

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ
«Μελέτη της παθογενετικότητας των λοιμώξεων από
***Leptospira spp.* στα μικρά μηρυκαστικά»**

Διδακτορικός φοιτητής:

Μπίσιας Γεώργιος, Κτηνίατρος, Διευθυντής Αγροτικής Οικονομίας και
Κτηνιατρικής Βόρειου Τομέα Αθηνών

Επιβλέπουσα:

Αγγελική Ρόδη – Μπουριέλ, Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.

Μέλη Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Κρήτας Σπυρίδων, Ανπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ
Λεοντίδης Λεωνίδα, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.

ΚΑΡΔΙΤΣΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2014

Επταμελής Επιτροπή Εξέτασης της Διδακτορικής Διατριβής

1. *Αγγελική Ρόδη – Μπουριέλ, Καθηγήτρια, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.*
2. *Κρήτας Σπυρίδων, Ανπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ*
3. *Λεοντίδης Λεωνίδας, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.*
4. *Μπιλλίνης Χαράλαμπος, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.*
5. *Χριστοδουλόπουλος Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.*
6. *Παπασίρος Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Π. Θ.*
7. *Ντότσικα Ελένη, Β' Ερευνήτρια Εθνικού Ιδρύματος Παστερ*

Η ΕΡΕΥΝΑ ΕΓΙΝΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΦΕΙΛΕΙ ΕΝΑ ΜΕΓΑΛΟ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΣΤΟΥΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΕΣ ΤΩΝ ΚΑΤΩΘΙ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ
Ή/ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗ ΠΟΥ ΜΑΣ ΠΑΡΕΙΧΑΝ

ΦΟΡΕΙΣ :

1. **Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, UK, που
σήμερα ονομάζεται Animal and Plant Health Agency**
2. **Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων, των
Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθήνας**
3. **Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης**
4. **Κατά τόπους Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Περιφέρειας
Πελοποννήσου και**
5. **Εργαστήριο Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, της Εθνικής
Σχολής Δημόσιας Υγείας, Αθήνα**

*«Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα
Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει
αποδοχή των γνώμών του συγγραφέως» (N. 5343/1932, άρθρο
202, παρ.2)*

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφορά ένα ιδιαίτερα δύσκολο να μελετηθεί παθογόνο. Ακριβώς λόγω των απαιτήσεων του παθογόνου, άρα των δυσκολιών για την εργαστηριακή του μελέτη, ελάχιστοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί στη χώρα μας μέχρι τώρα με την λεπτοσπείρωση των ζώων. Ως εκ τούτου δεν υπάρχει συλλογική εμπειρία και οργάνωση, που θα διευκόλυνε την προσπάθειά μας. Υπό αυτές τις συνθήκες, η προσπάθεια δεν θα είχε ευοδωθεί, αν πολλοί άνθρωποι δεν μας βοηθούσαν με ιδιαίτερο ζήλο. Σε αυτούς τους ανθρώπους χρωστάω ευχαριστίες και αναγνώριση, που από τη θέση τους με βοήθησαν ανιδιοτελώς.

Πρώτη εξ αυτών είναι η επιβλέπουσα της διατριβής κ Αγγελική Ρόδη – Μπουριέλ, καθηγήτρια Κτηνιατρικής Μικροβιολογίας. Η υπομονή της και η διαρκής προσπάθεια αντιμετώπισης των πολλών προβλημάτων, οικονομικών και τεχνικών, που συνεχώς παρουσιάζονταν, μου έδινε κουράγιο να συνεχίσω, αν και τα χρόνια περνούσαν.

Η γνωριμία της κας Μπουριέλ με τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Αναφοράς της Λεπτοσπείρωσης της Μεγάλης Βρετανίας, καθηγητή Woodward Martin, ήταν ο λόγος που το Εργαστήριο στήριξε την προσπάθειά μας οικονομικά και τεχνικά. Τον ευχαριστώ για την ανεκτίμητη οικονομική και τεχνολογική συνεισφορά του Εργαστηρίου του, μέλος του οποίου ήταν ο αρχιτεχνικός Dr Dalley Charlie, που με το προσωπικό του μας βοήθησαν στην εκτέλεση εκατοντάδων ορολογικών δοκιμών με ενθουσιασμό και επιστημονική αρτιότητα.

Ο Διευθυντής του Εργαστηρίου Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, καθηγητής Κοντός Βασίλειος, αν και αναγκάστηκε λόγω οικονομικών δυσκολιών να διακόψει την εργαστηριακή υποστήριξη για την απομόνωση του παθογόνου, μας φιλοξένησε για πολλούς μήνες. Αυτή του η συνεισφορά ήταν πολύτιμη, διότι μου επέτρεψε να εκπαιδευθώ στην τεχνική απομόνωσης και να αντιληφθώ πολύ ενωρίς ότι το παθογόνο είχε ενδιαφέρουσες επιστημονικά ιδιαιτερότητες, που αξίζει να γίνουν αντικείμενο μελέτης νεαρότερων συναδέλφων.

Θα ήταν αδύνατον οι ανωτέρω να με είχαν βοηθήσει, εάν δεν είχα ουσιαστική και αναντικατάστατη βοήθεια από πολλούς συναδέλφους κτηνιάτρους των

Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Πελοποννήσου στις δειγματοληψίες που εκτέλεσα. Τους ευχαριστώ όλους και ιδιαίτερα τον Διευθυντή του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Τρίπολης Νικήτα Γιακουμή, ο οποίος μας βοήθησε πέραν της συλλογής ορών αίματος, στην διερεύνηση των αιτίων αποβολών και στην εντόπιση των περιοχών υψηλού κινδύνου.

Επίσης ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βοήθεια, που μας παρείχαν οι συνάδελφοι του Ινστιτούτου Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών:

Κασιμάτης Θεόδωρος, Προϊστάμενος του Τμήματος Διαγνωστικής Παθολογικής Ανατομικής, που μας διέθεσε την υλικοτεχνική υποστήριξη για την ιστοπαθολογική διερεύνηση της Λεπτοσπείρωσης.

Ορφανού Ελένη, Προϊσταμένη του Τμήματος Μικροβιολογίας, που βοήθησε με το kit ορολογικής προδιερεύνησης της Λεπτοσπείρωσης.

Δρ Μπουτσίνη Σοφία, Προϊσταμένη του Τμήματος Παρασιτολογίας, που βοήθησε στην ορολογική διερεύνηση του *Toxoplasma gondii*, αλλά και ως σύζυγός μου με συμβούλευε και με βοηθούσε τεχνικά, επιστημονικά και ηθικά.

Ευχαριστώ επίσης τους,

Καθηγητή Μπιλλίνη Χαράλαμπο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής ΠΘ, ο οποίος μαζί με την κτηνίατρο Τουλούδη Αντωνία μας βοήθησε στην εκτέλεση της PCR.

Καθηγητή Λεοντίδη Λεωνίδα του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ και Αναπληρωτή καθηγητή του ΑΠΘ Κρήτα Σπυρίδωνα, που ως μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής έδειξαν κατανόηση στις καθυστερήσεις, που προέκυψαν και τις διακοπές φοίτησης, που αναγκάστηκα να κάνω για λόγους υγείας.

Τέλος ευχαριστώ τα παιδιά μου Μαρίνα, συνάδελφο επί πτυχίω, και Αντώνη, που μου εξέφραζαν διαρκώς την υπερηφάνειά τους για την προσπάθειά μου.

*Τη διατριβή αφιερώνω
στους αποβιώσαντες γονείς μου,
στη σύζυγό μου και στα παιδιά μου*

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ABSTRACT	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΚΕΙΜΕΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	17
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	18
1.2. Ο ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ	21
Πίνακας 1: Είδη του γένους <i>Leptospira</i>	23
1.3. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ	26
1.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>LEPTOSPIRA</i>	31
1.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ	39
1.6. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	44
1.7. Η ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ	47
1.8. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ - ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ	50
1.9. ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ	54
1.10. ΜΕΘΟΔΟΣ MAT	62
1.11. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ MAT	63
1.12. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ	65
ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	67
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Λεπτοσπείρωση: Ένα «νεο-αναδυόμενο» σημαντικό νόσημα των ζώων και του ανθρώπου <i>Γ. Μπίσιας, DVM, Σ. Κρήτας, DVM, PhD, DipECPHM, Α. Μπουριέλ, DVM, MSc, PhD, MRCVS, Β. Κοντός, DVM, PhD</i> JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(1): 76-84	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΚΑΙ ΚΟΠΑΔΙΩΝ ΥΨΗΛΟΥ	80

KINΔYNOY	
3.1. Εισαγωγή	81
3.2. Δημοσιευμένη Εργασία: A Serologic Investigation of Some Abortion Causes Among Small Ruminant Flocks In Greece G. Bisias, A.R. Burial, S. Butsini, S.K. Kritas, L.S. Leontides (2010), Vol 8(2), DOI: 10.5580/28f4	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ <i>LEPTOSPIRA</i> SPP. ΣΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ	90
4.1. Συλλογή ορών αίματος και νεφρικού ιστού για την παθογενετική διερεύνηση της μόλυνσης από <i>Leptospira</i> spp	91
4. 2. Απομόνωση ορότυπων του γένους <i>Leptospira</i>	93
4. 3. Οροδιερεύνηση Ύποπτων για Λεπτοσπείρωση Ζώων κατά τη Σφαγή	96
4.3. 1. Μέθοδος kit <i>Leptospira</i> Serology	97
4.3. 2. Μέθοδος MAT	97
Πίνακας 2: Ορότυποι του γένους <i>Leptospira</i> για τη διερεύνηση ορών αίματος με τη μέθοδο MAT	98
4. 4. Διερεύνηση της Μόλυνσης Ιστών με τη Μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR)	99
4.4.1. Απομόνωση του DNA	100
4.4. 2. Συνθήκες εκτέλεσης της μεθόδου PCR	100
4. 5. Ιστολογική Διερεύνηση Αλλοιώσεων στο Νεφρικό Ιστό	102
4.5. 1. Μονιμοποίηση μικροϊστοτεμαχίων	103
4.5. 2. Δημιουργία Block παραφίνης	104
4.5. 3. Χρώση μικροϊστοτεμαχίων	104
4.5. 4. Παρατήρηση του Μικροοργανισμού σε Τεμάχια Ιστού	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
5. 1. Εντόπιση Οροθετικών Κοπαδιών προβάτων και αιγών	107
5. 2. Απομόνωση των <i>Leptospira</i> spp.	107
5. 3. Οροδιερεύνηση Ύποπτων για Λεπτοσπείρωση Ζώων κατά τη Σφαγή	107
α) kit <i>Leptospira</i> Serology	107
β) MAT μέθοδος	108
5. 4. Διερεύνηση της Μόλυνσης του Νεφρικού Ιστού με τη Μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR)	108

5. 5. Ιστολογική Διερεύνηση Αλλοιώσεων στο Νεφρικό Ιστό	108
5.5. Εικόνες με ιστολογικές αλλοιώσεις	110
5.6. Εργασία προς δημοσίευση: Laboratory investigation of adult small ruminant Leptospirosis, a neglected infection in Greece: problems and recommendations Bisias AG, Kritas CS, Billinis Ch and Burriel RA (έγινε αποδεκτή) JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
6.1. Εισαγωγή	126
6.2. Εντόπιση περιοχών και κοπαδιών υψηλού κινδύνου για μόλυνση με <i>Leptospira</i> spp	128
6. 3. Μελέτη της Παθογενετικότητας της Λοίμωξης των Μικρών Μηρυκαστικών από το γένος <i>Leptospira</i>	132
6.4. Συλλογή Νεφρικού Ιστού και Απομόνωση του Παθογόνου	133
6. 5. Σημασία της οροδιερεύνησης σε περιοχές υψηλού κινδύνου κατά τη σφαγή	136
6. 6. Ανίχνευση της <i>Leptospira</i> spp με PCR στο νεφρικό ιστό	140
6.7. Ιστολογικές Αλλοιώσεις	143
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	149
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	154
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 Πίνακας 3: Αποτελέσματα Εργαστηριακής Διερεύνησης Δειγμάτων Ύποπτων για Λεπτοσπείρωση	177

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ζωννόσος λεπτοσπείρωση, γνωστή από το 1886 ως αιμορραγική, εμπύρετη νόσος του ανθρώπου, οφείλεται σε παθογόνους οροτύπους του γένους *Leptospira* της οικογένειας των Leptospiraceae, της τάξης των Spirochetales. Από την απομόνωση του παθογόνου πριν 100 χρόνια είναι γνωστό ότι δεξαμενή του στη φύση είναι τα ζώα.

Αρχικά ενοχοποιήθηκαν για τη διασπορά του παθογόνου τα τρωκτικά. Όμως, με την πάροδο των δεκαετιών και λόγω της σημαντικότητας του παθογόνου στη Δημόσια Υγεία, διαφάνηκε ότι πολλά άλλα είδη ζώων ήταν φορείς του παθογόνου ή νοσούσαν από συγκεκριμένους οροτύπους. Μεταξύ αυτών των ζώων ήταν τα κατοικίδια (σαρκοφάγα και παραγωγικά), στα οποία η μόλυνση από το παθογόνο μπορεί να είναι από αφανής μέχρι θανατηφόρα κλινική.

Οι επιπτώσεις από αυτά τα ζώα είναι πρώτον η διασπορά στη φύση του παθογόνου και δεύτερον, στην περίπτωση των παραγωγικών ζώων, οι επιπτώσεις στην παραγωγή (γαλακτοπαραγωγή και κρέας). Κατά την διάρκεια των πρόσφατων δεκαετιών, με την αύξηση του ερευνητικού ενδιαφέροντος για το γένος *Leptospira*, έχει φανεί ότι τα μικρά μηρυκαστικά είναι εξ ίσου ευπαθή με τα βοοειδή και τους χοίρους στη μόλυνση από το παθογόνο. Η οροθετικότητα στα διάφορα είδη ζώων και η διασπορά των διαφορετικών οροτύπων του παθογόνου επηρεάζονται από σημαντικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων σημαντικότερες είναι οι κλιματικές συνθήκες (υγρασία και θερμοκρασία). Όταν αυτές ευνοούν την παραμονή και τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου στη φύση, προδιαθέτουν στην υψηλή οροθετικότητα και τη μεγάλη διασπορά οροτύπων.

Η οροθετικότητα των μικρών μηρυκαστικών μπορεί να φτάσει το 60%, ενώ οι ορότυποι, που διεθνώς έχουν αναφερθεί, είναι οι Autumnalis, Castellonis, Gripotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Sejroe, Sermani και άλλοι.

Στην Ελλάδα μέχρι το 2002 το νόσημα στα ζώα είχε αναφερθεί ελάχιστα. Από το 2002 και μετά έγιναν αρκετές προσπάθειες προσδιορισμού της οροθετικότητας των μικρών μηρυκαστικών. Αυτές ανέδειξαν ότι η οροθετικότητα ήταν μέχρι περίπου 24,1% στα περιστατικά αποβολών και περίπου 11% στα φαινομενικά υγιή πρόβατα και αίγες. Από αυτές τις δημοσιευμένες αναφορές διαφαίνεται ότι η μελέτη της σημασίας του παθογόνου στην παραγωγικότητα των μικρών μηρυκαστικών στην

Ελλάδα είναι παραμελημένη. Άγνωστη φάνηκε δε ότι ήταν και η σημασία αυτού του είδους ζώου στη Δημόσια Υγεία.

Για τους ανωτέρω λόγους αποφασίστηκε να μελετηθεί ερευνητικά η παθογενετικότητα του γένους *Leptospira* στα μικρά μηρυκαστικά.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η Πελοπόννησος για τους εξής λόγους:

Το ΚΕ.Ε.Λ.Π.ΝΟ έχει καταγράψει τους Νομούς Ηλείας και Μεσσηνίας μεταξύ αυτών με τη μεγαλύτερη εμφάνιση κρουσμάτων κλινικής λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο.

1. Οι δύο νομοί εξυπηρετούνται από το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης, με το οποίο υπήρχε δυνατότητα συνεργασίας και
2. Στην Πελοπόννησο υπήρχαν συναδελφικές σχέσεις, που ωφελούσαν την γόνιμη συνεργασία με τις κτηνιατρικές υπηρεσίες.

Μετά από την εκτενή ανασκόπηση της κείμενης βιβλιογραφίας αποφασίστηκαν τα εξής στάδια για τη μελέτη της μόλυνσης των μικρών μηρυκαστικών από το γένος *Leptospira*:

1. Η εκτεταμένη ανασκόπηση και δημοσιοποίηση της κείμενης βιβλιογραφίας με σκοπό την παροχή χρήσιμων πληροφοριών για μια λοίμωξη των ζώων, που θεωρείται νέο-αναδυόμενη στον άνθρωπο και είναι ελάχιστα μελετημένη στην Ελλάδα. Αυτός ο σκοπός πραγματοποιήθηκε με τη δημοσίευση Bisias et al., 2010α - **Κεφάλαιο 2**.
2. Η ανίχνευση της σημαντικότητας οροτύπων του γένους *Leptospira*, που αναγνωρίζονται ως εμπλεκόμενοι σε περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών της Πελοποννήσου και η ανάδειξη των περιοχών υψηλού κινδύνου. Ο σκοπός αυτός επιτεύχθηκε με την δημοσίευση της εργασίας Bisias et al., 2010β - **Κεφάλαιο 3**.
3. Η ανίχνευση του παθογόνου σε μολυσμένους ιστούς των προς μελέτη ειδών ζώων με μεθόδους εφικτές για τα πραγματικά δεδομένα της Ελλάδας. Μεταξύ αυτών στόχος ήταν κυρίως η απομόνωση του παθογόνου, ώστε να μελετηθούν συγκριτικά κάποιοι παράγοντες παθογένειας των οροτύπων του γένους *Leptospira*. Ο σκοπός αυτός έχει αποτελέσει την προς κρίση εργασία Bisias et al., 2014 - που έγινε αποδεκτή και
4. Η συσχέτιση των παρατηρούμενων μικροσκοπικών αλλοιώσεων του ιστού προτίμησης του παθογόνου, δηλαδή του νεφρικού, με τις ιδιότητες αναγνωρισμένων οροτύπων για κάθε είδος ζώου ξεχωριστά.

Για την ανίχνευση της σημαντικότητας οροτύπων σε περιστατικά αποβολών και εντόπιση περιοχών με προοπτική μελέτης της παθογενετικότητας αυτών

οροδιερευνήθηκαν 463 οροί αίματος από πρόβατα (289) και αίγες (174), που προήλθαν από όλη την Πελοπόννησο. Εντοπίστηκαν δύο περιοχές στα σύνορα των Νομών Ηλείας και Μεσσηνίας, όπου τα εξετασθέντα κοπάδια είχαν οροθετικότητα μεταξύ 30 και 35% και τίτλους αντισωμάτων πάνω από 1/800. Σε αυτές τις περιοχές εστιάστηκε το επόμενο στάδιο μελέτης της παθογενετικότητας του μικροοργανισμού.

Από ζώα των περιοχών αυτών, που έφταναν σε δύο σφαγεία, έγινε συλλογή ορών αίματος και νεφρών για απομόνωση του παθογόνου, μελέτη των ιστών με τη μέθοδο της PCR και ιστολογικά και μελέτη των ορών με τη μέθοδο της MAT. Συλλέχθηκαν 110 δείγματα ιστών ισάριθμων ζώων και 110 ορών.

Δείγματα ιστών από 24 ζώα καλλιεργήθηκαν με ενδεδειγμένο βιβλιογραφικά τρόπο για την απομόνωση οροτύπων του παθογόνου και την *in vitro* συγκριτική μελέτη του. Η προσπάθεια διήρκεσε 4 μήνες και διεκόπη επειδή ήταν αρνητικά τα αποτελέσματα και επέφεραν αστάθμητους παράγοντες οικονομικής υποστήριξης. Έτσι, συνεχίστηκε η μελέτη της παθογενετικότητας της μόλυνσης μόνο βάσει των αλλοιώσεων του ιστού των νεφρών. Δηλαδή με ιστολογική και ορολογική διερεύνηση, με την PCR και την απευθείας παρατήρηση του παθογόνου σε ιστούς για επιβεβαίωση της παρουσίας του παθογόνου στους προς διερεύνηση ιστούς.

Ιστολογικά διερευνήθηκαν 263 ιστοτεμάχια (2-3 ζώα). Από τα 110 ζώα 29 (26,36%) είχαν μικροσκοπικά ευρήματα, που θεωρούνται συναφή με την πειραματική μόλυνση από παθογόνους οροτύπους του γένους *Leptospira*. Οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν μεικτές και χαρακτηρίζονταν από απλή μονοκυτταρική διήθηση μέχρι σοβαρή διάμεση ίνωση. Από τα ιστολογικά θετικά, 17(58,6%) ήταν επίσης θετικά στην MAT, 21 (72,3%) στην PCR και 16 (55,2%) ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους (Πίνακας 3 – Παράρτημα 1).

