισθησία, όμως, αυτών των μεθόδων επηρεάζεται από την τεχνική και τον αριθμό των μικροοργανισμών στο δείγμα. Επιπλέον, αυτές απαιτούν αντιδραστήρια, όπως ειδικά αντισώματα, η παρασκευή και διάθεση των οποίων δεν είναι εμπορική. Ένα πρόσθετο πρόβλημα των μεθόδων αυτών είναι η αδυναμία μελέτης της διασποράς των παθογόνων ορότυπων στα διάφορα είδη ζώων. Αυτή η αδυναμία αποτρέπει τη λήψη αποτελεσματικότερων μέτρων προφύλαξης.

Οι δυσκολίες μελέτης του μικροοργανισμού συνεχίζουν να υπάρχουν, παρ' όλη την πρόοδο στην υπάρχουσα επιστημονική γνώση, ακόμη και στις χώρες που έχουν καθιερωμένα διεθνώς εργαστήρια αναφοράς στη λεπτοσπειρωση. Στις χώρες αυτές έχει αναπτυχθεί την τελευταία δεκαετία μια έντονη δραστηριότητα στην εξέλιξη της PCR, με την ελπίδα να γίνει η μέθοδος διαγνωστικά αξιόπιστη. Οι διάφορες παραλλαγές της μεθόδου αφορούν είτε την απλή αναγνώριση του γένους *Leptospira* είτε την αναγνώριση

των παθογόνων ειδών του. Προσπάθειες γίνονται, όμως, να αναπτυχθούν τεχνικές PCR, που θα αναγνωρίζουν τους ορότυπους, ώστε να συνδυαστεί η ευαισθησία με την εξειδίκευση του κάθε ορότυπου (Turk et al. 2003, Morey et al. 2006, Langoni et al. 2008, Slack et al. 2009).

Συμπεραίνεται ουσιαστικά ότι η συστηματική μελέτη του μικροοργανισμού απαιτεί συνδυασμό μεθόδων, οι οποίες:

1. ταξινομούν κατ' αρχάς το στέλεχος στην κατηγορία του «παθογόνου» ή μη
2. το χαρακτηρίζουν ως συγκεκριμένο είδος του γένους *Leptospira* και
3. το χαρακτηρίζουν ως προς τον ορότυπο που ανήκει.

Τα τρία ανωτέρω στάδια πλήρους ταξινόμησης του μικροοργανισμού είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν μόνο σε οργανωμένα εργαστήρια που διαθέτουν την απαραίτητη υποδομή, όπως τα κατάλληλα αντιδραστήρια και την απαιτούμενη τεχνογνωσία (Johnson and Harris 1967, Johnson and Faine 1984, Woo T.H. 1997). Η μοιραία κατάληξη είναι για τους περισσότερους ερευνητές που προέρχονται από χώρες, οι οποίες δεν έχουν εθνικά αναγνωρίσει τη σημαντικότητα του μικροοργανισμού να περιορίζονται στη χρήση των έμμεσων (ορολογικών) μεθόδων, αιτιολογικής διάγνωσης της λεπτοσπειρώσεως των ζώων και του ανθρώπου. Αυτές οι μέθοδοι είναι, όπως προαναφέρθηκε, από τις ευκολότερες (ELISA) μέχρι τις δυσκολότερες (MAT). Οι διάφορες ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό του αίματος ειδικών σε παθογόνα είδη του γένους *Leptospira* θεωρούνται γενικώς ευαίσθητες, αλλά δεν διακρίνουν τους εμπλεκόμενους ορότυπους (Cullen et al. 2005, Saglam et al. 2008, Dounghawee et al. 2008). Είναι δε ιδιαίτερα χρήσιμες στην οξεία φάση για κλινικά περιστατικά του ανθρώπου, όπου, με τη γρήγορη ανίχνευση της IgM, παίρνονται και άμεσα μέτρα προστασίας της ζωής του αρρώστου. Στα ζώα, όμως, ο ρόλος των μεθόδων αυτών περιορίζεται κυρίως στην αρχική μαζική και γρήγορη διερεύνηση της μόλυνσης σε ομάδα ζώων, προκειμένου να αποφασιστεί αν συντρέχουν λόγοι περαιτέρω μελέτης των ζώων αυτών με τη μέθοδο MAT.

Μέθοδος MAT

Η μέθοδος MAT είναι η κλασική και επίσημα αναγνωρισμένη από διεθνείς οργανισμούς (Levett

2004, WHO 2006) ορολογική μέθοδος για τη διερεύνηση της μόλυνσης από το γένος *Leptospira*. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη ανεξάρτητα του είδους ζώου, τόσο σε ατομικό όσο και ομαδικό επίπεδο, για τη διερεύνηση της διασποράς των ορότυπων σε μια χώρα ή περιοχή. Όλες οι υπάρχουσες ορολογικές μέθοδοι συγκρίνονται διεθνώς με τη μέθοδο MAT, που βασίζεται στην αρχή της συγκόλλησης του αντιγόνου από τα ειδικά αντισώματα του ορού αίματος. Ως εκ τούτου, η μέθοδος απαιτεί να υπάρχει το κατάλληλο αντιγόνο, που είναι οι διάφοροι ορότυποι του ζωντανού μικροοργανισμού. Επομένως, υπάρχουν δύο βασικά μειονεκτήματα στη μέθοδο. Το ένα είναι η ανάγκη διαρκούς συντήρησης ζωντανών λεπτοσπειρών και το άλλο είναι η βιο-επικινδυνότητα της εκτέλεσης της μεθόδου από μη κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό και σε κακής λειτουργίας-προβληματικού εξοπλισμού διαγνωστικά εργαστήρια. Τα δύο αυτά προβλήματα καθιστούν τη μέθοδο αξιόπιστα εκτελέσιμη μόνο από λίγα εργαστήρια ανά τον κόσμο και από χώρες, που διαθέτουν την εθνική επιστημονική βούληση να επανδρώσουν και να συντηρήσουν ένα αξιόπιστο εργαστήριο αναφοράς στο μικροοργανισμό. Γενικώς, η διαγνωστική αυτή μέθοδος παρουσιάζει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, που χρήζουν μιας σύντομης αναφοράς (Faine et al. 2000, National Veterinary Services Laboratories 1987).

Μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα της MAT

1. Η ειδικότητα της μεθόδου MAT είναι καλή, αφού δεν επηρεάζεται δυσμενώς από αντισώματα άλλων μικροοργανισμών.

2. Η μέθοδος είναι μέχρι σήμερα η καλύτερη και ευκολότερη για τη διερεύνηση της διασποράς των ορότυπων σε μια περιοχή. Άρα, είναι και η καλύτερη για την επιλογή του τρόπου προφύλαξης από τον μικροοργανισμό.

3. Η μέθοδος MAT είναι η καλύτερη για την ανίχνευση της οξείας λεπτοσπειρώσεως με ζεύγη ορών.

4. Η μέθοδος MAT είναι η καλύτερη για την περιγραφή της επιδημιολογικής εικόνας μιας ομάδας ζώων, πάντα με την προϋπόθεση ότι το δείγμα των ζώων που θα εξεταστεί είναι αντιπροσωπευτικό.

5. Ο μεγάλος αριθμός ορότυπων, που απαιτούνται για την αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου MAT, αυξάνει παράλληλα και τη χρησιμότητά της στη μελέτη της διασποράς των ορότυπων

στα είδη ζώων μιας περιοχής/χώρας.

6. Η δυνατότητα της σύγκρισης των τίτλων αντισωμάτων σε κάθε ορότυπο στον οποίο ανιχνεύθηκαν αντισώματα επιτρέπει στον ερευνητή την καλύτερη εκτίμηση της σημασίας ενός ορότυπου σε ένα είδος ζώου συγκρινόμενο με ένα άλλο είδος ή ορότυπο.

7. Η μέθοδος MAT επηρεάζεται από τα εμβολιαστικά αντισώματα σε ζώα που έχουν εμβολιαστεί, π.χ. σκύλοι και χοίροι αναπαραγωγής, άρα η ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προϋποθέτει τη λήψη σωστού ιστορικού.