Είκοσι οκτώ οροί αίματος (25,4%) ήταν θετικοί σε ένα ή περισσότερους οροτύπους. Οι θετικοί τίτλοι ήταν 1/100 έως 1/800 και οι συχνότερα απαντώμενοι ορότυποι ήταν οι Tarassovi (10 οροί), Autumnalis (10 οροί), Zanoni (6 οροί) και άλλοι.

Με την μέθοδο PCR βρέθηκαν θετικοί στο παθογόνο 38 (34,5%) από τους 110 ιστούς. Αν και τα ποσοστά θετικών πλησιάζουν τα αποτελέσματα της μεθόδου MAT, η μέθοδος δυστυχώς δεν διακρίνει ορότυπους. Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν, όμως, ότι λόγω των πολλαπλών προβλημάτων απομόνωσης του παθογόνου, που

αντιμετωπίζουν ακόμη και έμπειρα ερευνητικά κέντρα, άρα λόγω έλλειψης ευαισθησίας της απομόνωσης, ο πιο αξιόπιστος τρόπος επιβεβαίωσης της μόλυνσης ή/και εξήγησης των ιστολογικών αλλοιώσεων είναι ο συνδυασμός της MAT με την PCR.

Βάσει αυτών, συμπεραίνεται από τα ανωτέρω ότι οι αλλοιώσεις των ιστών ήταν πιθανότατα αποτέλεσμα της παρουσίας του παθογόνου. Αυτό το εύρημα σε συνδυασμό με την υψηλή οροθετικότητα (24,9%), που παρατηρήθηκε στα περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών, δείχνει ότι το γένος *Leptospira* επηρεάζει την παραγωγικότητα και καθιστά αυτά τα είδη ζώων σημαντικό κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Άρα, ως πρόβλημα η λεπτοσπείρωση των μικρών μηρυκαστικών απαιτεί συστηματικότερη μελέτη, αφού αυτά τα είδη ζώων αποτελούν την κύρια παραγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης στην Ελλάδα. Για ικανοποίηση του σκοπού αυτού απαιτείται η δημιουργία Εθνικού Φορέα μελέτης του γένους *Leptospira* στον άνθρωπο και τα ζώα, κυρίως τα παραγωγικά.

ABSTRACT

The zoonotic disease leptospirosis was first recognized in 1886 as hemorrhagic fibrile disease of man. The cause, *Leptospira spp.*, family **Leptospiraceae** and order **Spirochetales**, was isolated a few years later from rodents and other animals.

During the 100 years of fascinating research, became clear that the pathogen is very important not only for Public Health, but also the productivity of food producing animals.

Animal (wild and domestic) infections maintain pathogenic serovars in nature, if climatic factors (humidity and temperature) are favorable causing new infection to other animals and accidental infections to man entering a contaminated environment. Between these animals are also small ruminants.

Seroprevalence of small ruminants could reach 60%, if the environmental factors favor the pathogen, and the worldwide serotypes identified serologically are Autumnalis, Castellonis, Griptophosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Sejroe, Sermani and others.

In Greece, very little was known about leptospirosis in general until 2002, when an attempt was made to research the infection. This attempt showed that seroprevalence was about 24.1% among small ruminant abortion cases compared to 11% from non-cases. These findings showed that the consequences from this infection are completely unknown in Greece, thus unknown is also the contribution of food producing animals to human cases.

For the above reasons, we decided to study the pathogenicity of *Leptospira spp* in small ruminants, because these animal species produce the majority of food products in Greece. For this purpose, Peloponissos (Southern Greece) was chosen as the area of concern for the following reasons:

1. KE.E.L.P.NO has recorded prefectures of Ilia and Messinia among those recording the highest number of human clinical leptospirosis in Greece
2. The prefectures belong to the Veterinary Laboratory of Tripolis, with which we had good working relationship and
3. In Peloponissos we had good relationship with many other veterinarians of the State Veterinary Agencies.

After a wide review of the literature we decided that the stages for studying small ruminant leptospirosis should be,

1. The determination of serotype prevalence and importance in the chosen area among small ruminant abortion case. This research was expected to give could evidence of the best areas for isolating pathogenic serotypes from small ruminants
2. The comparison of the findings with evidence of infection using the methods MAT and PCR
3. The **in vitro** comparative study of isolated strains in association to selected pathogenic determinants and
4. The association of findings with microscopic lesions possibly caused by the presence of the pathogen with the above chosen methods for studying the infection.

For the first purpose 463 serum samples were collected from recently aborted sheep (289) and goats (174). The highest mean prevalence (30-35%) of the pathogen was detected in the border areas of Ilia and Messinia. The next stages of the current project focused to these areas.

Serum samples and tissue were collected during slaughtering. Kidney tissue and serum samples from 110 animals were collected and examined with culture, serology using the method MAT, direct visualization of leptospirae after silver staining, PCR and histopathological examination of kidney tissue.

Only tissue samples from 24 animals were cultured before the attempt was aborted due to negative results and unfavorable economic circumstances. Thus, the **in vitro** comparative study of isolated serotypes was impossible. The research, however, continued for meeting the remaining objectives.

Histological examination was performed on 263 tissue samples (2-3/ animal) and 29 (26.36%) animals showed strong evidence of microscopic lesions comparable to those observed in **in vivo** studies. They were from light monocyctosis to severe glomerulonephritis. Of the 29 cases, 17(58.6%) were also positive in MAT, 21 (72.3%) in PCR and 16 (55.2%) in both methods.

Twenty eight (25.4%) serum samples were positive to one or more serotypes having titers between 1/100 to 1/800. Most prevalent serotypes were Tarassovi (10 samples), Autumnalis (10 samples), Zanoni (6 samples) and others.

The examination of tissue with the method PCR showed 38 (34.5%) positive tissue samples, a prevalence close to that of the MAT, but the method does not differentiate between serotypes. Researchers recommend, due to low sensitivity of isolation, a combination of MAT and PCR for confirming cases or studying lesions possibly caused by pathogenic serotypes of *Leptospira*.

Thus, it is concluded from the above that the detected serovars, mainly Tarassovi and Autumnalis, are pathogenic for small ruminants, the majority of which were sheep (98 animals) causing possibly permanent kidney damage and abortions. Hence this animal species is not just an accidental host of the pathogen. It can maintain infecting serovars in its environment putting at risk farmers and others in the same area.

This first evidence from Greece, show that the State must form a National Agency to systematically study the pathogen in association to food producing animals and man.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΚΕΙΜΕΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Τα παθογόνα είδη και οι ορότυποι του γένους *Leptospira* αναφέρονται μεταξύ των περίπου 1400 παθογόνων παραγόντων (βακτήρια, αρκετοί ιοί και παράσιτα) του ανθρώπου, εκ των οποίων το 62% αποτελούν αίτια ζωνόσεων (Taylor et al 2001). Η μόλυνση από παθογόνα είδη του μικροοργανισμού προκαλεί τη νόσο «λεπτοσπείρωση» του ανθρώπου, αλλά και πολλών ειδών ζώων.

Η νόσος αναφέρθηκε για πρώτη φορά στον άνθρωπο το 1886 από τον Adolf Weil (Alston and Brown, 1937), ο οποίος την περιέγραψε ως αιμορραγική, εμπύρετη νόσο, που συνοδευόταν από νεφρική ανεπάρκεια. Η περιγραφή από τον Weil έδωσε στη λεπτοσπείρωση του ανθρώπου το όνομα «νόσος του Weil» (Faine et al. 1999).

Η πρώτη μικροσκοπική παρατήρηση του πιθανολογούμενου αιτίου στα εσπειραμένα νεφρικά σωληνάρια έγινε το 1907, ενώ η απομόνωση του παθογόνου έγινε εφικτή το 1915 (Cook 2007). Άρα 30 περίπου χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή της κλινικής νόσου γίνεται η απομόνωση του αιτιολογικού παράγοντα και σχεδόν συγχρόνως γίνονται από τον Inada και τους συνεργάτες του (1916) οι πρώτοι πειραματισμοί στα ζώα για να καθοριστεί η παθογενετικότητα του μικροοργανισμού στα ζώα.

Από τις πρώτες αυτές παρατηρήσεις καθίστανται γνωστές οι δυσκολίες απομόνωσης και εργαστηριακής μελέτης του παθογόνου. Όμως, παρόλα αυτά το παθογόνο εξ αρχής και διαρκώς εξακολουθεί να προκαλεί το έντονο ενδιαφέρον των μικροβιολόγων παγκοσμίως. Αποτέλεσμα αυτού το ενδιαφέροντος είναι η συσσώρευση γνώσης, ως προς τα ευπαθή και μη είδη ζώων στο γένος *Leptospira*, καθώς και ως προς τη μορική ποικιλομορφία (heterogenicity) των παγκοσμίως απομονωμένων στελεχών του (Levett, 2004; Morey et al., 2006; Nally et al., 2007; Slack et al., 2009; Cerqueira and Picardeau, 2009; Adler and Moctezuma, 2010; Harstkeerl et al., 2011).

Η μόλυνση του ανθρώπου πρέπει να αντιμετωπιστεί έγκαιρα, διότι σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Για το λόγο αυτό οι περισσότερες χώρες έχουν οργανώσει υπηρεσίες ορθής διερεύνησης, καταγραφής, συμβουλευτικής και

νοσοκομειακής αντιμετώπισης των περιστατικών λεπτοσπείρωσης (Biosecurity Australia, 2003; ILS - WHO, 2003; Washington State Department of Health, 2008; Science.gov, USA, 2013).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, αναγνωρίζοντας τη διαρκή αύξηση της σημασίας της λεπτοσπείρωσης, οργάνωσε πριν λίγα χρόνια ειδική υπηρεσία για την παγκόσμια παρακολούθηση του νοσήματος υπό την ονομασία Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG) (WHO, LERG, 2009). Η ομάδα LERG συγκεντρώνει πληροφορίες, που αφορούν το νόσημα στον άνθρωπο και τα ζώα, από όλες τις ερευνητικές ομάδες της υφηλίου, αλλά και κρατικές οντότητες ειδικά δημιουργημένες για τη μελέτη του παθογόνου.

Βέβαια η καταγραφή και η μελέτη της λεπτοσπείρωσης είναι ανάλογη με την ιδιαίτερη σημασία, που οι υγειονομικές υπηρεσίες κάθε χώρας προσδίδουν στη μόλυνση. Μέσω αυτής της καταγραφής διαφαίνεται σε παγκόσμιο επίπεδο ότι οι περισσότερες χώρες είτε δεν καταγράφουν το νόσημα είτε δεν δημοσιοποιούν επαρκώς τα παρατηρούμενα περιστατικά (Hartskeerl et al., 2011). Από τις βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις φαίνεται ότι ο βαθμός της πραγματικής κλινικής καταγραφής στον άνθρωπο διαφέρει ακόμη και μεταξύ χωρών με υψηλή τεχνολογική δυνατότητα διερεύνησης αυτού του δύσκολου προς διερεύνηση νοσήματος (Sabasiva et al., 2003; Pappas et al 2008; Abela-Ridder et al., 2013; Pan American Health Organisation, 2014). Οι καταγραφές, που αναφέρονται από τους διεθνείς οργανισμούς ανά εκατομμύριο ατόμων είναι από 0.1 στις ΗΠΑ έως και 432.1 στις Seychelles (Pappas et al., 2008; OIE, 2014). Γενικώς οι υψηλότερες αναφορές προέρχονται από τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Πιθανότατα στις χώρες αυτές αδυνατούν να αντιμετωπίσουν το νόσημα στα πρώτα στάδια μόλυνσης (χορήγηση αντιβιοτικών), κυρίως λόγω έλλειψης πρωτοβάθμιας κρατικής περίθαλψης, με αποτέλεσμα να φτάνει στο στάδιο της αναγκαστικής νοσοκομειακής περίθαλψης, όπου γίνεται και η καταγραφή του.

Ο μικροοργανισμός μολύνει τον άνθρωπο μέσω της μόλυνσης του περιβάλλοντος διαβίωσής του από ζώα φορείς του παθογόνου. Μέρος αυτού του περιβάλλοντος είναι κυρίως η τροφή, αλλά και το υγρό περιβάλλον των δραστηριοτήτων για τους φυσιολάτρες και τους αγρότες. Ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά μόλυνσης, που φτάνουν το 68%, αναφέρονται μεταξύ των εργατών σε ορυζώνες (ILS,

WHO 2003; Leal-Castellanos et al., 2003; Natarajaseenivasan et al, 2004; WHO, LERG 2009; Lau et al., 2010). Το περιβάλλον του ανθρώπου μολύνεται από τα ζώα φορείς, άγρια και κατοικίδια (συντροφιάς και παραγωγικά), τα οποία το διατηρούν και το διασπείρουν στη φύση (Guitian et al., 2001; Levett, 2004; Peregrine et al., 2006; Berlioz-Arthsud et al., 2007; Mahajan and Chhabra, 2008; Vijayachari et al., 2008; Lau et al., 2010; The Center for Food Security and Public Health, 2013; OIE Terrestrial Manual, 2014).

Μεταξύ των ζώων αυτών τα διάφορα τρωκτικά αναγνωρίστηκαν από τα πρώτα χρόνια μελέτης της νόσου Weil ως η κύρια δεξαμενή του μικροοργανισμού στο περιβάλλον. Τα άγρια ζώα είναι ως εκ τούτου σημαντικές πηγές μόλυνσης άλλων ειδών ζώων, αλλά και του ανθρώπου (Turk et al., 2003; ILS, 2003; Kruse et al 2004; Levett, 2004; Lau et al., 2010; Hartskeerl et al., 2011; OIE, 2014). Με την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθόδων έμμεσης διερεύνησης της μόλυνσης των ζώων, αλλά και των μεθόδων απομόνωσης και μελέτης των παθογενετικών μηχανισμών του παθογόνου, αυξήθηκε και ο συσχετισμός της μόλυνσης από *Leptospira* spp με τις ποικίλες κλινικές ή υποκλινικές μορφές της νόσου (Gravenkamp et al., 1993; Barocchi et al., 2002; Richardson and Gauthier, 2003; Cullen et al, 2005; Nally et al., 2007; Palaniappan et al., 2007).

Η σφοδρότητα των επιπτώσεων της μόλυνσης στο ζωο-ξενιστή εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, που αφορούν τόσο στον ίδιο το μικροοργανισμό όσο και στο είδος του ζώου. Η κατανόηση των παραγόντων, που καθορίζουν την παθογένεια του μικροοργανισμού και κατά συνέπεια το τελικό αποτέλεσμα της μόλυνσης, είναι ιδιαίτερα δύσκολη, αφού η απομόνωση και η διατήρηση του παθογόνου στο εργαστήριο είναι πολύ δύσκολες (Cullen et al., 2005; Gebriel et al., 2006; Monahan et al., 2009; d'Andon et al., 2014).

Για την καλή κατανόηση αυτών των δυσκολιών είναι απαραίτητη μια συνοπτική ανασκόπηση της υφιστάμενης γνώσης σχετικά με τα παθογόνα είδη του γένους *Leptospira*, που αφορούν στα ζώα, κυρίως τα κατοικίδια (παραγωγικά και μη) και τον άνθρωπο. Στα ευπαθή σπονδυλωτά η μόλυνση μπορεί να είναι από υποκλινική έως και θανατηφόρα κλινική με κατάρρευση των ζωτικών λειτουργιών τους (Levett et al., 2004; Goldstein et al., 2006; Goldstein, 2010; Hartskeerl et al; 2011).

Στα άλογα και στο σκύλο είναι συχνή η εμπλοκή του μικροοργανισμού στην επανεμφανιζόμενη οφθαλμική ραγοειδίτιδα (Faber et al., 2000; Townsend et al., 2006), αλλά και σε αποβολές (Vemulapalli et al., 2005; Goldstein et al., 2006; Leon et al., 2006; Goldstein, 2010).

Στα μεγάλα μηρυκαστικά η μόλυνση από *Leptospira* spp. μπορεί να προκαλέσει προβλήματα αναπαραγωγής (αποβολές ή γέννηση θνησιγενών νεογνών) αλλά και σημαντική πτώση της γαλακτοπαραγωγής (Michell and Boulanger, 1959; Higgins et al., 1980; Ciceroni et al., 2000; Guitian et al., 2001; Lilenbaum and Souza, 2003; Escamilla et al., 2007; Saglam et al., 2008; Sivaraman et al., 2012; Martins and Lilenbaum, 2014).

Στα μικρά μηρυκαστικά η μόλυνση είναι κυρίως υποκλινική με αποτέλεσμα οι επιπτώσεις της στην παραγωγικότητα των ειδών αυτών να είναι σχεδόν άγνωστες (Martins et al., 2012; Martins and Lilenbaum, 2014).

Ποιος είναι όμως, μικροβιολογικά, ο αιτιολογικός παράγοντας της λεπτοσπείρωσης των ζώων και του ανθρώπου;

1.2. Ο ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΕΣ ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ

Το γένος *Leptospira* ανήκει στην οικογένεια **Leptospiraceae**, του φύλου X της τάξης των **Spirochaetales**.

Λόγω των δυσκολιών απομόνωσης, συντήρησης και συστηματικής μελέτης του παθογόνου στο εργαστήριο, μέχρι πρότινος ήταν αποδεκτός ο διαχωρισμός του γένους *Leptospira* σε δύο μόνο είδη: ένα παθογόνο είδος με την ονομασία *Leptospira interrogans* και ένα μη παθογόνο το *Leptospira biflexa* (Smythe et al., 2013). Ο διαχωρισμός αυτός ήταν βασισμένος κυρίως στην παθογένεια. Έτσι, οι παθογόνοι ορότυποι αποτελούσαν ταξινομικά το παθογόνο είδος. Ως παθογόνοι ορότυποι κρίνονταν αυτοί που απομονώνονταν από κλινικά περιστατικά του ανθρώπου και των ζώων.

Η ταξινόμηση και η ονοματολογία του γένους *Leptospira* σήμερα υπόκεινται στην διαρκή πίεση για αλλαγές, λόγω της συσσώρευσης γνώσης, από τη χρήση νέων μοριακών μεθόδων μελέτης του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Αυτές οι γνώσεις

έχουν πλέον αποδείξει ότι είναι λανθασμένη η φαινοτυπική του ταξινόμηση. Επιπλέον, οι μοριακές μελέτες δείχνουν ένα μεγάλο πολυμορφισμό (heterogenicity) μεταξύ γνωστών και προσφάτως απομονωμένων στελεχών παγκοσμίως (He et al., 2007; Wang et al., 2007; Murrey et al., 2009; Eslabao et al., 2010; Smythe et al., 2013). Ο γενετικός προσδιορισμός αυτού του πολυμορφισμού διευκρινίζεται συνεχώς με τη χρήση νέων μοριακών τεχνικών.

Οι γνώσεις αυτές οδηγούν σε ανακατατάξεις γνωστών οροτύπων, πολλοί από τους οποίους ταξινομούνται εκ νέου σε σχέση με τα πρόσφατα αναγνωρισμένα είδη του γένους (Slack et al 2009). Σύμφωνα με τις πρόσφατες ταξινομικές αναπροσαρμογές, το γένος *Leptospira* αποτελείται από 13 παθογόνα ή μέτριας παθογένειας είδη, 6 μη παθογόνα είδη και 2 είδη, που δεν έχουν ακόμη ταξινομηθεί πλήρως (WHO 2003; Morey et al., 2006; Adler and Moctezuma, 2010; Smythe et al., 2013). Τα είδη αυτά αποτελούνται από περισσότερους από 270 ορότυπους, οι οποίοι σύμφωνα με κάποιες ομάδες επιστημόνων (Vijayachari et al., 2004; Morey et al., 2006), ανήκουν σε 23 αντιγονικά διακριτές ομάδες, ενώ κατά τους επιστήμονες του WHO (2003) οι ομάδες αυτές ανέρχονται σε 25.

Σήμερα οι γνωστοί παθογόνοι ορότυποι κατατάσσονται στα παθογόνα είδη του **Πίνακα 1**. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι κατά τη μοριακή ταξινόμηση των οροτύπων σε αντίστοιχα συγγενή είδη, παρατηρείται το φαινόμενο ο ίδιος παθογόνος ορότυπος να ανήκει ταυτόχρονα σε δύο είδη, τα οποία δεν είναι κατ' ανάγκη και τα δύο παθογόνα (Slack et al., 2009; Calderaro et al., 2014). Παρά τα παράδοξα της μοριακής ταυτοποίησης του μικροοργανισμού, η φαινοτυπική ταυτοποίηση του, στην οποία ανήκει και η ταυτοποίηση με τη μέθοδο MAT (microagglutination test), αρχίζει να αντικαθίσταται από την μοριακή ταυτοποίηση. Επί πλέον, με τη μοριακή ταυτοποίηση αναγνωρίστηκαν πρόσφατα τα «γενομοείδη» (genomospecies), που δεν ανταποκρίνονται μοριακά στα γνωστά είδη και τους ορότυπούς τους.

Αρα διαφαίνεται ότι είναι αναγκαία η συνεχής ανακατάταξη απομονωμένων στελεχών διαφόρων οροτύπων, αν και αυτός ο νέος, μοριακά ορθότερος τρόπος ταξινόμησης του μικροοργανισμού, δημιουργεί προβλήματα στην κλινική και επιδημιολογική μελέτη του νοσήματος, κυρίως για δύο βασικούς λόγους. Πρώτον διότι παρατηρείται το φαινόμενο στελέχη διαφορετικών ειδών να έχουν κοινό ορότυπο και δεύτερον υπάρχει σε κάποιες περιπτώσεις αδυναμία συσχέτισης των

ευρημάτων μεταξύ των διαφορετικών ειδών ζώων και του ανθρώπου (Levett, 2004; Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; Calderano et al., 20014).

Πίνακας 1: Είδη του γένους *Leptospira*

Παθογόνα Είδη	Μέσης Παθογένειας Είδη	Μη Παθογόνα Είδη
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira inadai</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>Leptospira broomii</i>	<i>Leptospira wolbachii</i>
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira fainei</i>	<i>Leptospira vanthiellii</i>
<i>Leptospira santarosai</i>	<i>Leptospira wolffii</i>	<i>Leptospira terpstrae</i>
<i>Leptospira noguchii</i>	<i>Leptospira licerasiae</i>	<i>Leptospira yanagawae</i>
<i>Leptospira weilii</i>		<i>Leptospira kmetyi</i>
<i>Leptospira alexanderi</i>		<i>Leptospira meyeri</i>
<i>Leptospira astoni</i>		

Επειδή αυτά τα προβλήματα, που αφορούν στις επιδημιολογικές μελέτες κυρίως των ζώων, δεν έχουν επιλυθεί με τις μοριακές τεχνικές, εξακολουθεί για διαγνωστικούς και επιδημιολογικούς λόγους να μελετάται η λεπτοσπείρωση με την αναγνώριση των οροτύπων, που είναι ορολογικά εφικτή με τη χρήση της μεθόδου MAT.

Η μέθοδος αυτή είναι διεθνώς αναγνωρισμένη ως ο «χρυσός κανόνας» στη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης και ως εκ τούτου είναι ευρύτατα διαδεδομένη (ΟΙΕ, 2014). Μέσω αυτής της μεθόδου διερευνάται επιδημιολογικά το ποσοστό μόλυνσης με διαφορετικούς οροτύπους στα διάφορα είδη ζώων ξενιστών του παθογόνου, άρα και η διασπορά τους στη φύση.

Βέβαια αποτέλεσμα της ορθότερης ταξινόμησης του γένους *Leptospira* είναι να αναγνωρίζονται μεν σήμερα περισσότερα είδη, αλλά να μην έχουν διευκρινιστεί οι διαφορές μεταξύ των ερευνητών ως προς τα πόσα και ποια είναι τα είδη του γένους. Έτσι, σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές υπάρχουν οκτώ (8) παθογόνα είδη, τρία (3) μέτριας παθογένειας και έξη (6) μη παθογόνα (Turk et al., 2003; Morey et al., 2006), ενώ σύμφωνα με άλλους, συμπεριλαμβανομένου του Παγκόσμιου Οργανισμού της Λεπτοσπείρωσης, υπάρχουν 13 παθογόνα ή μέτριας παθογένειας είδη (Πίνακας 1) και επτά (7) μη παθογόνα είδη (Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; ILS - WHO, 2014;

Calderano et al., 2014), στα οποία ανήκουν τουλάχιστον 270 ορότυποι, παθογόνοι και μη (Wang et al., 2007).

Η συνεχής παγκόσμια μελέτη στελεχών και οροτύπων με μοριακές μεθόδους εμπλουτίζει την επιστημονική γνώση και βοηθάει τους επιστήμονες να πλησιάσουν στην αναγνώριση κοινών μοριακών χαρακτηριστικών, μεταξύ των οροτύπων και των ειδών, αλλά και σημαντικών διαφορών τους. Με τον καθορισμό αυτών των μοριακών χαρακτηριστικών, που είναι αποτέλεσμα της διαρκούς μελέτης του γένους *Leptospira*, επιδιώκεται η αναγνώριση σταθερών μοριακών παραγόντων διαφοροποίησης των απομονωμένων στελεχών. Με την αναγνώριση και συστηματική καταγραφή αυτών των χαρακτηριστικών ίσως τελικά επιτευχθεί η ανεύρεση τρόπου μοριακής διαφοροποίησης των στελεχών σε επίπεδο είδους και οροτύπου, αλλά και η παραγωγή αποτελεσματικών εμβολίων γενικής χρήσης. Αυτές οι προσπάθειες, που έχουν σήμερα βοηθήσει στην ταξινόμηση εκ νέου του γένους, προσθέτουν συνεχώς πληροφορίες, που οδηγούν στην συμπλήρωση της κατάταξης νέων στελεχών σε είδη (Wang et al., 2007; Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; Calderaro et al., 2014).

Σημαντικότερο είναι ότι οι μοριακές μέθοδοι ανέδειξαν τα προβλήματα της κατάταξης των οροτύπων στα γνωστά είδη, που είχαν δημιουργηθεί με βάση την παθογένεια ενός ορότυπου σε κάποιο είδος ζώου (Turk et al., 2003; Levett, 2004; Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; Calderaro et al., 2014). Επειδή, όμως, αυτή η συσσώρευση μοριακών πληροφοριών δεν έλυσε ακόμη το ζήτημα, που αφορά στους οροτύπους του γένους *Leptospira* κατά την επιδημιολογική τους μελέτη, οι πληροφορίες που δημοσιοποιούνται σε επίπεδο οροτύπου εξακολουθούν να προέρχονται από την χρήση της κλασικής ορολογικής μεθόδου MAT. Επίσης, οι μοριακές μέθοδοι δεν βοηθούν την ουσιαστική μελέτη του παθογόνου σε χώρες, που στερούνται εξειδικευμένων εργαστηρίων και ομάδων συστηματικής μελέτης της μόλυνσης των ζώων και του ανθρώπου από το μικροοργανισμό.

Αρα τα αποτελέσματα από τη μοριακή μελέτη της παθογένειας απομονωμένων στελεχών αφορούν κυρίως χώρες, οι οποίες διαφέρουν κλιματολογικά από τις χώρες, όπου ο μικροοργανισμός έχει την μεγαλύτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία. Οι τελευταίες είναι περιοχές, που εμφανίζουν περιόδους υψηλής υγρασίας και ήπιας θερμοκρασίας (Sanders et al., 1999; Ricaldi and Vinetz, 2006; Vijayachari et al., 2008; Lau et al., 2010; ILS – WHO, 2014; Martins and Lilenbaum, 2014). Δηλαδή στις

περιοχές αυτές επικρατούν κλιματολογικές συνθήκες, που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό, άρα την ευνοϊκότερη ανάπτυξη και διασπορά στη φύση οροτύπων των παθογόνων ειδών του γένους *Leptospira*.

Διαχρονικά, από την εποχή της αναγνώρισης του μικροοργανισμού, ως ένα σημαντικό παθογόνο στα διάφορα είδη των ζώων και τον άνθρωπο, ένας σημαντικός αριθμός οροτύπων έχει χαρακτηριστεί περισσότερο ή λιγότερο παθογόνος (Sambasiva et al. 2003; Levett 2004; Cook, 2007; Hartskerl et al., 2011, OIE, 2014). Ο βαθμός παθογένειας του καθενός εξ αυτών και η γενικώς αποδεκτή προσαρμογή κάποιων σε συγκεκριμένα είδη ζώων, δυσκολεύουν ακόμη περισσότερο την επιδημιολογική μελέτη του μικροοργανισμού, την εκτίμηση της οικονομικής σημασίας του, καθώς και την εκτίμηση της σημασίας της μόλυνσης των διαφόρων ειδών ζώων στη Δημόσια Υγεία (Biosecurity Australia, 2003; Morey et al. 2006; Mahajan and Chabra 2008, Vijayachari et al. 2008; WHO 2006; Lucheis and Ferreira, 2011; Pan American Health Organization, 2014; OIE, 2014).

Η μελέτη της διασποράς των οροτύπων στη φύση είναι άκρως ενδιαφέρουσα, αφού καθορίζει τη σημαντικότητα του κάθε ορότυπου στα ευπαθή είδη ζώων. Αυτή η διασπορά φαίνεται να μεταβάλεται διαρκώς, αλλάζοντας και τη σημασία της μόλυνσης, όχι μόνο στα ζώα, αλλά και στον άνθρωπο (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Bisias et al., 2009). Αποτέλεσμα είναι να θεωρείται σήμερα η λεπτοσπείρωση μια νέο-αναδυόμενη ζωνόσος (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3) με παγκόσμια εξάπλωση (Hartskeerl et al., 2011; Pappas et al., 2008; Reis et al., 2008; Lau et al., 2010). Θεωρείται δε νέο-αναδυόμενη, διότι η μόλυνση απαντάται με αυξημένη συχνότητα τα τελευταία χρόνια σε περιοχές υψηλού και μη κινδύνου. Σε κάποιες εκ των περιοχών αυτών υπάρχει υψηλός κίνδυνος αιμορραγικών πυρετών, παρόμοιας κλινικής εικόνας διαφορετικής όμως αιτιολογίας. Προφανώς, σε αυτές τις περιοχές είναι απαραίτητη η διαφοροποίηση της κλινικής εικόνας της λεπτοσπείρωσης από άλλα αιμορραγικά νοσήματα του ανθρώπου, που υπάρχουν στις ίδιες περιοχές και παρουσιάζουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα. Η διαφοροποίηση είναι απαραίτητη διότι διαφέρει η θεραπευτική αγωγή, αλλά και τα μέτρα προφύλαξης μεταξύ αυτών και της λεπτοσπείρωσης (Manoz et al 1995; Monsuez et al. 1997; Trevejo et al. 1998; Bunnell et al 2000; Bertherate et al., 1999; Sanders et al., 1999; Ricald et al., 2006; Berlioz-Arthaud et al., 2007).

Επίσης είναι απαραίτητη η συσχέτιση παθογόνων οροτύπων ενός είδους ζώου, με πλήθος άλλων ειδών ζώων για να καθορισθεί ο βαθμός διασποράς τους, άρα και η λήψη των κατάλληλων μέτρων προφύλαξης.

1.3. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ

Διαφορετικοί ορότυποι ανακοινώνονται συνεχώς ως σημαντικοί από διαφορετικές χώρες, περιοχές και είδη ζώων. Επίσης τα ποσοστά μόλυνσης διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών ζώων, με θετικούς τίτλους από 1/100 και πάνω στη μέθοδο MAT. Αναφορές στα άγρια ζώα δίνουν ποσοστά μόλυνσης 13-52%, ανάλογα με το είδος του ζώου, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις έχει βρεθεί μηδενική οροθετικότητα (Natarajaseenivasan et al., 2002; Richardson and Gaunthier, 2003; Langoni et al., 2008).

Στα βοοειδή και τους χοίρους αναφέρονται ποσοστά μόλυνσης πάνω από 50% σε περιοχές, όπου το κλίμα ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού (Natarajaseenivasan et al., 2002; Salinas-Melendez et al., 2007; Langoni et al., 2008). Στα μικρά μηρυκαστικά αναφέρονται ποσοστά μέχρι 60%, ανάλογα με την περιοχή και το ιστορικό υγείας της εκτροφής (Martins and Lilenbaum, 2014).

Σε περιοχές υψηλής επικινδυνότητας, αναφέρονται στους σκύλους ποσοστά οροθετικότητας μέχρι 66% (Natarajaseenivasan et al., 2002; Moore et al., 2006; Golstein, 2010) και στις γάτες μέχρι 35% (Mylonakis et al., 2005; Lapointe et al., 2013).

Στην Ελλάδα, τα ποσοστά μόλυνσης των βοοειδών είναι μέχρι 12,6%, στα μικρά μηρυκαστικά, όταν πρόκειται για περιστατικά αποβολών είναι μέχρι 24,9%, στους χοίρους μέχρι 17,8%, στους σκύλους μέχρι 11,4% (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Bisias et al., 2010-Παράρτημα 2), ενώ ένα ασυνήθιστα υψηλό ποσοστό επιπολασμού (35%) έχει δημοσιευτεί για τις γάτες (Mylonakis et al., 2005). Τα ποσοστά οροθετικότητας είναι ανεξάρτητα της παθογένειας των οροτύπων, αφού δεν συνδέεται απαραίτητα η οροθετικότητα με την παθογένεια του ορότυπου, που την προκαλεί.

Οι συχνότερα απαντώμενοι ορότυποι, που αναδεικνύονται μέσα από τις διάφορες ορολογικές διερευνήσεις, ποικίλλουν στα διάφορα είδη ζώων, όπως

ποικίλλει και η οροθετικότητα. Σε αυτούς, που ορολογικά αναδεικνύονται ως συχνότεροι, αποδίδονται και τα προβλήματα, που αναφέρονται από μόλυνση με το γένος *Leptospira* των διαφόρων ειδών ζώων.

Συχνότεροι ορότυποι στα βοοειδή αναδεικνύονται, ανάλογα με τη χώρα, οι Autumnalis, Bratislava, Grippotyphosa, Hardjo, Castellionis, Pomona, Tarassovi και Wolffi (Guitian et al., 2001; Burriel et al., 2003; Lilenbaum and Souza, 2003; Talpada et al., 2003; Escamilla et al., 2007; Salinas-Melendez et al., 2007; Langoni et al., 2008). Στα μικρά μηρυκαστικά συχνότεροι είναι οι ορότυποι Autumnalis, Castellonis, Griptotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Sejroe, Sermani και άλλοι (Lilenbaum et al., 2009; Luceis and Ferreira, 2011; Barbante et al., 2014).

Στους χοίρους απαντώνται συχνότερα οι ορότυποι Bratislava, Hadjo bovis, Sejroe, Pomona, Shermani και άλλοι (Wasinski, 2007; de Azevedo et al., 2008).

Στους σκύλους και τις γάτες απαντάται ένας μεγάλος αριθμός οροτύπων ανάλογα με την περιοχή (τροπική ή άλλη) ή τη σχέση των ζώων με τους χώρους εκτροφής ή φιλοξενίας τους (Mylonakis et al., 2005; Gimenez-Coello, 2008; Golstein, 2010; Cruz-Romero et al., 2013; Lapointe et al., 2013).

Σε τροπικές περιοχές οι συχνότεροι ορότυποι, που αναγνωρίστηκαν ορολογικά στα ζώα συντροφιάς ήταν οι Autumnalis, Canicola και Icterohemorrhagiae, ενώ μεταξύ των εργατών του ρυζιού της ίδιας περιοχής δεν βρέθηκε μεν ο ορότυπος Canicola, βρέθηκε όμως υψηλή οροθετικότητα στους Australis και Griptotyphosa (Natarajaseenivasan et al., 2002). Αξιοσημείωτο είναι ότι στις ίδιες περιοχές δεν βρέθηκε κανένα ζώο οροθετικό στον τελευταίο ορότυπο, άρα δεν αναγνωρίστηκε η πιθανή δεξαμενή του οροτύπου.

Πρέπει όμως να επισημανθεί, ότι οι προαναφερθέντες ερευνητές χρησιμοποιούν κατά την ορολογική διερεύνηση του παθογόνου ένα μικρό αριθμό οροτύπων. Επίσης χρησιμοποιούν οροτύπους, που χρησιμοποίησαν προγενέστεροι ερευνητές πολλές φορές από ανομοιογενείς κλιματικά περιοχές, υποθέτοντας ότι αυτοί είναι σημαντικοί και στις περιοχές διερεύνησής τους. Αυτές οι επιλογές, λόγω των προβλημάτων ορολογικής διερεύνησης του παθογόνου, που θα αναλυθούν αργότερα, επηρεάζουν και τα τελικά ευρήματα.

Στην Ελλάδα το παθογόνο διερευνήθηκε για πρώτη φορά μετά από πολλές δεκαετίες το χρονικό διάστημα 2001-2003 (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003).

Αυτή η διερεύνηση έγινε με τη μέθοδο MAT στο Ηνωμένο Βασίλειο, με τη χρήση 19 διαφορετικών οροτύπων επιλεγμένων για τις Βρετανικές συνθήκες. Οι ορότυποι αυτοί, που συστηματικά χρησιμοποιούνται στη Μεγάλη Βρετανία, αν και δεν είναι γνωστό ότι ήταν οι καταλληλότεροι για την Ελλάδα, ανέδειξαν ως σημαντικότερους ορότυπους στα βοοειδή τους Bratislava, Australis και Copenhageni, στα πρόβατα τους Bratislava και Australis, στις αίγες τους Bratislava, Copenhageni και Australis, στους χοίρους τους Bratislava, Australis και Copenhageni και στους σκύλους τους Copenhageni και Canicola (Burriel et al. 2003). Σε αυτή τη διερεύνηση παρατηρείται η σημαντική συμμετοχή του ορότυπου Copenhageni, που δεν αναφέρεται συχνά από άλλες χώρες.

Από τα ανωτέρω διαφαίνεται ότι πολλά είδη ζώων (τροφικών και μη), θα μπορούσαν να θεωρηθούν φυσικοί ξενιστές οροτύπων του μικροοργανισμού ή να είναι υποκλινικοί φορείς οροτύπων, που μπορεί να είναι παθογόνοι για άλλα είδη ζώων (Bunnell et al., 2000; Michel et al., 2002; Turk et al., 2003; Cox et al., 2005; WHO, 2006).

Ο μικροοργανισμός εγκαθίσταται και παραμένει στα εσπειραμένα σωληνάρια του νεφρού για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων (Hamir et al., 2001; WHO 2003; Monahan, et al., 2009; de Faria et al., 2007; d'Andon et al., 2014). Διαμέσου αυτών περνάει στα ουροφόρα σωληνάρια και στα ούρα με τελική κατάληξη το περιβάλλον. Στους νεφρούς των ζώων-φορέων, ο μικροοργανισμός μπορεί να μείνει για το υπόλοιπο της ζωής του ζώου καθιστώντας το μόνιμη πηγή μόλυνσης για το περιβάλλον και κατά συνέπεια τον άνθρωπο και τα ευπαθή είδη ζώων. Τα ζώα φορείς, αλλά και τα ευπαθή, είναι πηγές διασποράς συγκεκριμένων οροτύπων σε συγκεκριμένες περιοχές.

Η συγκέντρωση του μικροοργανισμού στα ούρα ενός ευπαθούς ζώου και κατ' επέκταση στο περιβάλλον, εξαρτάται από τη φυσιολογία του μολυσμένου ζώου-ξενιστή. Αν αυτό μολυνθεί και δεν αυτοϊαθεί, θα αποτελέσει τη φυσική δεξαμενή στο περιβάλλον, διότι θα απεκκρίνει τον μικροοργανισμό διαρκώς και σε μεγάλους αριθμούς συγκρινόμενο με τυχαίους ασυμπτωματικούς ξενιστές, όπως θεωρούνται τα διάφορα τρωκτικά και τα πρόβατα (Chernukcha et al, 1974; Hathaway, 1981; Hartskeerl and Terspstra, 1996, Bunnell et al 2000; Cox et al. 2005; Haake, 2006; Monhan et al., 2009).

Το έδαφος και οι συλλογές ύδατος μολύνονται με τα ούρα νέων ζώων φορέων, που με τη σειρά τους γίνονται πηγές μόλυνσης για άλλα είδη ζώων, ευπαθή και μη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου.

Σε αυτό το περιβάλλον ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των περισσότερων παθογόνων οροτύπων του μικροοργανισμού, όταν η μέση ετήσια θερμοκρασία είναι 22⁰C και η διαφορά θερμοκρασιών μεταξύ θέρους και χειμώνα δεν υπερβαίνει του 5⁰C (WHO 2006). Αυτές οι κλιματικές συνθήκες επικρατούν κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, όπου η λεπτοσπείρωση είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό νόσημα (Natarajaseenivasan et al., 2002; Natarajaseenivasan et al., 2004; Berlioz-Arthaud et al., 2007; Kawaguchi et al., 2008; Mahajan et al., 2008; Pappas et al. 2008; Balamurugan et al., 2013).