8. Η μέθοδος MAT απαιτεί ακριβή αριθμό ζωντανών μικροοργανισμών, ηλικίας λίγων ημερών. Άρα, απαιτεί τη συχνή ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού, η οποία με τη σειρά της απαιτεί συχνή επιβεβαίωση των ορότυπων (International Committee on Systematic Bacteriology 1984). Ας σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός διατηρείται καλύτερα σε ψύξη υγρού αζώτου, άρα είναι δυνατή η συχνή ανανέωση των καλλιιεργειών των ορότυπων.

9. Η μέθοδος MAT δεν είναι αξιόπιστη για τη μελέτη της χρόνιας μόλυνσης ή την ανίχνευση φορέων, κυρίως όταν πρόκειται για ορότυπους που έχουν προσαρμοστεί στο εξεταζόμενο είδος ζώου.

10. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου MAT μεγενθύνονται με την αύξηση του αριθμού των παγκοσμίως γνωστών ορότυπων, αλλά και την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συμμετοχή ορότυπων που έχουν τοπικά απομονωθεί.

Συμπέρασμα

Συνεκτιμώντας τα διεθνώς δημοσιευμένα ευρήματα, που αφορούν στις επιπτώσεις της λεπτοσπειρώσεως στην παραγωγή και στην ορολογική διερεύνηση της μόλυνσης στα παραγωγικά ζώα της Ελλάδας, συμπεραίνει κανείς ότι στη χώρα μας η μόλυνση φαίνεται να είναι μεν σημαντική ως προς τις οικονομικές της επιπτώσεις, δεν αποτελεί, όμως, αντικείμενο μελέτης, αν και είναι σημαντική και για τη Δημόσια Υγεία. Ο κυριότερος ρόλος που έχει παραμεληθεί φαίνεται ότι είναι οι υλικοτεχνικές αδυναμίες των υπαρχόντων εργαστηρίων, που θα μπορούσαν να ασχοληθούν με τη μελέτη του μικροοργανισμού.

Διεθνώς, το νόσημα ανήκει πλέον επίσημα στην κατηγορία των «νεο-αναδυόμενων» νοσημάτων σημαντικών για τη Δημόσια Υγεία, αλλά και την οικονομία πολλών χωρών (WHO 2006). Άρα, η ίδρυση

ινστιτούτου ή εργαστηρίου αφιερωμένου στον μικροοργανισμό είναι θέμα εθνικής πολιτικής βούλησης, αφού η αρχική οικονομική, τεχνολογική και επιστημονική επένδυση απαιτεί εγχώριους οικονομικούς πόρους.

Η αναγκαιότητα για μια εθνική πολιτική ως προς τη λεπτοσπειρωση πηγάζει και από την έλλειψη αντιγονικής συγγένειας μεταξύ των πολλών ορότυπων

του μικροοργανισμού, που έχει ως αποτέλεσμα την αναποτελεσματικότητα των εισαγόμενων εμπορικών εμβολίων, αν οι σημαντικοί ορότυποι στη χώρα διαφέρουν, όπως διαφαίνεται (Burriel et al. 2002 και 2003), για ένα μεγάλο ποσοστό ζώων, από αυτούς που υπάρχουν στα εμβόλια της φαρμακευτικής βιομηχανίας. ■