Στον υπόλοιπο κόσμο το νόσημα εμφανίζει εποχική έξαρση (άνοιξη και φθινόπωρο) ή έξαρση μετά από μεγάλης διάρκειας βροχοπτώσεις την κατάλληλη εποχή για ανάπτυξη του παθογόνου στη φύση (Sanders et al. 1999, Leal–Castellanos et al. 2003, Levett 2004). Όμως οι κλιματικές αλλαγές, που αναμένονται (παγκόσμια άνοδος της θερμοκρασίας) (Lau et al. 2010; Chadsuthi et al., 2012; Revich et al., 2012), θα επηρεάσουν δυσμενώς τη διασπορά παθογόνων οροτύπων του γένους *Leptospira* σε περιοχές, όπου αν και δεν ήταν απαλλαγμένες του μικροοργανισμού, λόγω του ξηρού περιβάλλοντος ή των χαμηλών θερμοκρασιών, που παρατηρούντο κατά το χειμώνα για μεγάλα χρονικά διαστήματα, δεν καταγράφονταν σημαντικές επιπτώσεις στη ζωική παραγωγή και τη Δημόσια Υγεία.

Οι κλιματικές αλλαγές και η συστηματικότερη μελέτη του παθογόνου έχει αποκαλύψει σήμερα την έκταση των ποσοστών μόλυνσης των διαφόρων ειδών ζώων από διαφορετικούς οροτύπους του γένους *Leptospira* στις περιοχές, όπου μελετάται η διασπορά του μικροοργανισμού στη φύση (Baker 1989; Ciceroni et al. 2000, Espi et al. 2000, Burriel et al. 2002, Burriel et al. 2003, Szeredi Land Haake DA 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. Εξαρτάται δε, πέραν των όσων αφορούν το μικροοργανισμό και από την δυνατότητα, που παρέχεται από κρατικούς φορείς για τη συστηματική μελέτη του.

Αναμφίβολα, η λεπτοσπείρωση είναι ευρέως διαδεδομένη στο ζωικό βασίλειο. Οι διαφορές δε, που παρατηρούνται στα ποσοστά μόλυνσης των διαφόρων ειδών ζώων και στους οροτύπους μεταξύ χωρών, αλλά και περιοχών της ίδιας χώρας, δικαιολογούν το ενδιαφέρον των κτηνιατρικών και άλλων εθνικών υπηρεσιών των διαφόρων χωρών, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο. Τα ποσοστά μόλυνσης, που αναφέρονταν παλαιότερα στα παραγωγικά ζώα ήταν μεταξύ 2.8% και 34.5% (Gaumont and Trap 1986; Pritchard 1986). Η ευρύτητα αυτή των ποσοστών μόλυνσης, δεν δηλώνει μόνο τη διασπορά ενός οροτύπου, αλλά δηλώνει κυρίως την επιστημονική και κρατική μέριμνα για τη μελέτη του παθογόνου.

Φαίνεται δε ότι όσο αυξάνεται το επιστημονικό ενδιαφέρον για το παθογόνο και βελτιστοποιούνται οι μέθοδοι μελέτης του, αλλάζουν και τα ποσοστά μόλυνσης των διαφόρων ειδών σπονδυλωτών ανεξάρτητα οροτύπου. Ίσως για αυτό, στις πιο πρόσφατες αναφορές τα ποσοστά μόλυνσης φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερα των προηγούμενων (Natarajaseenivasan et al., 2002; Salinas-Melendez et al., 2007; Langoni et al., 2008; Martins and Lilenbaum, 2014).

Επιπλέον, ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά αναφέρονται πιο συχνά και αφορούν κάποια είδη ζώων με ιδιαίτερο περιβάλλον διαβίωσης, όπως είναι το «νεροβούβαλο» (Water buffalo), που η μόλυνση φτάνει κοντά στο 60 %, προφανώς λόγω της σχέσης του μικροοργανισμού, αλλά και του ζώου, με το υδάτινο περιβάλλον (Mohammad et al. 2006). Βέβαια όταν παρόμοιες μελέτες προστίθενται στην υπάρχουσα γνώση, η επιδημιολογική εικόνα αλλάζει, αλλάζοντας τη σημαντικότητα της μόλυνσης των ζώων και κατ' επέκταση αυτής του ανθρώπου.

Έτσι αυξάνει και η σημαντικότητα της ποικιλομορφίας, που παρατηρείται στη συχνότητα παρουσίας των διαφόρων οροτύπων στη φύση, εγείροντας πολλά ερωτηματικά για τους παράγοντες, που επηρεάζουν τη διασπορά των οροτύπων κατά τη μόλυνση των ζώων.

Μεταξύ αυτών των παραγόντων ιδιαίτερη σημασία έχει η προσαρμογή των οροτύπων στο είδος ζώου, η φυσική αντοχή των ζώων ξενιστών σε ένα ορότυπο, οι αλλαγές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (κλίμα, υγρασία, γεωργική δραστηριότητα), αλλά και τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού, που ορίζουν την παθογένεια του κάθε οροτύπου και τα οποία έχουν ελάχιστα μελετηθεί λόγω της φύσεως του

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

1.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LEPTOSPIRA*

Η κλινική έκφραση της μόλυνσης από την σπειροχαίτη *Leptospira* εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες κυριότεροι των οποίων είναι η γενετική δομή των οροτύπων και το βιολογικό περιβάλλον του είδους ζώου, στο οποίο έκαστος φιλοξενείται. Οι μελέτες για την αναγνώριση των μηχανισμών παθογένειας, γίνονται κυρίως **in vitro** (Hamir et al., 2001; Cullen et al., 2005; Subramarian and Sekaran, 2006), διότι η **in vivo** μελέτη του παθογόνου είναι ιδιαίτερα δύσκολη.

Από τις ελάχιστες **in vivo** μελέτες, που έχουν γίνει, κάποιες δείχνουν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων παθογόνων παραγόντων διαφορετικών οροτύπων, ενώ άλλες αναφέρουν ότι τα ευρήματα είναι συγκρίσιμα (Nally et al., 2007; de Faria et al., 2007; Monahan et al., 2009; Adler and Moctezuma, 2010; d'Andon et al., 2014).

Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται στην σύνθεση – έκφραση των δομών της εξωτερικής στοιβάδας της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης του παθογόνου. Πιθανολογείται, ότι είναι οι δομές αυτές που καθορίζουν το βαθμό παθογένειας, ως προς το είδος ζώου ή ιστού, που μολύνεται από ένα ορότυπο. Αυτοί οι μηχανισμοί, που είναι πιθανολογούμενα σημαντικά αντιγόνα, δηλαδή δεν έχει ακόμη αποδειχθεί ο πραγματικός ρόλος τους (Cullen et al., 2005; Nally et al., 2007; Wang et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Cinco, 2010; d'Andon et al., 2014), φαίνεται ότι επηρεάζουν τη λειτουργία του κυττάρου ξενιστή και την ανοσολογική του διέγερση.

Για την επιβεβαίωση της σημαντικότητας τους στην παθογένεια και την ανοσοδιέγερση απαιτούνται παγκόσμιες ερευνητικές συνεργασίες, αφού οι αναγνωρισμένοι ορότυποι διαφέρουν σημαντικότερα από περιοχή σε περιοχή και χώρα, άρα είναι πολλοί και πιθανώς διαφέρουν ακόμη και σε επίπεδο στελέχους. Δηλαδή, αν και είναι ίδιοι ως προς τις βασικές ιδιότητες αναγνώρισης, μπορεί να διαφέρουν ως στελέχη στην παθογενετικότητα (He et al., 2007; Monahan et al., 2008; Eslabao et al., 2010).

Ο καθορισμός του **in vivo** ρόλου των αντιγόνων στην παθογενετικότητα των γνωστών οροτύπων ή στελεχών θα βοηθούσε στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων εμβολίων για περισσότερα είδη ζώων, γι' αυτό και οι έρευνες προσανατολίζονται προς αυτή την κατεύθυνση (Wang et al., 2007).

Εδώ και 10-15 χρόνια γίνεται προσπάθεια τέτοιοι παθογόνοι παράγοντες να αναγνωρίζονται με μοριακές μεθόδους. Αυτή η δυνατότητα θα βοηθούσε να γίνεται πρώιμη αναγνώριση σημαντικών οροτύπων των θετικών ξενιστών και η σύνδεσή τους με τα κλινικά ευρήματα από συγκεκριμένους ιστούς, που τους φιλοξενούν (Gravenkamp et al., 1993; Nascimento et al., 2004; Palaniappan et al., 2005; Morey et al., 2006; Fearnley et al., 2008; Bomfim and Koury, 2006; Cai et al., 2010).

Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας του παθογόνου σε μοριακό επίπεδο, κυρίως σε χώρες με αυξημένα ποσοστά μόλυνσης στον άνθρωπο (Natarajaseenivasan et al., 2004; He et al., 2007), μπορεί να βοηθήσει επίσης στην καλύτερη κατανόηση της παθογενετικής σχέσης τους με τον άνθρωπο και τα διάφορα είδη ζώων. Αυτή η κατανόηση θα βοηθήσει κυρίως την παρασκευή αποτελεσματικότερων εμβολίων για τον άνθρωπο και τα είδη ζώων, που γίνονται πηγές μόλυνσης του ανθρώπου (Nally et al., 2007; Wang et al., 2007). Επίσης η μελέτη οροτύπων, που προέρχονται από την άγρια πανίδα (Bunnell et al., 2000; Turk et al., 2003; Felt et al., 2011), θα βοηθήσει στη γνώση της επιδημιολογικής εξέλιξης των διαφόρων οροτύπων, δηλαδή την εμφάνιση ή εξαφάνιση αυτών από τη φύση. Επιπλέον ίσως εξηγήσει την αιτία βάσει της οποίας αυτοί οι ορότυποι διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή και χώρα ή εναλλάσσονται ποσοστιαία μεταξύ των ετών διερεύνησης στην ίδια χώρα (Burriel et al. 2003; Jansen et al., 2005; He et al., 2007).

Όπως φαίνεται, η λεπτοσπείρωση είναι αποτέλεσμα της δράσης πολλών παραγόντων. Μεταξύ αυτών ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι λοιμογόνοι παράγοντες, που καθορίζουν την επιβίωση ενός οροτύπου στο φυσιολογικό περιβάλλον των ιστών του ξενιστή του (Patarakul et al., 2010; Caimano et al., 2014) και ιδιαίτερα οι μηχανισμοί της αποίκησης του νεφρικού ιστού. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι ελάχιστα τεκμηριωμένοι, άρα δεν είναι καλά κατανοητοί ακόμη οι μηχανισμοί, που χρησιμοποιεί ο μικροοργανισμός για να παραμείνει στον ξενιστή χωρίς την πρόκληση νόσου (Monahan et al. 2008).

Ως εκ τούτου, είναι ακόμη δύσκολο να αποφανθεί κανείς με βεβαιότητα για τον τρόπο με τον οποίο εκδηλώνεται σφοδρή κλινική νόσος σε κάποια μολυσμένα ζώα ή τον άνθρωπο, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο σε άλλα άτομα της ίδιας ομάδας από τον ίδιο παθογόνο ορότυπο. Οι διάφορες πιθανότητες της δράσης των μηχανισμών παθογένειας διερευνώνται συνεχώς και καταλήγουν σε ερευνητικές προτάσεις, ώστε να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί παθογένειας του μικροοργανισμού.

Δυστυχώς όμως, τα διάφορα ερευνητικά ερωτήματα δεν έχουν απαντηθεί ικανοποιητικά, ακόμη και για πειραματισμούς, που χρησιμοποιούν μεγάλες ομάδες εργαστηριακών πειραματόζωων, όπως είναι τα διάφορα τρωκτικά, πόσο μάλλον για άλλα είδη ζώων, που δύσκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες ομάδες για περισσότερους του ενός οροτύπους (Nally et al. 2005; Nascimento et al. 2004). Αυτές οι αδυναμίες δυσκολεύουν πολύ τη συγκριτική μελέτη διαφορετικών οροτύπων ή στελεχών τους, που μολύνουν ζώα της ίδιας ομάδας ή ακόμη και το ίδιο ζώο.

Οι πειραματισμοί, που έχουν γίνει μέχρι τώρα, επιβεβαιώνουν, ανεξάρτητα του είδους ζώου, ότι ο νεφρικός ιστός είναι ο ιστός προτίμησης του μικροοργανισμού, είτε πρόκειται για κλινική είτε πρόκειται για ασυπτωματική μόλυνση (Faine et al. 1999; Yang et al. 2001; d'Andon et al., 2014).

Η αρχική μόλυνση ενός ζώου καταλήγει μεν σε μόλυνση όλων των οργάνων του, αλλά σε περίπτωση που δεν προκληθεί σοβαρή βλάβη ή εάν επέλθει ίαση μετά από την κλινική εκδήλωση, ο μικροοργανισμός περιορίζεται τελικά μόνο στον ιστό προτίμησής του, δηλαδή το νεφρικό (Cheville et al. 1980; Vihn et al., 1984; Athanazio et al. 2008; De Daher et al., 2010; Patarakul et al., 2010; Choy et al., 2012; Caimano et al., 2014). Εδώ παραμένει για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή και για όλη τη ζωή του ξενιστή του, ανάλογα με το είδος ζώου. Συνέπεια αυτής της εντόπισης είναι η απέκκρισή του με τα ούρα, συνεχόμενα ή μη, ανάλογα με το είδος του προσβεβλημένου ζώου.

Τελικά ο κύκλος της μόλυνσης ξεκινά και πάλι με την μόλυνση του περιβάλλοντος και την αναπαραγωγή του παθογόνου σε ένα νέο περιβάλλον. Ο νέος ξενιστής μολύνει στη συνέχεια με τις απεκκρίσεις του το δικό του περιβάλλον, άρα και άλλα ευπαθή ζώα, με αποτέλεσμα τη διατήρηση των διάφορων οροτύπων στη φύση, που μπορεί να καταλήξει στη μόλυνση του ανθρώπου.

Ο λόγος βάσει του οποίου παραμένει ο μικροοργανισμός στο νεφρικό ιστό χωρίς να προκαλούνται ιστικές αλλοιώσεις, άρα χωρίς κλινική εκδήλωση, αλλά και το πώς συμβαίνει αυτό είναι ένα σημαντικό ερώτημα, που χρήζει διερεύνησης. Για το σκοπό αυτό ομάδες ερευνητών με μακροχρόνια εμπειρία στις ιδιαιτερότητες, που παρουσιάζει η μόλυνση από το γένος *Leptospira*, προτείνουν ως σημεία, που χρήζουν συνεχή και εις βάθος διερεύνηση τα εξής

- Την πιθανότητα να αποτελεί ο νεφρικός ιστός «προνομιούχα ανοσολογική» περιοχή για τον μικροοργανισμό. Δηλαδή μια περιοχή που δεν «αντιστέκεται» στην παρουσία του, άρα πρέπει να απαντηθεί το πώς και το γιατί αποφεύγει ο μικροοργανισμός τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή ιστού.
- Τη σχέση των ειδικών για το μικροοργανισμό ανοσοσφαιρινών, κυρίως των IgG, που υπάρχουν στο ούρο, με την παρουσία και παραμονή του μικροοργανισμού στο νεφρικό ιστό.
- Την πιθανότητα να είναι ο μικροοργανισμός ικανός να αποφύγει αυτές τις ανοσοσφαιρίνες, αλλά και τον τρόπο με τον οποίον το επιτυγχάνει.
- Την προσπάθεια ανίχνευσης πρωτεϊνών χαρακτηριστικών του μικροοργανισμού, που ίσως επηρεάζουν την εγκατάστασή του στο νεφρικό ιστό.
- Την αναγνώριση των παραγόντων προδιάθεσης (διατροφή, περιβάλλον, είδος, φυλή, φύλο ζώου), οι οποίοι ίσως επηρεάζουν την αρχική εγκατάσταση του μικροοργανισμού στο νεφρικό ιστό.
- Τη συνεχή διερεύνηση για την αναγνώριση άλλων μηχανισμών, όπως είναι διάφορα χαρακτηριστικά της δομής του μικροοργανισμού, τους οποίους πιθανώς χρησιμοποιεί για να αποφύγει την ανοσοδιέγερση και έτσι να εγκατασταθεί στο νεφρικό ιστό και
- Την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού του μικροοργανισμού, τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως τοξικές ουσίες, προκαλώντας αναστρέψιμες και μη αλλοιώσεις στους μολυσμένους ιστούς (Cheville et al., 1980; Athanazio et al., 2008; Monahan et al 2009; de Daher et al., 2010; Choy et al., 2012; Caimano et al., 2014; d'Andon et al., 2014)

Όλα όμως τα παραπάνω απαιτούν την απομόνωση του παθογόνου παράγοντα από το είδος ζώου-ξενιστή, που θα γίνει πειραματικό μοντέλο για την μελέτη τους.

Αυτό το πειραματικό μοντέλο θα πρέπει να βασιστεί σε δύο σημαντικές αρχές. Την αρχή της ορθής επιλογής του πιο παθογόνου στελέχους και την αρχή της ορθής επιλογής του πειραματόζωου, που είναι πιο ευαίσθητο στη δράση του προς μελέτη επιλεγμένου στελέχους. Δυστυχώς και τα δύο είναι ιδιαίτερα δύσκολα έως και ανέφικτα, ανάλογα με τα ζώα επιλογής για πειραματισμούς.

Μία πρώιμη εκδήλωση της μόλυνσης από παθογόνους οροτύπους *Leptospira* spp. στα ευπαθή ζώα, συγκριτικά με τα χρόνια μολυσμένα ζώα, είναι η γρήγορη εμφάνιση σοβαρών κλινικών ευρημάτων, που είναι κυρίως αποτέλεσμα της βλάβης του νεφρικού ιστού (Monahan et al., 2009). Οι βλάβες στον νεφρικό ιστό μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα της άμεσης παρουσίας του μικροοργανισμού, είτε αποτέλεσμα της ανοσολογικής αντίδρασης του νεφρού σε συγκεκριμένα αντιγόνα του συγκεκριμένου οροτύπου (Yang 2007). Η δε κλινική εκδήλωση αυτών των βλαβών εξαρτάται από τη μορφή της μόλυνσης, που μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια, άρα επηρεάζεται από πολλούς και διαφορετικούς, άγνωστους παράγοντες.

Προσπάθεια κατανόησης των παραγόντων, που επηρεάζουν την τελική έκβαση της μόλυνσης, κυρίως την κλινική μορφή της, καθώς και τις ιστικές αλλοιώσεις, που προκαλούνται από αυτή, με κύριο ιστό μελέτης το νεφρικό, γίνονται συστηματικά στους αρουραίους και στα ινδικά χοιρίδια (Nalley et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Parakul et al., 2010; Caimano et al., 2014; d'Andon et al., 2014). Σε αυτά τα είδη ζώων έχει μελετηθεί ο χρόνος, που απαιτείται μετά την πειραματική μόλυνση με το επιλεγμένο στέλεχος του μικροοργανισμού για την εμφάνιση των ιστικών αλλοιώσεων, καθώς και οι πιθανοί λόγοι, που διαφοροποιούν τις αλλοιώσεις αυτές κατά την οξεία και τη χρόνια μορφή της (de Faria et al. 2007;).

Πολύ πριν την ραγδαία ανάπτυξη της μοριακής μικροβιολογίας, μελετητές του μικροοργανισμού παρατήρησαν ότι η προσκόλληση παθογόνων οροτύπων στους μικρομεμβρανικούς υποδοχείς (microvilli) των επιθηλιακών κυττάρων των εσπειραμένων σωληναρίων (tubules) προκαλούσε καταστροφή των τριχοειδών αγγείων και κατέληγε σε αιμορραγία (αιματοουρία).

Σε **in vitro** παρατήρηση και σύγκριση παθογόνων και μη οροτύπων παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό και τον τρόπο προσκόλλησης των παθογόνων οροτύπων σε επιλεγμένες γραμμές κυτταροκαλλιέργειών (Vihn et al. 1984; Ballard et al., 1986; Barocchi et al., 2002; Barbosa et al., 2009). Ο βαθμός και ο

τρόπος καταστροφής των προσβεβλημένων κυττάρων, είτε λόγω τοξινών, είτε λόγω φαγοκυττάρωσης, επιβεβαιώνουν τον τρόπο με τον οποίο προκαλούν βλάβη **in vivo** οι διάφοροι παθογόνοι ορότυποι.

Φυσικά για να δράσουν αποτελεσματικά κατά των ιστών προτίμησης τους θα πρέπει να αποφεύγουν τη φυσική και επίκτητη ανοσία του ξενιστή τους. Έχει παρατηρηθεί ότι τα παθογόνα στελέχη αναπτύσσουν ανθεκτικότητα κατά της βλαβερής δράσης του συμπληρώματος του ορού του αίματος (Barbosa et al. 2009). Οι μικροοργανισμοί, που επιβιώνουν από τη βλαβερή δράση του συμπληρώματος, προσκολλώνται τελικά σε ιστούς επιλογής τους ή διεισδύουν στα κύτταρα των ιστών με αποτέλεσμα την καταστροφή τους (Vinh et al., 1984; Barocchi et al., 2002; Cinco, 2010).