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adler B, Faine S, Christopher WL, Chappel RJ (1986) Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol*, 12:377–381.
- Baker TF, McEwen SA, Prescott JF, Meek AH (1989) The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. *Can J Vet Res* 53:290-294.
- Baskerville A (1986) Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. *Curr. Top. Vet Med Anim Sci.*, 36:33–43.
- Bomfim MRQ, Koury MC (2006) Evaluation of LSSP-PCR for the identification of *Leptospira* spp in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microbiol* 118:278-288.
- Bunell JE, Hice CL, Watts DM, Montrueil V, Tesh RB, Vinetz JM (2000) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg* 63:255-258.
- Burriel AR, Magana-Vougiouka O, Butsini S, Nomikou K, Patakakis M (2002) A serologic investigation of some causes of reproductive failure among small ruminants in Greece. *OJVR*, 1:57-63.
- Burriel AR, Dalley C, Woodward MJ (2003) Prevalence of *Leptospira* species among farmed and domestic animals in Greece. *Vet Rec*, 153:146-148.
- Ciceroni L, Lombardo D, Pinto A, Ciarrocchi S, Simeoni J (2000) Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. *J Vet Med* 47B:217-223.
- Cox TE, Smythe LD and Leung LKP (2005) Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* spp. *J Wildlife Dis*, 41:753-757.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B (2005) Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.* 73:4853–4863.
- Doungchawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inswisai T, Sarasaranee P, Haake DA (2008) Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. *Clin Vaccine Immun* 15:492-498.
- Ellis WA (1986) The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*, Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 13-31.
- Epsi A, Prieto JM, Fernández M, Álvarez M (2000) Serological prevalence of six *leptospira* serovars in cattle in Asturias (North Spain). *Epidem Infect* 124:599-602.
- Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH (2000) *J. Clin Microb* 38:2731-2733.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (2000) *Leptospira* and *Leptospirosis*, Second Edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.
- Faria MT, Athanazio DA, Ramos EAG, Silva EF, Reis MG, Ko AI (2007) Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Path* 137 :231-238.
- Freitas JC, da Silva FG, de Oliveira RC, Delbem ACB, Muller EE, Alves LA and Teles PS (2004). Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. *Ciencia Rural* 34, 853-856.
- Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J, Sanjuan ML, Yus E (2001) Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Veterinary Microbiology* 80:275-284.
- Gupta A, Gulmar PD, Srinivasan R, Kaliaperumar S (2007) Bilateral acute keratouveitis in leptospirosis: A new entity. *Indian J Ophthalmol* 55:399.
- Hamir AN, Hanlon CA, Niezgoda M, Rupprecht CE (2001) The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States. *Can Vet J*, 42:869-871.
- Hookey JV (1992) Detection of *Leptospiraceae* by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 90:267–274.
- International Committee on Systematic Bacteriology (1984). Subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:258–259.
- Johnson RC, Harris VG (1967) Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.*, 94:27–31.
- Johnson RC, Faine S (1984) *Leptospiraceae*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 62–67.
- Karakasevic B 1955 *Leptospirosis epidemic in Strumica (Greece & Yugoslavia)*. *Z Hyg Infectioskr*, 142:27-37.
- Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyokura R, Koizumi N, Akasi H, Vongphracham P, Watanabe H, Aoyama A (2008) Seroprevalence of elptospirosis and risk factor analysis in food-prone rural areas in Lao PDR. *An J Med Hyg* 78:957-961.
- Langoni H, Souza CL, Da Silva AV, Cunha ELP, Silva RC (2008) Epidemiological aspects of leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. *Braz J vet Res anim Sci* 45:190-199.
- Leal-Castellanos CB, Carcia-Suárez R, González-Figueroa E, Fuentes-Allen JL, Escobedo-De La Rena J (2003) Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas Mexico. *Epidemiol Infect* 131:1149-1156.
- Leon A, Pronost S, Tapprest J, Foucher N, Blanchard B, Andre-Fontaine G, Laugier C, Fortier G, Leclercq R (2006) Identification of pathogenic *leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J Vet Diagn Invest* 18:218-221.
- Letocart M, Baranton G, Perolat P (1997) Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes

- produced by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35:248–253.
- Levett PN (2004) Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin Applied Immunol Rev* 4:435–448.
- Lilenbaum W, Ristow P, Fraguas S, A, da Silva ED (2002) Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. *Rev Latinoam Microbiol* 44:124–128.
- Lilenbaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vaconcellos SA (2009) Identification of *Leptospira* spp carriers among seroactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 87:16–19.
- Mahajan S, Chabra D (2008) Leptospirosis: A re-emerging disease. *Veterinary World*, 1:182–185.
- Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G (2002) Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop*, 54:7–10.
- Monahan AM, Callanan JJ and Nally JE (2009) Review paper: Host – pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 46:792–799.
- Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN (2006) Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 44:3510–3516.
- National Veterinary Services Laboratories (1987). Microtitre technique for detection of *Leptospira* antibodies. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 91:65–73.
- Natarajaseenivasan K, Boopalan M, Selvanayagi K, Suresh SR, Ratman S (2002) Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. *Jpn J Infect Dis* 55:170–173.
- Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayagi K, Savalaikarankulam S, Raja S, Ratnam S (2004) Human leptospirosis in Erode, South India: Serology, isolation and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting *Jpn. J. Infect Dis* 57:193–197.
- OIE Terrestrial Manual (2008) Leptospirosis. Chapter 2.1.9 pp 251–264.
- Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF, Gutierrez-Blanco E, Jimenez-Coello M (2008) Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira* species. *Annals of the N. York Academy of Science*, 1149:270–274.
- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N (2008) The globalisation of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis*. 12:351–357.
- Petzetakis M (1932) A propos d'une épidémie de spirochétose ictérohémmorragique à l'île de Syra: origine hydrique del' epidemic presence des spirochetes chez les rats d'égout, en Grèce. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1932; 25:411–416.
- Plank R, Dean D (2000) Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. *Microbes and Infection* 2:1265–1276.
- Richardson DJ, Gauthier JL (2003) A serosurvey of leptospirosis in Connecticut Peridomestic Wildlife. *Vector-born and zoonotic diseases* 3:187–192.
- Sambasiva RR, Naveen C, Bhalla P, Agarwal SK (2003) Leptospirosis in India and the rest of the world. *Braz J Inf Dis*, 7:178–193.
- Saglam YS, Yener Z, Tenur A, Yalcin E (2008) Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research*, 74:119–122.
- Salina-Melendez JA, Narvaez-Arce C, Riojas-Valdes V, Cantu-Covarrubias A, Avalos-Ramirez R, Segura-Correa LC (2007) Sero-prevalence of leptospirosis in beef cattle of Nuevo Leon, Mexico. *J Anim Veter Advances* 6:1265–1268.
- Sanders EJ, Rigau-Perez JG, Smits HL, Deseda CC, Vorndam VA, Aye T, Spiegel RA, Weyant RS, Bragg SL (1999) Increase of leptospirosis in Dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1966. *Am J. Trop Med Hyg*, 61:399–404.
- Sarris K, Alkateriniadou L, Mazaraki K, Bourtzi-Chatzopoulou E, Saoulidis K (1987) Leptospirosis in a pig farm in Thessaloniki area, Deltio Ellinikis Ktiniatrikis Eterias. 38:30–41.
- Schreier S, Triampo W, Dounghawee G, Triampo D, Chadsutji S (2009) Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. *Biol Res* 42:5–12.
- Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpuchnavig V, Boonpuchnavig S (1980) Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. *Kidney Internat* 17:827–836.
- Slack AT, Galloway RL, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2009) Reclassification of *Leptospira meyeri* serovar *Peraeles* to *Leptospira interrogans* serovar *Peraeles* through serological and molecular analysis: evidence of a need for changes to current procedures in *Leptospira* taxonomy. *Int J System Evolut Microbiol* 59:1199–1203.
- Szeredi L, Haake DA (2006) Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospira infection. *Vet Pathol* 43:755–761.
- Talbada MD, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM (2003) Prevalence of leptospirosis infection in Texas cattle: Implications for transmission to humans *Vector-born and Zoonotic Diseases*, 3:141–147.
- Tooloei M, Abdollapour G, Karimi H, Hasanpor A (2008) Prevalence of serum antibodies against six leptospira serovars in sheep in Tabriz, North-western Iran. *J. Animal and Veterinary Advances* 7:450–455.
- Townsend WM, Stiles J and Krohne SG (2006) Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Veter Ophthal* 9:169–173.
- Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, Bellenger E, Baranton G, Postic D (2003) Molecular characterization of *Leptospira* spp strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect* 130:159–166.
- Vemulapalli R, Langohr IM, Sanchez A, Kiupel M, Bolin CA, Wu CC, Lin TL (2005) Molecular detection of *Leptospira kirschneri* in tissue of a prematurely born foal. *J Vet Diagn Invest* 17:67–71.
- Vijayachari P, Hartskeerl RA, Sharma S, Natarajaseenivasan K, Roy S, Terpstra WJ, Sehgal SC (2004) A unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in Andaman Islands: a proposal of serovar *Portblairi* of serogroup *Sehgali*. *Epidemiol. Infect.*, 132:663–673.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN (2008) Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci*, 33:557–569.
- World Health Organization (2006) Guidelines for the prevention and control of leptospirosis. Zoonosis Division, National Institute of Communicable Diseases, 22-Sham Nath Marg, Dehli-110 054.
- World Health Organization (2003) Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Library Cataloguing in – Publication Data, ISBN 92 4 154589 5.
- Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK (1997) Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 150:9–18.