Ο προσβεβλημένος νεφρικός ιστός εμφανίζει μικροσκοπικά αρχικά διάμεση σπειραματονεφρίτιδα (tubulointerstitial nephritis), που χαρακτηρίζεται από οίδημα και λεμφοκυτταρική διήθηση (Yang et al. 2001). Αυτή εξελίσσεται τελικά σε ατροφία των σπειραμάτων (tubular atrophy), ινώδη εκφύλιση (McIntyre et al. 1952; Sterling et al. 1981) και νεφρική ανεπάρκεια με διάφορες κλινικές εκδηλώσεις, όπως παρατηρείται πειραματικά (d'Andon et al., 2014).

Αν τελικά η μόλυνση ξεφύγει του νεφρικού ιστού, είτε λόγω της παθογένειας του μολύνοντα οροτύπου (Ahmed et al., 2012; Lehmann et al., 2014) είτε λόγω της ευπάθειας του ξενιστή (Koizumi and Watanabe, 2005; Johnson, 1996; Lehmann et al., 2014) τότε και άλλοι τύποι ιστών μολύνονται και η μόλυνση γίνεται πολυσυστημική. Όμως είτε η βλάβη αφορά ένα μόνο ιστό (πχ το νεφρικό) είτε πολλά όργανα συγχρόνως, ο ξενιστής θα εμφανίσει σε μια ευρεία κλίμακα τις συνέπειες της δράσης του παθογόνου. Άρα, η έκταση της διασποράς και των λειτουργικών βλαβών, που προκαλεί το παθογόνο, καθορίζουν τις δύο κύριες μορφές της κλινικής εκδήλωσης της λεπτοσπείρωσης, που είναι η οξεία ή ικτερική μορφή και η χρόνια ή μη ικτερική (Levett and Haake, 2010). Οι δύο μορφές περιγράφονται συχνότερα σε κλινικά περιστατικά του ανθρώπου, αλλά παρατηρούνται και στα ζώα.

Στα ζώα η κλινική εκδήλωση της λεπτοσπείρωσης εξαρτάται από το είδος του ζώου, τις συνθήκες διαβίωσής του, κυρίως για τα παραγωγικά ζώα, το ιστορικό υγείας του (σύμμεικτες λοιμώξεις), την ομάδα των ζώων (εμβολιασμένα ή μη, προηγούμενη πιθανή μόλυνση ή μη) και τέλος, όπως προαναφέρθηκε, τη λοιμογόνο ικανότητα του

μολύνοντα οροτύπου (Plank et al., 2000; Szeredi and Haake, 2006; WHO 2006; d' Faria et al. 2007; Nally et al., 2007; Ortega- Pacheco et al. 2008; Murrey et al., 2009).

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 αγαλαξία των μηρυκαστικών, κυρίως των βοοειδών (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 ήπιες εκδηλώσεις των ανωτέρω, καθώς και οι αποβολές και οι 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 η χαρακτηριστική περιοδική οφθαλμίτιδα των σαρκοφάγων (Townsend et al., 2006), του ανθρώπου (Gupta et al., 2007) και των ιπποειδών (Faber et al., 2000).

Η μόλυνση των παραγωγικών ζώων είναι σημαντική διότι καταλήγει σε μείωση της παραγωγικότητας, αφού προκαλεί αποβολές, γέννηση θνησιγενών νεογνών, μείωση της γαλακτοπαραγωγής, ακόμη και καθυστέρηση της ανάπτυξης (Faine et al. 1999).

Επομένως, το παθογόνο θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται μεταξύ των αιτιών, που επηρεάζουν την απόδοση των παραγωγικών ζώων, συμπεριλαμβανομένων των μικρών μηρυκαστικών. Δηλαδή θα πρέπει να διερευνάται συστηματικά, ώστε να λαμβάνονται και τα κατάλληλα μέτρα περιορισμού των επιπτώσεων της μόλυνσης .

Ανεξάρτητα των επιπτώσεων της χρόνιας μορφής της λεπτοσπείρωσης, ιδιαίτερη σημασία για την εργαστηριακή διερεύνηση της μόλυνσης έχει η μακροχρόνια εγκατάσταση του μικροοργανισμού σε ιστούς της προτίμησης του, όπως είναι ο νεφρικός (Baker et al., 1989; d' Faria et al., 2007; Ortega- Pacheco et al., 2008; Monahan et al., 2009), αλλά και το γεννητικό σύστημα των ζώων (Szeredi and Haake, 2006; Saglam et al., 2008). Αυτές οι εντοπίσεις, καθώς επίσης και οι ιδιαιτερότητες απομόνωσης 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), κυρίως κατά την διάρκεια της ζωής του ξενιστή.

Από την μέχρι τώρα παραχθείσα γνώση διαφαίνεται ότι τα παθογόνα είδη του γένους *Leptospira* και οι ορότυποί τους, χρησιμοποιούν αποτελεσματικότερα τα δικά τους λοιμογόνα χαρακτηριστικά εις βάρος κάποιων συγκεκριμένων ιστών του ξενιστή τους με δύο τρόπους. Είτε διεγείροντας τους ξενιστές ιστούς για παραγωγή «τοξικών» παραγόντων, που παράγονται από ένα ορότυπο κατά του ιδίου, είτε μέσω ιδιαίτερων μηχανισμών παθογένειας, που διερευνώνται συστηματικά, αφού είναι ακόμη άγνωστοι (Segers et al., 1990; Nally et al., 2007; Cinco, 2010; d'Andon et al., 2014).

Γενικώς, οι πολλαπλές επιδράσεις, που φαίνεται να έχουν οι παθογόνοι ορότυποι στα κύτταρα, που μολύνουν, δεν έχουν καλά μελετηθεί, πιθανότατα λόγω των δυσκολιών απομόνωσης, συντήρησης και εργαστηριακής πειραματικής διαχείρισης του μικροοργανισμού. Για τους ίδιους λόγους είναι δύσκολο να εντοπιστούν τα ζώα φορείς, που μπορεί μεν να παραμείνουν αφανείς δεξαμενές του μικροοργανισμού, αλλά ίσως και να νοσήσουν, σε περίπτωση που κάποιοι προδιαθέτοντες παράγοντες επιτρέψουν τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου σε κάποια στιγμή της ζωής του ζώου - ξενιστή.

Ιδιαίτερα χρήσιμες σε αυτού του είδους τη μελέτη είναι διάφορες μοριακές μέθοδοι, που έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες και λόγω της μείωσης του κόστους τους και της συνεχούς βελτίωσης της χρήσης τους, έχουν γίνει εργαλεία μελέτης των διαφόρων οροτύπων της λεπτόσπειρας. Αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μελέτη της μοριακής δομής του μικροοργανισμού για τον καθορισμό των μοριακών διαφορών μεταξύ των οροτύπων, με σκοπό την ταυτοποίησή των. Επί πλέον, η αναγνώριση μοριακών διαφορών μεταξύ οροτύπων ή στελεχών αυξάνει και την πιθανότητα καλύτερης κατανόησης των πιθανών παραγόντων παθογενετικότητας. Βέβαια, αυτές οι μελέτες προϋποθέτουν την απομόνωση του παθογόνου από το προς μελέτη είδος ζώου (Yang et al. 2002; Turk et al., 2003; Levett, 2004; Nally et al., 2007; Monahan et al., 2008; Barbosa et al., 2009; Murrey et al., 2009; Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; Calderano et al., 2014).

1.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ

Η αυξανόμενη γνώση, ως προς τους κοινούς παθογόνους μηχανισμούς σημαντικών παθογόνων οροτύπων **in vivo** και **in vitro** (Cullen et al., 2005; Nally et al., 2007; Monahan et al., 2008; Murray et al., 2008), συντελεί στην βελτιστοποίηση των μεθόδων διάγνωσης και επιβεβαίωσης μιας κλινικής ή υποκλινικής μόλυνσης. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι διάφορες τεχνικές PCR, που έχουν αναπαραχθεί και συνεχώς βελτιώνονται. Η PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση της ύπαρξης του παθογόνου κυρίως σε δείγματα ιστών και ούρου (Yang et al. 2002; Turk et al., 2003; Magajevski and Scarcelli 2005; Palaniappan et al., 2005; Bomfim and Koury, 2006; Lilenbaun et al., 2008; Ko et al., 2009; Slack et al., 2009; Calderaro et al., 2014).

Οι δυσκολίες στην απομόνωση λόγω αδυναμίας των διαθέσιμων τεχνικών δυνατοτήτων ενός εργαστηρίου ή των υποδομών βιοασφάλειας, καθώς και η αδυναμία των ορολογικών μεθόδων να επιβεβαιώσουν την πραγματική παρουσία του μικροοργανισμού στους ιστούς, κατά το χρόνο της διερεύνησής του (Levett, 2004; Levett and Haake, 2010; Hartskeerl et al., 2011), ευνοούν την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων διάγνωσης της μόλυνσης. Η ανίχνευση του παθογόνου στο ούρο των ζώων φορέων, με μοριακές μεθόδους (Monahan et al., 2008; Bomfim and Koury, 2006; Goldstein, 2010; Ahmed et al., 2014), θα βοηθούσε στη λήψη μέτρων πρόληψης για τον περιορισμό της μόλυνσης του ανθρώπου ή των ζώων, κυρίως των παραγωγικών.

Πέρα όμως, από την πρόληψη, η με βεβαιότητα επιβεβαίωση της ύπαρξης του μικροοργανισμού σε προσβεβλημένους ιστούς, όπως τα προϊόντα αποβολής (Guitian et al., 2001; Leon et al., 2006; Vemulapalli et al 2005; Szeredi and Haake, 2006; Lilenbaum et al., 2009) βοηθάει τη διαφορική διάγνωση και την εκτίμηση της οικονομικής σημασίας της μόλυνσης, άρα τη λήψη μέτρων μελλοντικής προφύλαξης.

Η αποτελεσματικότητα των μέτρων αυτών θα μπορούσε με ασφάλεια να ελεγχθεί με την ανάπτυξη οικονομικών και εύκολων στη χρήση μοριακών μεθόδων ανίχνευσης του παθογόνου σε επίπεδο οροτύπου στα σωματικά υγρά του γεννητικού συστήματος θηλέων και αρρένων ζώων (Lilenbaum et al., 2009). Η συνεχής προσπάθεια επακριβούς διάγνωσης με μοριακές μεθόδους, όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης από *Leptospira* spp, και η ανάγκη αναγνώρισης των οροτύπων, που

μολύνουν ένα ξενιστή, συνέβαλε καθοριστικά στην αναταξινόμηση των παθογόνων οροτύπων.

Αποτέλεσμα αυτών των γνώσεων είναι, αν και δεν έχουν γίνει σημαντικές αλλαγές στα παθογόνα είδη, που εξακολουθούν να είναι οκτώ (**Πινάκας 1**), να ταξινομηθούν δύο επιπλέον μέτριας παθογένειας είδη και ένα μη παθογόνο (Turk et al., 2003; Ko et al., 2009; Calderaro et al., 2014). Παραμένει άγνωστο τι τελικά θα αναδείξει η συνεχής μοριακή μελέτη του γένους *Leptospira*.

Όμως, ήδη διαφαίνεται ότι υπάρχει μακρύς επιστημονικός δρόμος να διανυθεί, αφού δεν υπάρχει ακόμη ένας κοινός τρόπος μοριακής διαφοροποίησης των οροτύπων του παθογόνου. Οι επιστήμονες κάθε χώρας για την εξέλιξη των μοριακών μεθόδων εστιάζουν τις έρευνες σε ορότυπους, που μολύνουν συχνότερα συγκεκριμένα είδη ζώων ή σε κλινικά δείγματα, που θεωρούν σημαντικότερα για να αναγνωριστεί και να μελετηθεί μοριακά ο μικροοργανισμός (Cai et al., 2010; Bomfim and Koury, 2006; Morey et al., 2006; Turk et al., 2003; He et al., 2007; Ko et al., 2009; Natarajaseenivasan et al 2004).

Η γνώση πολλαπλασιάζεται μεν, αλλά οι δυσκολίες κατέληγαν στη μη συστηματική διάδοση της αποκτηθείσας γνώσης, με αποτέλεσμα να αναδειχθεί το 2009 – 2010 η πρώτη προσπάθεια δημιουργίας ηλεκτρονικής κατάθεσης αναγνωρισμένων αλληλουχιών (LepBank), ώστε να συγκεντρωθούν οι πληροφορίες, που υπάρχουν από τις διάφορες φυλογενετικές μελέτες του γένους (Eslabao et al., 2010). Η οργάνωση και η ελεύθερη χρήση της γνώσης αυτής θα βοηθήσει στην ερμηνεία της γενετικής ποικιλότητας, που παρατηρείται και έχει οδηγήσει στην αναγνώριση περισσότερων των 270 οροτύπων με ελάχιστη ή καθόλου αντιγονική συγγένεια μεταξύ τους (Wang et al., 2007). Με αυτή τη γνώση αυξάνεται και η πιθανότητα ερμηνείας της μεγάλης γενετικής διασποράς των οροτύπων και κυρίως η ανάπτυξη αξιόπιστης μοριακής μεθόδου διαφοροποίησης των οροτύπων, που μολύνουν ένα ξενιστή.

Η χρονοβόρος ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο εργαστήριο, όπως επίσης και η δυσκολία ελέγχου των παραγόντων, που την επηρεάζουν, έχει σαν αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η μοριακή μελέτη των οροτύπων, αφού δεν απομονώνεται ικανοποιητικός αριθμός από πολλές χώρες και περιοχές (Adler and Moctezuma, 2010). Άρα, είναι λίγες οι μελέτες, που δίνουν πληροφορίες για τους παράγοντες

παθογένειας των οροτύπων, ενώ ένας άλλος αρνητικός παράγοντας είναι η απώλεια των παραγόντων παθογενετικότητας με την ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού κατά τη συντήρησή του στο εργαστήριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Girons et al., 2000).

Είναι γνωστό ότι το 80% των αναγνωρισμένων γονιδίων του είδους *L. interrogans*, που είναι το καλύτερα μελετημένο είδος, κωδικοποιεί άγνωστες μέχρι σήμερα πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες προφανώς για πολλά σημαντικά μοριακά χαρακτηριστικά αυτού του είδους, που είναι άγνωστα ακόμη.

Άρα, εξίσου άγνωστοι είναι και οι μηχανισμοί παθογενετικότητας αυτού του είδους και κατ' επέκταση του γένους *Leptospira*. Επομένως είναι δύσκολη τόσο η εξήγηση των διαφορών, που παρατηρούνται μεταξύ των οροτύπων του είδους *L. interrogans* όσον και της συμπεριφοράς αυτών σε διαφορετικά είδη ζώων ξενιστών. Αφού αυτά τα προβλήματα αφορούν το καλύτερα μοριακά μελετημένο εκ των παθογόνων ειδών, δικαίως είναι κοινώς αποδεκτό ότι ο μικροοργανισμός έχει παράγοντες παθογένειας, που δεν μπορούν να αναγνωριστούν με κοινότυπους εργαστηριακούς τρόπους (Adler and Moctezuma, 2010).

Από τη μέχρι τώρα μελέτη του γένους *Leptospira* έχει διαφανεί ότι, για τουλάχιστον ένα μικρό αριθμό οροτύπων, που μελετήθηκαν συστηματικότερα μέχρι τώρα με μοριακές μεθόδους, σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του μικροοργανισμού παίζει η διέγερση υποδοχέων (toll-like receptors, or TLR) του κυττάρου ξενιστή, που αναγνωρίζουν πολυσακχαρίτες και γλυκολιπίδια (Cook et al. 2004; Yang et al. 2007). Αυξημένοι αριθμοί διαφορετικών κλάσεων τέτοιων υποδοχέων έχουν αναγνωριστεί στο νεφρικό ιστό (Werts et al. 2001). Άρα, ο τροπισμός και η παθογένεια του μικροοργανισμού φαίνεται ότι εξαρτώνται από την σύνδεσή του με αυτούς τους υποδοχείς. Αυτή η σύνδεση πιστεύεται ότι βοηθάει την απελευθέρωση διαφόρων τοξικών παραγόντων για τους ιστούς του ξενιστή. Ένας τέτοιος παράγων είναι ο TNF- α (tumor necrosis factor), ο οποίος όμως έχει μελετηθεί μόνο σε συνάφεια με τα τρωκτικά, που αποτέλεσαν τα πειραματόζωα για τη μελέτη του μικροοργανισμού (Yang et al. 2002; Yang et al 2006). Απαραίτητη είναι, επομένως, η πειραματική και μοριακή μελέτη αυτών των παραγόντων παθογενετικότητας σε άλλα είδη ζώων, ώστε να καθοριστεί και ο βαθμός παθογένειας των διάφορων οροτύπων, που ορολογικά αναφέρονται ότι μολύνουν τα ζώα.

Άρα, η μελέτη της διασποράς των παθογόνων οροτύπων, των μηχανισμών παθογενετικότητας αυτών και της μοριακής τους ανίχνευσης **in vivo** εξαρτώνται από τη μοριακή συγκρότηση πληθώρας παραγόντων, που είναι δύσκολο να προσδιοριστούν, να ταξινομηθούν και να διερευνηθούν σε βάθος, ώστε να επιτρέψουν την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών πρόκλησης βλάβης στους ιστούς από τους διάφορους οροτύπους ξεχωριστά.

Αν και υπάρχουν δυσκολίες στη μελέτη της παθογένειας του μικροοργανισμού, οι μοριακές διαφορές, που παρατηρούνται στα διάφορα είδη ζώων, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα γενετικών παραγόντων, όχι τόσο του μικροοργανισμού, αλλά κυρίως του ζώου – ξενιστή, όταν έρχεται σε επαφή με το παθογόνο. Αυτοί οι γενετικοί παράγοντες επιτρέπουν σε κάποιους οροτύπους να προσκολληθούν και να παραμείνουν στους ιστούς ενός συγκεκριμένου ξενιστή, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με άλλα είδη ζώων ή ακόμη και με άτομα εντός του ίδιου είδους ή και με άλλους εξ ίσου παθογόνους οροτύπους (Monahan et al., 2008). Γενετικοί επομένως παράγοντες του ζώου-ξενιστή βοηθούν τον μικροοργανισμό να χρησιμοποιήσει πιο αποτελεσματικά τους δικούς του μοριακούς παράγοντες ενίσχυσης της παθογένειάς του (Ristow et al., 2007). Πιθανώς παρόμοια ερμηνεία μπορεί να προσδοθεί και στις διαφορές στην εξέλιξη της μόλυνσης, που παρατηρούνται μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους ζώου. Το τελευταίο προσδίδει ιδιαίτερη έμφαση στους λόγους, που δεν έχουν ακόμη επιτρέψει στους ερευνητές να γνωρίσουν τον τρόπο, με τον οποίο προκαλούν ασθένεια οι διάφοροι ορότυποι.

Συμπεραίνεται ότι αποτέλεσμα των δυσκολιών μελέτης του τρόπου αλληλεπίδρασης ξενιστή – παθογόνου είναι,

1. Η μη συστηματική μελέτη οροτύπων του μικροοργανισμού, που ανιχνεύονται στα ζώα και τον άνθρωπο σε χώρες, που δεν έχουν την οικονομική και τεχνολογική υποδομή να απομονώσουν παθογόνους οροτύπους και να τους μελετήσουν πειραματικά και μοριακά **in vivo** και **in vitro**.
2. Ο περιορισμός των μελετών μέχρι πολύ πρόσφατα στην απλή ορολογική διερεύνηση των οροτύπων του μικροοργανισμού στα διάφορα είδη ζώων και
3. Η παραγωγή εμβολίων από χώρες, που χρηματοδοτούν την επιστημονική δραστηριότητα για την εξυπηρέτηση των δικών τους αναγκών. Αποτέλεσμα της κατεύθυνσης αυτής είναι τα εμπορικά εμβόλια, που υπάρχουν, να διατίθενται σε

χώρες όπου δεν έχουν μελετήσει το μικροοργανισμό συστηματικά, άρα δεν γνωρίζουν με ακρίβεια τη διασπορά των οροτύπων, που αφορούν κυρίως στα δικά τους παραγωγικά ζώα. Τα εμβόλια αυτά δεν μπορεί παρά να είναι σε ένα μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικά. Η συστηματική μελέτη απαιτεί Εθνικό Φορέα αφιερωμένο στον μικροοργανισμό. Η έλλειψη αυτού οδηγεί στην ουσιαστική έλλειψη ελέγχου του αποτελέσματος μιας επιδημιολογικής μελέτης είτε ενός εμβολιακού προγράμματος.

Η αδυναμία Εθνικών Φορέων να επενδύσουν οικονομικά στη συστηματική μελέτη των επιπτώσεων της μόλυνσης από το μικροοργανισμό οδηγεί σε έλλειψη σημαντικών πληροφοριών, ως προς τη διασπορά των κυριότερων οροτύπων κάθε είδους ζώου ξεχωριστά και για συγκεκριμένες περιοχές εντός της ίδιας επικράτειας. Η έλλειψη αυτή, καθώς και η μη διερεύνηση της σημαντικότητας για θέματα οικονομίας και Δημόσιας Υγείας, έχει ως αποτέλεσμα τη μη ικανοποιητική προφύλαξη από το μικροοργανισμό. Για παράδειγμα τα εμπορικά εμβόλια, που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα για την προστασία των σκύλων, δεν καλύπτουν το 60% και πλέον των ζώων αυτών, αφού οι σκύλοι είναι οροθετικοί σε μη εμβολιακούς οροτύπους (Burriel et al., 2003). Το ίδιο αναμένεται και για τα παραγωγικά ζώα, αν οι παραγωγοί οδηγηθούν να χρησιμοποιήσουν προληπτικά τα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια άλλων χωρών, αφού φαίνεται ότι οι ορότυποι, που είναι σημαντικοί στην Ελλάδα, διαφέρουν αυτών των άλλων χωρών (Burriel et al., 2002; Burriel et al. 2003; Bisias et al., 2010).

Τα παραπάνω προβλήματα θα μπορούσαν να ξεπεραστούν, αν υπήρχε ειδικός φορέας αφιερωμένος στη μελέτη του μικροοργανισμού, μέσω του οποίου θα ήταν δυνατή η απομόνωση και διατήρηση σημαντικών οροτύπων, ώστε να είναι δυνατή η χρησιμοποίησή τους στην παρασκευή αποτελεσματικότερων εμβολίων (αυτεμβολίων). Για να δημιουργηθεί όμως, ένας τέτοιος φορέας στην Ελλάδα, πρέπει πρώτα να γίνουν αποδεκτές τόσο η μεγάλη σημασία της λεπτοσπείρωσης στη Δημόσια Υγεία όσο και οι μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις της στα παραγωγικά ζώα. Οι δύο αυτές κατευθύνσεις χρήζουν ευρείας διερεύνησης στην Ελλάδα, κυρίως ως προς την αναγνώριση των σημαντικότερων για τη Δημόσια Υγεία οροτύπων και της προέλευσής τους.

1.6. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η εκδήλωση της μόλυνσης στον άνθρωπο μπορεί να είναι από υποκλινική έως θανατηφόρα κλινική. Οι μηχανισμοί παθογένειας του μικροοργανισμού, που αφορούν στον άνθρωπο και ο τρόπος αλληλεπίδρασής τους είναι σημαντικοί παράγοντες για την κλινική εξέλιξη της μόλυνσης. Σημαντικοί παράγοντες είναι επίσης η ηλικία και η κατάσταση της γενικής υγείας του ατόμου, που έχει μολυνθεί από συγκεκριμένο ορότυπο (Adler and Moctezuma, 2010; Levett and Haake, 2010; Choy et al., 2012). Με τον ίδιο τρόπο αναμένεται να επιδράσει και στα ζώα το σύνολο των παραγόντων αυτών, που είναι, όπως και στον άνθρωπο, στην πλειονότητά τους άγνωστοι, αλλά μπορεί να καθορίζουν τη σοβαρότητα της τελικής εξέλιξης της λεπτοσπείρωσης των ζώων.

Η λεπτοσπείρωση στον άνθρωπο μπορεί να εκδηλωθεί κλινικά αρχικά με κεφαλαλγία, πυρετό, κακοδιαθεσία και μυαλγία. Δηλαδή ευρήματα ήπιας γρίπης, που συνήθως δεν οδηγούν σε κατάλληλη αντιμικροβιακή αγωγή με αποτέλεσμα, σε κάποιες περιπτώσεις, την πλήρη κατάρρευση της λειτουργίας των εσωτερικών οργάνων του ασθενούς, κυρίως των νεφρών του. Σε περίπτωση δε που δεν γίνει έγκαιρη και αποτελεσματική περίθαλψη, η λοίμωξη μπορεί να φτάσει ακόμη και στο θάνατο (Bharti et al., 2003; Levett and Haake, 2010).

Τα αποτελέσματα της μη έγκαιρης και αποτελεσματικής αγωγής στις διάφορες περιοχές, που λόγω κλίματος ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, έχουν δυστυχώς σχέση και με το χαμηλό βιοτικό επίπεδο στις ίδιες περιοχές. Το αποτέλεσμα αυτού είναι η υψηλότερη καταγραφή του νοσήματος σε νοσοκομειακό επίπεδο (ILS-WHO, 2003), αφού τα άτομα αυτά μένουν χωρίς οποιαδήποτε αντιμικροβιακή αγωγή, πριν φτάσουν στο στάδιο αναγκαστικής εισαγωγής σε νοσοκομείο.

Ο άνθρωπος μολύνεται από την άμεση ή έμμεση επαφή του με το ούρο ζώων φορέων, που είναι είτε κατοικίδια είτε άγρια. Επειδή το υγρό περιβάλλον και οι θερμοκρασίες περίπου στους 25⁰C (WHO, 2006) συντηρούν το μικροοργανισμό για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον, η λεπτοσπείρωση ήταν αρχικά γνωστή ως νόσημα των φτωχών αγροτών των τροπικών και υποτροπικών χωρών, κυρίως

αυτών που εργάζονται στους ορυζώνες ή ζουν σε περιοχές και συνοικίες πόλεων μολυσμένες από τα απεκκρίματα των τροκτικών (Natarajaseenivasan et al., 2002; Kawaguchi et al., 2008; Sanders et al., 1999; Reis et al., 2008; Leal-Castellanos et al., 2003).

Τις τελευταίες δεκαετίες, που χαρακτηρίζονται από αύξηση της πληροφόρησης, μετά από συστηματική μελέτη του παθογόνου, άρχισε να διαφαίνεται ότι η λεπτοσπείρωση είναι πολύ συχνή και μεταξύ άλλων κατηγοριών εργαζομένων, όπως οι κτηνοτρόφοι. Οι κτηνοτρόφοι προσβάλλονται είτε από το μολυσμένο περιβάλλον, όπου εργάζονται, είτε από την άμεση επαφή τους με τα μολυσμένα προϊόντα των τοκετών ή των αποβολών των ζώων τους (Natarajaseenivasan et al. 2002, WHO 2002; Talpada et al., 2003; Levett and Haake, 2010).

Σε αυτή τη στερεοτυπική αντίληψη των κατηγοριών των ομάδων υψηλού κινδύνου έρχεται να προστεθεί η ομάδα των φυσιολατρών, κυρίως αυτών που ασχολούνται με τις υδάτινες αθλητικές δραστηριότητες και τους ορειβατικούς περιπάτους (Narita et al., 2005). Σε όλες τις παραπάνω ομάδες, πλειοψηφούν οι άνδρες, λόγω της αυξημένης εμπλοκής τους με τις περισσότερες των ανωτέρω δραστηριοτήτων. Άρα, είναι αυτοί που καταλήγουν συχνότερα στο νοσοκομείο από λεπτοσπείρωση και αυτό φαίνεται στα καταγεγραμμένα διεθνώς περιστατικά (ΟΙΕ, 2008; WHO, 2008; Skufka and Arima, 2012).

Στην Ελλάδα, τα δηλωμένα περιστατικά στο **Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων** (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ), που αφορούν τους άνδρες είναι εξαπλάσια των γυναικών (<http://www.keelpno.gr/el-gr/>, 2014), προφανώς λόγω της επαγγελματικής δραστηριότητάς τους. Τα δηλωμένα στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ζώων (ΟΙΕ) κρούσματα επιβεβαιωμένης κλινικής λεπτοσπείρωσης του ανθρώπου για το 2008, που αφορούν στην Ελλάδα, ανέρχονται σε 13 άτομα ανά 100.000 κατοίκους (ΟΙΕ, 2008). Αυτά είναι περιστατικά διεγνωσμένης λεπτοσπείρωσης, που ήταν σε στάδιο απαραίτητης νοσοκομειακής περίθαλψης. Το ποσοστό αυτό κατατάσσει την λεπτοσπείρωση στη χώρα μας πέμπτη σε σειρά σημαντικότητας μεταξύ των κυριότερων ζωνόσων του ανθρώπου, των οποίων τα ποσοστά επίσης δηλώνονται στον ΟΙΕ, διότι καταλήγουν στην ανάγκη νοσοκομειακής περίθαλψης. Τα ερωτήματα, όμως που παραμένουν είναι εάν, ακόμη και τότε, δηλώνονται όλα τα νοσοκομειακά περιστατικά στις κεντρικές υγειονομικές υπηρεσίες, άρα και τον ΟΙΕ. Επίσης, ποιά

είναι τα πραγματικά ποσοστά μόλυνσης του ανθρώπου, τα οποία προλαμβάνονται μετά από συμπτωματική αγωγή, που φαίνεται τις περισσότερες φορές ως απλή εμπύρετη αδιαθεσία.

Ανεξάρτητα από την αντιπροσωπευτικότητα των δηλωμένων κλινικών κρουσμάτων στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ ή τον ΟΙΕ, μια σύγκρισή τους δείχνει μια σαφή ετήσια αύξησή τους για την δεκαετία 1998-2008, με το συνολικό δηλωμένο αριθμό να ξεπερνά τα 250 άτομα (<http://www.keelpno.gr/el-gr/>). Παρόμοια αύξηση των δηλωμένων κρουσμάτων παρατηρείται παγκοσμίως. Όμως, δεν είναι διευκρινισμένο αν είναι λόγω πραγματικής αύξησης των ποσοστών μόλυνσης ή αποτέλεσμα του αυξημένου επιστημονικού ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω της ανάπτυξης νέων και πιο εύχρηστων μεθόδων ορολογικής διερεύνησης της μόλυνσης στον άνθρωπο (Sanders et al., 1999; Plank and Dean D., 2000; Leal–Castellanos et al., 2003; Natarajaseenivasan et al., 2004; Dounghawee et al., 2008; Pappas et al., 2008). Βέβαια, οι νέες μέθοδοι διερεύνησης της λεπτοσπείρωσης του ανθρώπου δεν αναγνωρίζουν τους εμπλεκόμενους οροτύπους. Άρα, οι ερευνητές δεν αναγνωρίζουν και τη σχέση των οροτύπων, που μολύνουν τον άνθρωπο, με τα διάφορα είδη των ζώων.

Ο άνθρωπος μολύνεται από παθογόνους οροτύπους του μικροοργανισμού, που τους διασπείρουν στο περιβάλλον μολυσμένα ζώα με κλινική ή υποκλινική νόσο. Μεταξύ αυτών είναι τα ζώα συντροφιάς και τα παραγωγικά ζώα. Η δε μόλυνση των τελευταίων, όπως προαναφέρθηκε, έχει σημαντικές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία, αλλά και την οικονομική κατάσταση των κτηνοτρόφων. Η σημαντικότητα των παραγωγικών ζώων στη Δημόσια Υγεία, σε σχέση με τη λεπτοσπείρωση, εξαρτάται από τη σημαντικότητα που της δίνει η κάθε χώρα.

Οι αναπτυγμένες χώρες κυρίως, αλλά και αρκετές αναπτυσσόμενες, έχουν δημιουργήσει ειδικούς κρατικούς φορείς αναγνώρισης και αντιμετώπισης της λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο, κυρίως όταν αναφέρεται η επαγγελματική δραστηριότητα (Biosecurity Australia, 2001; Sabasiva et al., 2003; Whakatutuki, 2007; New Zealand Veterinary Association, 2012; Science.gov, USA 2013;). Η Ελλάδα, όμως, δεν είναι μια από αυτές τις χώρες, άρα η ανεύρεση της λοίμωξης είναι είτε τυχαία, είτε αποτέλεσμα της κλινικής εικόνας, που οδηγεί σε ορολογική διερεύνηση.

Η σημαντικότητα της μόλυνσης προσδιορίζεται από το οικονομικό κόστος, που επιφέρει η μόλυνση σε κάθε μία χώρα. Αυτό είναι αποτέλεσμα της νοσοκομειακής περίθαλψης, των θεραπευτικών αγωγών των ασθενών, των χαμένων εργατοωρών, αλλά και του κόστους, που προκαλείται από τη μείωση της παραγωγικότητας των παραγωγικών ζώων, όπως είναι τα μικρά μηρυκαστικά. Σε αυτές τις χώρες που η οικονομική ζημία από τη λεπτοσπείρωση είναι υπολογισμένη, υπάρχει ταχύτερη και ορθότερη αναγνώριση ακόμη και μη τυπικών κλινικών κρουσμάτων στον άνθρωπο και τα ζώα.

1.7. Η ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

Από τη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται, ότι τα ποσοστά μόλυνσης των ζώων στις διάφορες χώρες, όπως προαναφέρθηκε, κυμαίνονται ευρέως (Ciceroni et al., 2000; Espi 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; d' Faria et al., 2007; Salina- Melendez et al., 2007; Kawaguchi et al., 2008). Με δεδομένη αυτή την τεράστια διακύμανση του συνολικού επιπέδου μόλυνσης, που εξαρτάται άμεσα από τη γεωγραφική θέση μιας χώρας, την περιοχή και το είδος του ζώου, που διερευνάται, δύσκολα μπορεί να αποφανθεί κάποιος για τους οροτύπους, που έχουν τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα για τα διάφορα είδη των παραγωγικών ζώων. Η οικονομική σημασία της λεπτοσπείρωσης των παραγωγικών ζώων εξαρτάται από την μορφή της κλινικής εκδήλωσης και το ποσοστό νοσηρότητας στα διάφορα είδη παραγωγικών ζώων.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, που είναι οικονομικά σημαντικότερες για τους εκτροφείς παραγωγικών ζώων, είναι αυτές που σχετίζονται με το αναπαραγωγικό τους σύστημα και είναι κυρίως οι αποβολές και τα επακόλουθα αυτών, καθώς και η γέννηση θνησιγενών νεογνών (Ellis, 1994; Guitian et al., 2001; Levett 2004; Bomfim M.R.Q and Koury M.C.2006; Salinas-Malendez et al., 2007; Tooloei et al., 2008; Saglam 2008; Lantier et al., 2013). Για να εκτιμηθεί όμως με ακρίβεια η οικονομική σημασία της λεπτοσπείρωσης σε αυτά τα ζώα, πρέπει να συνεκτιμηθεί και η συμβολή

άλλων μολυσματικών παραγόντων με την ίδια προτίμηση εντόπισης (αναπαραγωγικό σύστημα) και το ίδιο τελικό αποτέλεσμα.

Άρα, δεν είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της οικονομικής σημασίας της μόλυνσης από το γένος *Leptospira* χωρίς τον αποκλεισμό άλλων παθογόνων. Για αυτό πολλές χώρες αδιαφορούν για τη συστηματική μελέτη του παθογόνου, κυρίως όταν δεν υπάρχει δυνατότητα αποκλεισμού της συμμετοχής άλλων παθογόνων στα προβλήματα του αναπαραγωγικού συστήματος.

Μεταξύ των παραγωγικών ζώων πολλαπλάσια οικονομική σημασία έχει η λεπτοσπείρωση των μηρυκαστικών (μεγάλων και μικρών). Τα προβλήματα αγωνιμότητας και αποβολών των μηρυκαστικών, κυρίως αυτά τα οποία μπορούν να πάρουν μορφή μαζικότητας (θύελλα αποβολών), έχουν διττές οικονομικές επιπτώσεις, αφού τελικά καταλήγουν σε έλλειψη τόσο παραγωγής κρέατος, όσο και γάλακτος. Στην περίπτωση της λεπτοσπείρωσης, αν η μόλυνση των μηρυκαστικών δεν εκδηλωθεί με αποβολή, μπορεί να εκδηλωθεί με αγαλαξία ή με μείωση της βιωσιμότητας των νεογέννητων (Guitian et al., 2001; WHO 2002; Tooloei et al., 2008).

Από την 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 από μολύνσεις, που επηρεάζουν τη λειτουργία του γεννητικού συστήματος, μια εκ των οποίων είναι και η λεπτοσπείρωση. Αυτά τα είδη παραγωγικών ζώων είναι επίσης από τα περισσότερο ευπαθή στη μόλυνση με τη λεπτόσπειρα.

Τα πρόβατα θεωρούνται περισσότερο ανθεκτικά, ακόμα και από τις αίγες (OIE, 2008; Lilenbaum et al., 2009). Ωστόσο ούτε αυτά είναι απαλλαγμένα του κινδύνου της οικονομικής ζημιάς, κυρίως αν βοσκήσουν σε περιοχές υψηλού κινδύνου (da Silva et al., 2012; Martins and Lilenbaum, 2014).

Στην Ελλάδα οι οικονομικές επιπτώσεις από τη λεπτοσπείρωση των παραγωγικών ζώων είναι παντελώς άγνωστες, αφού η μόλυνση δεν απασχολεί τις κτηνιατρικές υπηρεσίες. Ακόμη και το ερευνητικό ενδιαφέρον των κτηνιάτρων είναι σχεδόν ανύπαρκτο.

Η λεπτοσπείρωση των ζώων 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 οροτύπους, που αφορούσαν τη μόλυνση

χοίρων (Sarris et al., 1987). Το 2002 οι Burriel et al., διαπίστωσαν μεταξύ μικρών μηρυκαστικών, ότι από τα 129 πρόβατα, που απέβαλλαν, τα 31 (24,1%) ήταν θετικά σε ένα ή περισσότερους οροτύπους της *Leptospira* spp, ενώ από τις 109 αίγες που απέβαλλαν, θετικές ήταν οι 25 (23%) . Οι ορότυποι που εμφανίζονταν συχνότερα ήταν οι Bratislava, Australis, Autumnalis και Copenhageni. Το 2003, η ορολογική διερεύνηση στην Ελλάδα επεκτάθηκε σε περισσότερα είδη ζώων (Burriel et al., 2003) και αφορούσε φαινομενικά υγιή βοοειδή (277), πρόβατα (282), αίγες (198), χοίρους (516) και σκύλους (254). Τα ποσοστά αυτών των οροθετικών ζώων σε ένα ή περισσότερους οροτύπους ήταν αντίστοιχα 2,6%, 5,7%, 16,2%, 17,8% και 11,4%, ενώ συχνότεροι ορότυποι στα βοοειδή, τα πρόβατα και τους χοίρους ήταν οι Bratislava και Australis, στις αίγες οι Bratislava και Copenhageni και στους σκύλους η Copenhageni. Από τη διερευνημένη οροθετικότητα μεταξύ περιστατικών αποβολών σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και φαινομενικά υγιών ζώων διαφαίνεται ότι το γένος *Leptospira* μολύνει σε υψηλά ποσοστά τα παραγωγικά ζώα της χώρας.

Αρα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η λεπτοσπείρωση, κυρίως των μικρών μηρυκαστικών, είναι μια μόλυνση που φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στην παραγωγικότητά τους. Η συμβολή των μικρών μηρυκαστικών στη ζωική παραγωγή στην Ελλάδα είναι σημαντικότερη αυτής των βοοειδών και για το λόγο αυτό η λοίμωξη πρέπει να απασχολήσει τις κτηνιατρικές υπηρεσίες της χώρας.

Η λεπτοσπείρωση των παραγωγικών ζώων φαίνεται να είναι μεν σημαντική, ως προς τις οικονομικές της επιπτώσεις, δεν είναι όμως συστηματικά διερευνημένη, ώστε να αποτιμηθεί η σημασία της για τη Δημόσια Υγεία στη χώρα μας. Προφανώς ο κυριότερος λόγος που δεν διερευνάται, όπως συμβαίνει και σε άλλες χώρες, είναι οι σημαντικές δυσκολίες κατά τη μελέτη του μικροοργανισμού. Κυριότερη των δυσκολιών αυτών είναι η απομόνωση του μικροοργανισμού, που αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την σύνδεση των κλινικοπαθολογοανατομικών ευρημάτων παθογένειας με τον πιθανολογούμενο νοσογόνο παράγοντα. Αυτή η συσχέτιση είναι αναγκαία στον καθορισμό της παθογένειας ενός εμπλεκόμενου οροτύπου.

1.8. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ - ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η διασπορά των παθογόνων οροτύπων του γένους *Leptospira* στη φύση οφείλεται κυρίως στην απέκκριση του μικροοργανισμού με τα ούρα, αφού οι παθογόνοι ορότυποι προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού (Ballard et al., 1986). Εκεί παραμένουν, πολλαπλασιάζονται και υπό ορισμένες συνθήκες είτε προκαλούν ιστικές αλλοιώσεις, που επηρεάζουν τη γενική κατάσταση υγείας του ξενιστή και διασπορά τους σε άλλους ιστούς, είτε παραμένουν αφανείς και απλώς απεκκρίνονται με τα ούρα του.

Επομένως, οι ιστικές αλλοιώσεις στο νεφρικό ιστό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενδείξεις της παθογενετικότητας ενός οροτύπου. Επειδή όμως αυτές οι αλλοιώσεις δεν είναι παθογνωμονικές, άρα μπορούν να είναι αποτέλεσμα και άλλων παραγόντων, απαραίτητη είναι η πειραματική μελέτη των συχνότερα απαντώμενων οροτύπων ανά είδος ζώου.

Από λίγες πειραματικές μελέτες, που υπάρχουν, έχει βρεθεί ότι ούτε τα προϋπάρχοντα ομόλογα αντισώματα δεν εμποδίζουν την σύνδεση ενός ομόλογου οροτύπου στο νεφρικό ιστό. Δηλαδή, ο νεφρικός ιστός δύναται να φιλοξενήσει συγχρόνως διαφορετικούς οροτύπους του μικροοργανισμού, συμπεριλαμβανομένου και του ορολογικά ομόλογου οροτύπου (Suwimonteerabutr et al., 2005; Ruiz et al., 2005; Bomfim and Koury, 2006; Levett and Haake, 2010; Segawa et al., 2014). Επομένως, κατά τη φυσική μόλυνση είναι δυνατόν ένα ζώο να απεκκρίνει περισσότερους του ενός οροτύπους ή οι ιστικές αλλοιώσεις να είναι αποτέλεσμα συνέργειάς τους.

Η παραμονή του μικροοργανισμού στο νεφρό προκαλεί, κάτω από άγνωστες συνθήκες, μικροσκοπικές αλλοιώσεις διάμεσης νεφρίτιδας (interstitial nephritis), χωρίς αυτές οι αλλοιώσεις να καταλήγουν αναγκαστικά σε μακροσκοπικά ευρήματα στα περισσότερα είδη ζώων ή μολυσμένων ατόμων μέσα στο ίδιο είδος (Baker et al 1989; Hamir et al 2001; Delbem et al 2002; de Faria et al. 2007; Dorjee et al., 2009; Monahan et al., 2009; Azizi et al., 2012). Άρα, εάν οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις είναι κυρίως μικροσκοπικές δεν μπορούν να εκτιμηθούν κατά τη σφαγή ή τη νεκροτομική διερεύνηση φυσικά μολυσμένων ζώων. Επειδή δε οι μικροσκοπικές

αλλοιώσεις από τη μόλυνση μελετώνται μόνο ιστολογικά, είναι κυρίως προϊόν ερευνητικού ενδιαφέροντος. Έτσι, αν προϋπόθεση μιας μελέτης είναι η σύνδεση μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων (Dorjee et al., 2009; Azizi et al., 2012), ανεξάρτητα του πιθανού αιτίου, που τις προκαλεί, τότε παρατηρείται υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο (μακροσκοπικές – μικροσκοπικές). Όμως, όταν γίνει προσπάθεια συσχετισμού των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων με οροτύπους του γένους *Leptospira*, τότε τα ευρήματα δίστανται. Άλλοι βρίσκουν θετική σχέση (Dorjee et al., 2009) και άλλοι είτε δεν χρησιμοποιούν στατιστική ανάλυση ή βρίσκουν ελάχιστη σχέση (Martinez et al., 2004; Azizi et al., 2012).

Επειδή δε είναι δύσκολη η απομόνωση του μικροοργανισμού, η συσχέτιση βασίζεται κυρίως στην ορολογική διερεύνηση, η οποία επηρεάζεται αρνητικά και από άλλους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η συσχέτιση με τα αποτελέσματα από την ορολογική μέθοδο MAT επηρεάζεται από τους οροτύπους, που έχουν επιλεχτεί για την εκτέλεση της μεθόδου. Αν δηλαδή δεν συμπεριελήφθησαν στο σύνολο των διερευνούμενων οροτύπων κάποιοι ορότυποι, που ίσως μολύνουν το ζώο, αυτοί δεν θα ανιχνευτούν (ΟΙΕ, 2014). Αν είναι αυτοί που έχουν μολύνει το προς διερεύνηση ζώο η συσχέτιση θα επηρεαστεί αρνητικά, αφού δεν εντοπίστηκαν ορολογικά. Επίσης σε κάποια ζώα κάποιοι ορότυποι ίσως δεν προκαλούν την παραγωγή θετικών τίτλων αντισωμάτων, όπως συμβαίνει με τους φυσικούς ξενιστές του παθογόνου (Cesar et al., 2012; Agudelo – Florez et al., 2013; d’Andon et al., 2014). Άρα, σε τέτοιες περιπτώσεις δεν είναι δυνατόν να συσχετιστούν οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις με το παθογόνο, αν δε έχει γίνει απομόνωσή του ή μοριακή αναγνώρισή του σε ύποπτο ιστό.

Βέβαια πρέπει να τονισθεί ξανά ότι οι αλλοιώσεις αυτές ανεξάρτητα από το αν είναι μακροσκοπικές ή κυρίως μικροσκοπικές, δεν είναι παθογνωμονικές της λεπτοσπείρωσης, αφού είναι δυνατόν να προκληθούν και από άλλα αίτια λοιμογόνου και μη (Visith and Kearnkiat, 2005; Martinez et al., 2006; Soderland et al., 2010).

Γενικώς, οι πειραματικές διερευνήσεις έχουν δείξει ότι οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις, που θεωρούνται σχετικές με τη μόλυνση, είναι διαφόρου βαθμού σοβαρότητας. Αυτές είναι από απλές φλεγμονώδεις, που χαρακτηρίζονται από λεμφοκυτταρική διήθηση και διήθηση από πλασματοκύτταρα και μακροφάγα, έως πολύ σοβαρές, που χαρακτηρίζονται από ατροφία των ουροφόρων σωληναρίων ή ακόμη και πλήρη καταστροφή των νεφρικών σπειραμάτων και των ουροφόρων

σωληναρίων (Hamir et al., 2001; de Faria et al., 2007). Όμως, η παρουσία του μικροοργανισμού σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις, ακόμη και στις πειραματικές, δεν επιβεβαιώνεται πάντα με την απομόνωση ή με την παρατήρηση του παθογόνου με χρήση τεχνικών χρώσης λεπτοσπειρών σε ιστούς (Martinez et al., 2006; Mineiro et al., 2011; Azizi et al., 2012; Agudelo – Florez et al., 2013).

Σε άλλες περιπτώσεις, η πειραματική μόλυνση με ιδιαίτερα παθογόνους οροτύπους κατέληξε μόνο σε διάμεση νεφρίτιδα (de Faria et al., 2007), που σημαίνει ότι τα ιστολογικά ευρήματα δεν μπορούν να αποδοθούν με απόλυτη βεβαιότητα μόνο στο παθογόνο ή την παθογενετικότητά του, ακόμη και στην περίπτωση που με τις τεχνικές χρώσης λεπτοσπειρών παρατηρηθούν οι μικροοργανισμοί. Πολλοί άλλοι μικροοργανισμοί (βακτήρια και ιοί) και τοξικές ουσίες προκαλούν παρόμοιες μόνιμες ή πρόσκαιρες αλλοιώσεις (Visith and Kearnat, 2005; Martinez et al., 2006; Herath et al., 2014).

Ένα άλλο πρόβλημα κατά τη μελέτη των αλλοιώσεων από τη φυσική μόλυνση είναι ο χρόνος, που έχει παρέλθει από την εγκατάσταση του παθογόνου στους ευπαθείς ιστούς του ζώου. Σε πειραματικά μολυσμένους αρουραίους η αποίκηση του νεφρικού ιστού φαίνεται ότι γίνεται μετά την έβδομη ημέρα του ενοφθαλμισμού τους. Οι πρώτες δε μικροσκοπικές αλλοιώσεις παρατηρούνται 3-4 εβδομάδες αργότερα (de Faria et al., 2007; Cesar et al., 2012). Πιθανολογείται ότι κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με τα παραγωγικά ζώα (Baker et al., 2007; Mineiro et al., 2011; Azizi et al., 2012). Μάλιστα σε αντίθεση με μελέτες στα τρωκτικά, που η σύνδεση των αλλοιώσεων με την παρουσία του μικροοργανισμού δεν δείχνει απαραίτητα συσχετισμό (de Faria et al., 2007; Cesar et al., 2012), παρατηρήθηκε το αντίθετο σε κάποιες περιπτώσεις στα παραγωγικά ζώα (Dorjee et al., 2009; Mineiro et al., 2011), τα οποία εμφάνισαν διάμεση νεφρίτιδα και ατροφία νεφρικών σωληναρίων, μετά από φυσική μόλυνση με οροτύπους του γένους *Leptospira*. Προφανώς, οι βλάβες, που προκαλούνται στο νεφρικό και άλλους ιστούς, συνδέονται με την παθογένεια του οροτύπου για συγκεκριμένο είδος ζώου.

Είναι γνωστό ότι τα τρωκτικά είναι σημαντικοί αφανείς ξενιστές, άρα μπορούν να χρησιμοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς κατά των τοξικών παθογενετικών μηχανισμών συγκεκριμένων οροτύπων (Yang et al., 2001; Barocchi et al., 2002; Barbosa et al., 2009; Cesar et al., 2012). Δυστυχώς, όμως, η μεγάλη δυσκολία

απομόνωσης και ανακαλλιέργειας του μικροοργανισμού μειώνει πολύ τη δυνατότητα πειραματικής μελέτης πολλών σημαντικών οροτύπων για τον άνθρωπο και τα ζώα (Palaniappan et al., 2007). Έτσι είναι ιδιαίτερα δύσκολο να μελετηθούν οι μηχανισμοί παθογένειας του παθογόνου με κλασικές μεθόδους και ο ρόλος στους στην πρόκληση ιστικών αλλοιώσεων. Η μεγάλη ελπίδα του μέλλοντος είναι οι συνεχώς εξελισσόμενες μοριακές μέθοδοι, που ίσως βοηθήσουν τελικά και στην καλύτερη κατανόηση του τρόπου πρόκλησης ιστικών αλλοιώσεων (Yang et al., 2001; Cesar et al., 20012; Segawa et al., 2014).

Οι πειραματικές μελέτες δείχνουν, ότι οι παθογόνοι ορότυποι μάλλον αποφεύγουν τους μηχανισμούς καταστροφής, που διαθέτει ο ξενιστής τους (Barbosa et al., 2009; Barocchi et al., 2002). Έτσι, μπορούν να πολλαπλασιάζονται, να διασπείρονται και να καταστρέφουν τον προσβεβλημένο ιστό, πιθανώς με κάποιους τοξικούς παράγοντες, που δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί ή πλήρως διευκρινιστεί (Yang et al 2001; Cesar et al., 2012). Κάποιοι τέτοιοι παράγοντες πιθανολογούνται από έμμεσα ευρήματα, που δηλώνουν την παρουσία τέτοιων μηχανισμών παθογένειας (Ballard et al., 1986; Barocchi et al., 2002; Palaniappan et al., 2007; Wang et al. 2007; Cullen et al., 2005; Subramaniam and Sekaran, 2006; d'Andon et al., 2014; Segawa et al., 2014).

Μεταξύ αυτών των άγνωστων «τοξικών» παραγόντων φαίνεται ότι είναι τοξίνες, οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν νεκρωτικές εστίες των εσωτερικών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων και των νεφρών, όπως είναι η ενδοτοξίνη LPS (λιποπολυσακχαρίτης) του τοιχώματος του παθογόνου (Cesar et al., 2012). Οι νεκρωτικές εστίες είναι αποτέλεσμα της ισχαιμίας, που προκαλείται από μικροσκοπικές βλάβες στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων (Adler and Moctezuma, 2010). Η παρατηρούμενη κοκκιωμάτωση (Cesar et al., 2012) και άλλες ιστικές αλλοιώσεις μπορούν να αναστραφούν, στην περίπτωση που καταστραφεί ο μικροοργανισμός ανοσολογικά (Herath et al., 2014). Όμως, η καταστροφή του παθογόνου και η παρουσία τμημάτων αυτού στο νεφρικό ιστό πειραματικά μολυσμένων ινδικών χοιριδίων, φαίνεται να είναι το αίτιο μονίμων βλαβών στο όργανο αυτό (De Bristo et al., 1992; Cesar et al., 2012), ακόμη και αν καταστραφεί το παθογόνο.

Η ραγδαία εξέλιξη των μοριακών μεθόδων τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με την πειραματική μόλυνση διαφόρων ειδών πειραματοζώων, βοηθά στον εμπλουτισμό της γνώσης γύρω από την πιθανή δομή παραγόντων παθογένειας (Hauk et al., 2008; Murray et al., 2009). Όμως, η συστηματική μελέτη αυτών δυσκολεύεται από την αδυναμία των περισσότερων ερευνητών να χρησιμοποιήσουν τεχνολογία και σημαντικά πολυέξοδες εργαστηριακές διαδικασίες, που θα βοηθήσουν στην εξέλιξη της γνώσης για τους παθογόνους οροτύπους των περιοχών τους, λόγω αδυναμιών ή παντελούς έλλειψης τεχνοοικονομικής υποστήριξης από τις κυβερνήσεις τους.

1.9. ΤΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η μόλυνση των ζώων και του ανθρώπου από παθογόνους οροτύπους 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 του γενετικού υλικού του παθογόνου με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction/PCR) (WHO, 2006; Levett, 2004; Hartskeerl et al., 2011; OIE, 2014).

Οι **έμμεσες** μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης βασίζονται στην ανίχνευση των αντισωμάτων, που δημιουργούνται στον ορό αίματος από τη μόλυνση με το μικροοργανισμό. Οι περισσότερες από αυτές, οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως στον άνθρωπο, είναι μέθοδοι που δεν κάνουν διάκριση των αντισωμάτων ως προς τον μολύνοντα ορότυπο. Παραδείγματα είναι οι διάφορες εμπορικές μέθοδοι ELISA, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFAT) (Saglam et al. 2008) και η εστιακή συγκόλληση (spot agglutination test) (Lilenbaum et al., 2002; WHO, 2002; Doungchawee et al., 2008). Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο μία μέθοδος που διαφοροποιεί τα αντισώματα για κάθε ορότυπο. Αυτή είναι γνωστή ως η μέθοδος MAT, που είναι δοκιμή μικροσκοπικής συγκόλλησης (Microscopic Agglutination Test) (Levett, 2004; WHO,

2006; Levett, 2004; Hartskeerl et al., 2011; OIE, 2014). Η μέθοδος MAT είναι η μόνη διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδος αναφοράς για την επιδημιολογική μελέτη του παθογόνου, άρα και η καταλληλότερη για τη μελέτη της λεπτοσπείρωσης των ζώων.

Για τη μελέτη, όμως των χαρακτηριστικών της δομής του μικροοργανισμού, που καθορίζουν την παθογενετικότητα (τους μηχανισμούς παθογενετικότητας), τη γενετική δομή του παθογόνου, που το διαφοροποιεί σε οροτύπους και των προϊόντων, που παράγει, είναι απαραίτητη η απομόνωση του παθογόνου από τους ιστούς προτίμησής του. Μετά την απομόνωση απαιτείται 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) για την επιτυχή απομόνωση από σωστά επιλεγμένα δείγματα, των οποίων η επιλογή και η συλλογή γίνεται σε συνάφεια με την κλινική εικόνα. Όμως, ακόμη και στην τελευταία περίπτωση η αποτυχία απομόνωσης είναι συχνότερη της επιτυχίας (Cesar et al., 2012; Agudelo – Florez et al., 2013).

Ως προς την καταλληλότητα των δειγμάτων για απομόνωση, εάν το ζώο είναι ζωντανό, τα καταλληλότερα δείγματα είναι σωματικά υγρά, όπως αίμα, ούρο και γάλα (Freitas et al. 2004). Αν το ζώο είναι νεκρό, τα καταλληλότερα δείγματα είναι μη αυτολυμένοι ιστοί με ύποπτες αλλοιώσεις, από εσωτερικά όργανα όπως νεφρός, ήπαρ, πνεύμονας, εγκέφαλος (Sitprija et al., 1980; Baker et al., 1989; Hamir et al., 2001; Herath et al., 2014). Στην περίπτωση αποβολής, τα καταλληλότερα δείγματα είναι τα μη αυτολυμένα προϊόντα της αποβολής και κυρίως το έμβρυο. Η ενδομητρική μόλυνση του εμβρύου οδηγεί σε αποβολή και η απομόνωση του μικροοργανισμού από τα εσωτερικά όργανα του εμβρύου συνεπάγεται τη μόλυνση της μητέρας, βοηθώντας στην αιτιολογική διάγνωση της αποβολής (Vemulapalli et al. 2005, Saglam et al. 2008).

Η απομόνωση του μικροοργανισμού από επιλεγμένους ιστούς γίνεται εφικτή με τη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων, των οποίων η σωστή παρασκευή και σύνθεση τα καθιστά ιδιαίτερα ακριβά (Ellis, 1986; Hookey, 1992). Τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα επωάζονται στους $29 \pm 1^{\circ} \text{C}$ για τουλάχιστον 16 εβδομάδες και σε περιπτώσεις όπου δεν παρατηρείται ανάπτυξη του μικροοργανισμού η επώαση παρατείνεται μέχρι και 26 εβδομάδες. Ο χρόνος επώασης εξαρτάται από τον ορότυπο,

αλλά και από τον αρχικό αριθμό των μικροοργανισμών στο δείγμα. Οι λιγότερο επιλεκτικοί ορότυποι, όπως οι *Pomona* και *Grippytyphosa*, απαιτούν χρόνο επώασης των καλλιιεργειών γύρω στις 10 ημέρες (Ellis, 1986; Letocart et al., 1997). Η αναγκαία μακροχρόνια επώαση των ενοφθαλμισμένων υποστρώματων ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών από επιμολύνσεις ή την ανάπτυξη μυκήτων λόγω της ευνοϊκής θερμοκρασίας επώασης αυτών.

Επομένως είναι απαραίτητη η αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών επιμόλυνσης, η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη στα θρεπτικά υποστρώματα διάφορων αντιμικροβιακών ουσιών, οι οποίες, όμως, μπορούν να αναστείλουν και την ανάπτυξη κάποιων οροτύπων του γένους *Leptospira* (Adler et al. 1986, Ellis 1986).

Όλοι οι ερευνητές, που συστηματικά ασχολούνται με την μελέτη του γένους *Leptospira*, αναγνωρίζουν την απομόνωση του μικροοργανισμού, όταν είναι εφικτή, ως πλήρως επιβεβαιωτική της υποψίας της μόλυνσης, (ILS – WHO, 2002; Kruse et al., 2004; Mahajan and Chhabra, 2008; ; Levett and Haake, 2010; Abdollahpour, 2013; Shivakumar, 2013). Όμως, η επιτυχία απομόνωσης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως αναφέρθηκε και μεταξύ των οποίων είναι επίσης η εργαστηριακή διάθρωση και η επιστημονική κατάρτιση των εργαζομένων, η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών στο δείγμα, η ταχύτητα επεξεργασίας των δειγμάτων, οι συνθήκες επώασης, ο μολύνων ορότυπος, ο προς διερεύνηση ιστός κλπ (Freitas et al., 2004; Cermakova et al., 2005). Αποτέλεσμα των δυσκολιών αυτών είναι να μην επιχειρείται η απομόνωσή του, από τους περισσότερους ερευνητές, που δείχνουν ενδιαφέρον για τη μελέτη του.

Η απομόνωση βασίζεται σε εμπορικά θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία, αν και είναι σταθερής σύνθεσης, δεν εγγυώνται την αποτελεσματικότητα, αφού απαραίτητη είναι η χρήση πρόσθετων παραγόντων υποβοήθησης της ανάπτυξης, όπως πέντε τουλάχιστον αντιβιοτικών και πλάσματος κουνελιού ή βοοειδών (Freitas et al., 2004; Adler and Moctezuma, 2010; Levett and Haake, 2010; Hartskeerl et al., 2011). Ακόμη και η ανασύσταση μέρους των υποστρώματων ή των αντιβιοτικών, δηλαδή η ποιότητα του χρησιμοποιούμενου νερού, θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (προσωπική επαφή με το Εργαστήριο Αναφοράς της Λεπτοσπείρωσης της Μ. Βρετανίας), αν και γίνεται με δις αποσταγμένο νερό.

Άλλες φορές η γενετική δομή ενός οροτύπου και οι διαφορές στα στελέχη αυτού μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη σε ένα προκαθορισμένο περιβάλλον καλλιέργειας του γένους *Leptospira* (Bolin et al., 1991;).

Επομένως οι παράγοντες, που επιδρούν αρνητικά στην απομόνωση του παθογόνου, είναι πολλοί και δείχνουν μαζί με τα προβλήματα άλλων μεθόδων διερεύνησης της μόλυνσης, ότι η συστηματική εργαστηριακή και κλινική του μελέτη δεν είναι καθόλου εύκολη υπόθεση. Απαιτεί χρόνο, χρήμα, εξοπλισμό και κυρίως αφιερωμένο στο μικροοργανισμό 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, όπως η MAT ή για παραγωγή αποτελεσματικών εμβολίων, ακόμη και αυτεμβολίων και κυρίως για την ουσιαστική, πειραματική του μελέτη σε επίπεδο παθογενετικότητας.

Αρα, η απομόνωση αποτελεί μια αναντικατάστατη μέθοδο εργαστηριακής μελέτης του μικροοργανισμού, η οποία όμως δεν είναι πάντα εφικτή. Έτσι, τις περισσότερες φορές, στη θέση της απομόνωσης επιχειρείται για την επιβεβαίωση της μόλυνσης, ένας συνδυασμός ορολογικών μεθόδων ή/και απευθείας παρατήρηση του παθογόνου σε ιστούς. Αν ο συνδυασμός αυτός είναι σωστά επιλεγμένος θα μπορούσε να ήταν επιτυχής και η συσχέτιση του παθογόνου με συγκεκριμένες ιστοικές αλλοιώσεις (Azizi et al., 2012; Herath et al., 2014). Όμως ο συνδυασμός αυτός δεν είναι πάντα επιτυχής για λόγους , όπως η μη χρησιμοποίηση ικανοποιητικού αριθμού οροτύπων για ορολογική διερεύνηση, η ανίχνευση αναμνηστικών τίτλων αντισωμάτων, η έλλειψη ευαισθησίας της επιλεγμένης μεθόδου για το είδος ζώου ή η χρονική στιγμή διερεύνησης (Vijayachari et al., 2008; Faber et al., 2000). Ο μικροοργανισμός μπορεί να έχει εξαφανιστεί από τους ιστούς προτίμησής του, όπως φαίνεται από πειραματικά δεδομένα, κατά τη στιγμή της διερεύνησής του (Soto et al., 2006).

Για να αυξηθεί η ευαισθησία και ειδικότητα κατά τη διάγνωση έχουν γίνει προσπάθειες άμεσης διερεύνησης του μικροοργανισμού με μεθόδους, που ανιχνεύουν αντιγόνα του μικροοργανισμού στους ιστούς. Παραδείγματα είναι οι μέθοδοι του ανοσοφθορισμού (Ellis, 1986; Faine et al. 1999) και της ανοσοϊστοχημείας (Saglam et

al., 2008; Cox et al., 2005; Mineiro et al., 2011; Agudelo – Florez et al., 2013). Η ευαισθησία, όμως, αυτών των μεθόδων επηρεάζεται πέρα από την τεχνική και τον αριθμό των μικροοργανισμών στο δείγμα, κυρίως από την διάθεση και σωστή επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων. Αυτές απαιτούν αντιδραστήρια, όπως ειδικά αντισώματα, η παρασκευή και διάθεση των οποίων δεν είναι εμπορική ή αφορά οροτύπους σημαντικούς κατά την κρίση των ερευνητών, που τις διερευνούν εργαστηριακά. Επειδή περιορίζονται ως προς τους προς διερεύνηση οροτύπους, μπορεί αυτοί οι ορότυποι να μην έχουν παρουσία στην περιοχή διερεύνησης της λοίμωξης.

Δηλαδή, αυτές οι μέθοδοι αναγνωρίζουν συγκεκριμένο ορότυπο ή συγγενείς του, από τους οποίους προήλθαν τα χρησιμοποιούμενα αντισώματα. Ένα πρόσθετο πρόβλημα των μεθόδων αυτών είναι η αδυναμία μελέτης της διασποράς των παθογόνων οροτύπων στα διάφορα είδη ζώων, αφού αυτές δεν αναγνωρίζουν περισσότερους από ένα ορότυπο κατά περίπτωση. Αυτή η αδυναμία αποτρέπει τη χρήση των μεθόδων αυτών στις επιδημιολογικές μελέτες για λήψη των αποτελεσματικότερων μέτρων προφύλαξης.

Είναι προφανές, ότι 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 λεπτοσπείρωση. Στις χώρες αυτές έχει αναπτυχθεί την τελευταία δεκαετία μια έντονη δραστηριότητα στην εξέλιξη της PCR, με την ελπίδα να γίνει η μέθοδος αξιόπιστα διαγνωστική. Οι διάφορες παραλλαγές της μεθόδου αφορούν είτε την απλή αναγνώριση του γένους *Leptospira* είτε την αναγνώριση των παθογόνων ειδών του. Όμως γίνονται προσπάθειες να αναπτυχθούν τεχνικές PCR, που θα αναγνωρίζουν τους οροτύπους, ώστε να συνδυαστεί η ευαισθησία με την ειδικότητα (Turk et al. 2003, Morey et al. 2006, Langoni et al. 2008, Slack et al. 2009).

Η PCR δείχνει υψηλή συσχέτιση με την απομόνωση σε περιπτώσεις όπου υπάρχει ενεργή μόλυνση ιστού, όπως στην περίπτωση της επιμένουσας ραγοειδίτιδας του αλόγου, στα υλικά αποβολής ή στην οξεία λεπτοσπείρωση (Faber et al., 2000; Leon et al., 2006; De Daher et al 2010).

Ακόμη δυσκολότερη είναι η επιβεβαίωση της διάγνωσης της λεπτοσπείρωσης στα ζώα και στον άνθρωπο στις άτυπες κλινικές μορφές της, αφού δεν είναι άμεση η

υποψία εμπλοκής του παθογόνου (Segales et al., 2006; Herath et al., 2014). Όταν ο κλινικός υποψιαστεί την πιθανότητα εμπλοκής του γένους *Leptospira* υπάρχουν, όπως προαναφέρθηκε, διάφοροι τρόποι άμεσης ή έμμεσης διερεύνησης της παρουσίας του παθογόνου. Οι μέθοδοι αυτές έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, που ίσως επηρεάζονται ακόμη περισσότερο από την άτυπη μορφή της λοίμωξης (ILS – WHO, 2002; Adler and Moctezuma, 2010; Abdollahpour, 2013; Shivakumar, 2013).

Στα παραγωγικά ζώα, όπου η παρουσία του παθογόνου μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή, λόγω μείωσης της παραγωγικότητας των ζώων από την πρόκληση αποβολών, εμφάνιση άτυπης κλινικής ή μη μαστίτιδας, ανάπτυξη θανατηφόρου νόσου, η προληπτική μελέτη της ύπαρξης ή μη παθογόνων οροτύπων σε μια εκτροφή και τα πιθανά ποσοστά μόλυνσης είναι σημαντικά για την λήψη μέτρων ελαχιστοποίησης των επιπτώσεων της μόλυνσης (Kirkbride and Johnson, 1989; Alt et al., 2001; Grooms, 2006; Anderson, 2007; Lilenbaum et al. 2008).

Βέβαια, αν στα μέτρα πρόληψης υπάρχει δυνατότητα παρασκευής αυτεμβολίων ή εμβολίων για εθνική χρήση, είναι απαραίτητη η απομόνωση του παθογόνου, που όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Η απομόνωση σημαντικών οροτύπων είναι όχι μόνο επιβεβαιωτική των ευρημάτων της οροδιερεύνησης, αλλά και ιδιαίτερα σημαντική σε περιπτώσεις όπου υπάρχει αναμνηστική ύπαρξη αντισωμάτων ή όταν οροδιερευνητικά παρατηρείται οροθετικότητα του ιδίου ζώου σε περισσότερους του ενός οροτύπους.

Λόγω των δυσκολιών απομόνωσης, ευρέως διαδεδομένη είναι η έμμεση διερεύνηση της μόλυνσης με ανίχνευση αντισωμάτων με διάφορους μεθόδους, οι οποίες όμως δεν είναι όλες εφαρμόσιμες για όλα τα είδη ζώων. Επιπλέον, υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι προδιερεύνησης και όλες έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Κάποιες χρειάζονται ειδικά αντιδραστήρια, που δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, όπως η μέθοδος του ανοσοφθορισμού (Kingscote, 1985; Sambasiva et al., 2003; Saglam et al., 2008), ενώ άλλες δεν δίνουν πληροφορίες για τους εμπλεκόμενους οροτύπους (Sakhae et al., 2007; Ngbede et al., 2013), αφού έχουν παρασκευαστεί για να ανιχνεύουν μόνο οροτύπους, τους οποίους ο παρασκευαστής της μεθόδου θεωρεί σημαντικότερους.

Η μη αναγνώριση από ευκολόχρηστες και ασφαλείς μεθόδους, όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού οροτύπων, είναι η μεγάλη αδυναμία πρακτικής χρήσης αυτών

των μεθόδων στην επιδημιολογική μελέτη της μόλυνσης στα διάφορα είδη των ζώων. Στα παραγωγικά ζώα κυρίως, είναι χρήσιμο να γνωρίζουν οι ιδιοκτήτες και οι κτηνίατροι ποιοι ορότυποι εμπλέκονται, ώστε να εκτιμήσουν την πιθανή αποτελεσματικότητα ενός εμπορικού εμβολίου ή την ανάγκη παρασκευής ενός αυτεμβολίου. Συνέπεια των ανωτέρω είναι, τουλάχιστον στα ζώα, να χρησιμοποιείται συστηματικά η μέθοδος MAT, που θεωρείται ότι είναι η «χρυσή μέθοδος» επιδημιολογικής οροδιερεύνησης της λεπτοπείρωσης των ζώων

Καθίσταται φανερό τόσο από τις έμμεσες μεθόδους διερεύνησης της μόλυνσης και τις δυσκολίες τους, όσο και από τις πολλές δυσκολίες της απομόνωσης και καλλιέργειας του παθογόνου, για την επιβεβαίωση της μόλυνσης, ότι οι μοριακές μέθοδοι θα αποτελέσουν μελλοντικά τα εργαλεία επιβεβαίωσης της υποψίας της λοίμωξης. Βέβαια δεν έχει ακόμη βρεθεί τρόπος διαφοροποίησης των μολυνόντων οροτύπων σε μοριακό επίπεδο με ευκολόχρηστες εφαρμογές, αλλά οι προσπάθειες είναι συνεχείς (Cullen et al., 2005; Wang et al., 2007; Monahan et al., 2008; Slack et al., 2009; Hartskeerl et al., 2011).

Συμπεραίνεται ουσιαστικά ότι, για πολλά χρόνια ακόμη, η συστηματική μελέτη της παρουσίας του παθογόνου στην υποψία λεπτοσπείρωσης, άρα και η μελέτη της παθογένειας του μικροοργανισμού (Choy, 2012) απαιτούν 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 στον οποίο ανήκει (Palaniappan et al., 2005; Morey et al., 2006; Bomfim and Koury, 2006; Smythe et al., 2013; D'Andon et al., 2014)

Για τη συστηματική παθογενετική μελέτη του γένους *Leptospira* είναι απολύτως απαραίτητη η όσο το δυνατόν ορθότερη ταξινομική κατάταξη των απομονωμένων στελεχών. Όμως, λόγω των δυσκολιών μελέτης του μικροοργανισμού με κλασικές μεθόδους βακτηριολογίας, η ανάπτυξη νέων μοριακών μεθόδων τις τελευταίες δεκαετίες αλλάζει ταχύτατα τη γνωστή κατάταξη, αλλά και τις ελπίδες αναγνώρισης νέων παθογόνων οροτύπων, λοιμογόνων παραγόντων για απομονωμένα στελέχη και τη σύνδεσή τους με συγκεκριμένους ξενιστές.

Βέβαια είναι ήδη γνωστό ότι χαρακτηριστικά αντιγόνα επιφάνειας κάποιων οροτύπων απαντώνται σε διαφορετικά είδη του μικροοργανισμού δυσκολεύοντας την οριστική κατάταξή τους. Τα τρία ανωτέρω στάδια πλήρους ταξινόμησης του μικροοργανισμού είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν μόνο σε οργανωμένα εργαστήρια, που διαθέτουν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και την τεχνογνωσία (Johnson and Harris 1967, Johnson and Faine 1984, Woo T.H. 1997).

Ο εμπλουτισμός της LepBank με πληροφορίες γύρω από το γονιδίωμα του γένους *Leptospira* είναι συνεχείς, με αποτέλεσμα να διαφαίνεται ότι είναι απαραίτητη η ανακατάταξη ακόμη και μη παθογόνων οροτύπων στην κατηγορία των παθογόνων ειδών (Morey et al. 2006), όπως έχει προταθεί για την περίπτωση του είδους *Leptospira meyeri* (Slack et al., 2009). Βέβαια είναι ήδη γνωστό ότι χαρακτηριστικά αντιγόνα επιφάνειας κάποιων οροτύπων απαντώνται σε διαφορετικά είδη του μικροοργανισμού, δυσκολεύοντας την οριστική τους κατάταξη. Αυτές οι δυσκολίες δεν βοηθούν τη μελέτη του μικροοργανισμού χωρίς την οργανωμένη ύπαρξη δομών μοριακής μελέτης του, με αποτέλεσμα να παραμένει η κλασική μέθοδος MAT ως η πλέον διαδεδομένη (Morey et al 2006; OIE 2014).

Ακόμη, όμως και αυτή, ερευνητές, που προέρχονται από χώρες, οι οποίες δεν έχουν αναγνωρίσει εθνικά τη σημαντικότητα του μικροοργανισμού, αδυνατούν να τη χρησιμοποιήσουν λόγω διαδικασίας και κόστους, άρα αναγκάζονται να περιορίζονται στη χρήση ευκολότερων έμμεσων (ορολογικών) μεθόδων αιτιολογικής διάγνωσης της λεπτοσπείρωσης των ζώων και του ανθρώπου, όπως είναι η ELISA.

Οι διάφορες ELISA, για την ανίχνευση στον ορό του αίματος αντισωμάτων ειδικών σε παθογόνα είδη του γένους *Leptospira*, θεωρούνται γενικώς ευαίσθητες, αλλά δεν διακρίνουν τους εμπλεκόμενους ορότυπους (Cullen et al. 2005, Saglam et al. 2008, Doungchawee et al. 2008). Είναι δε ιδιαίτερα χρήσιμες στην οξεία φάση για κλινικά περιστατικά του ανθρώπου, όπου με τη γρήγορη ανίχνευση της IgM, παίρνονται 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 μια ομάδα ζώων, προκειμένου να αποφασιστεί αν συντρέχουν λόγοι περαιτέρω μελέτης της λοίμωξης με την δυσκολότερη και ακριβότερη μέθοδο MAT.

1.10. ΜΕΘΟΔΟΣ MAT

Η μέθοδος MAT είναι η κλασσική, επίσημα αναγνωρισμένη από διεθνείς οργανισμούς (Levett, 2004; WHO, 2006; OIE, 2014) ορολογική μέθοδος για την διερεύνηση της μόλυνσης από το γένος *Leptospira*. Η MAT, αν και δεν βοηθάει τη μελέτη της παθογένειας των οροτύπων του μικροοργανισμού, παραμένει η πλέον αξιόπιστη, ανεξάρτητα του είδους ζώου, τόσο σε ατομικό όσο και ομαδικό επίπεδο, για τη διερεύνηση της διασποράς των οροτύπων σε μια χώρα ή μια περιοχή. Συνδυαζόμενη δε με την κλινική εικόνα και, όπου είναι εφικτό, με τη χρήση διπλών ορών, μας δίνει πληροφορίες για την πιθανότητα ένας ορότυπος να έχει προκαλέσει τη λοίμωξη ή όχι. Η συνεισφορά αυτή της MAT αυξάνεται σημαντικά, σε περίπτωση που στην ορολογική διερεύνηση συμπεριληφθεί ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός οροτύπων (είκοσι και πλέον) από τους παγκοσμίως γνωστούς ως παθογόνους (OIE, 2014).

Όλες οι άλλες υπάρχουσες ορολογικές μέθοδοι συγκρίνονται διεθνώς με τη μέθοδο MAT, που βασίζεται στην αρχή της συγκόλλησης του αντιγόνου από τα ειδικά αντισώματα του ορού του αίματος. Ως εκ τούτου, η μέθοδος απαιτεί να υπάρχει το κατάλληλο αντιγόνο, που είναι οι διάφοροι ζωντανοί ορότυποι του μικροοργανισμού.

Επομένως υπάρχουν δύο βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου. Το ένα είναι η διαρκής συντήρηση ζωντανών λεπτοσπειρών και το άλλο είναι η επικινδυνότητα της εκτέλεσης της μεθόδου από μη κατάλληλα εκπαιδευμένα άτομα ή σε μη κατάλληλα διαρθρωμένα διαγνωστικά εργαστήρια. Τα δύο αυτά προβλήματα καθιστούν τη μέθοδο ορθά εκτελέσιμη μόνο από λίγα εργαστήρια ανά τον κόσμο και από χώρες, που διαθέτουν την εθνική επιστημονική βούληση να επανδρώσουν και να συντηρήσουν οικονομικά ένα εργαστήριο αναφοράς για τον μικροοργανισμό (National Veterinary Services Laboratories, 1987; Faine et al., 1999; Levett and Haake, 2010; Hartskeerl et al., 2011; Abdollahpour, 2013; Shivakumar, 2013). Γενικώς, η διαγνωστική αυτή μέθοδος παρουσιάζει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, που χρήζουν μιας σύντομης αναφοράς.

1.11. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ MAT

Τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της MAT είναι δέκα (ILS – WHO, 2003; WHO, 2006; OIE, 2014).

1. Η ειδικότητα της μεθόδου MAT είναι καλή, αφού δεν επηρεάζεται δυσμενώς από αντισώματα άλλων μικροοργανισμών.
2. Αν και υπάρχει αυξημένη πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ οροτύπων, που έχουν κάποια χαμηλή αντιγονική συγγένεια, η μέθοδος είναι μέχρι σήμερα η καλύτερη και ευκολότερη για την διερεύνηση της διασποράς των οροτύπων σε μια περιοχή. Άρα, είναι και η καλύτερη για την επιλογή του τρόπου προφύλαξης, κυρίως των παραγωγικών ζώων, από τον μικροοργανισμό.
3. Η μέθοδος MAT είναι η καλύτερη για την ανίχνευση της οξείας λεπτοσπείρωσης με ζεύγη ορών.
4. 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 οροτύπων, που απαιτούνται για την αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου MAT, αυξάνει παράλληλα την χρησιμότητά της στη μελέτη της διασποράς των οροτύπων στα είδη ζώων μιας περιοχής.
6. Η δυνατότητα της σύγκρισης των τίτλων αντισωμάτων σε κάθε ορότυπο, για τον οποίο ανιχνεύτηκαν αντισώματα, επιτρέπει στον ερευνητή την καλύτερη εκτίμηση της σημασίας ενός οροτύπου σε ένα είδος ζώου, συγκρινόμενο με ένα άλλο είδος ή ορότυπο.
7. Όμως, η μέθοδος MAT επηρεάζεται από τα εμβολιακά αντισώματα, στα είδη ζώων, όπως οι σκύλοι, που συστηματικά εμβολιάζονται. Άρα, απαιτεί τη σωστή καταγραφή του ιστορικού, όταν χρησιμοποιείται εμβόλιο και κυρίως την καταγραφή των οροτύπων του εμβολίου για σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
8. Η μέθοδος MAT απαιτεί ακριβή αριθμό ζωντανών μικροοργανισμών κατά την εκτέλεσή της, που πρέπει να είναι από καλλιέργεια λίγων ημερών. Άρα, απαιτεί τη συχνή ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού, η οποία με την σειρά της απαιτεί συχνή επιβεβαίωση των οροτύπων και συχνή τιτλοποίηση του αντιγόνου (International

Committee on Systematic Bacteriology 1984). Ας σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός διατηρείται καλύτερα σε ψύξη υγρού αζώτου, ώστε να είναι δυνατή η συχνή ανανέωση των καλλιεργειών των οροτύπων.

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

10. Η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου MAT αυξάνονται με την παγκόσμια αύξηση του αριθμού των γνωστών οροτύπων, αλλά και την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συμμετοχή οροτύπων, που έχουν τοπικά απομονωθεί.

Άρα, συνεκτιμώντας τα διεθνώς δημοσιευμένα ευρήματα, που αφορούν στις επιπτώσεις της λεπτοσπείρωσης στην παραγωγή, αλλά και στην ορολογική διερεύνηση της μόλυνσης στα παραγωγικά ζώα της Ελλάδας, συμπεραίνει κανείς ότι στην Ελλάδα η μόλυνση φαίνεται να είναι μεν σημαντική ως προς τις οικονομικές της επιπτώσεις (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Bisias et al. 2009), όμως, αν και είναι σημαντική στη δημόσια υγεία (OIE, 2008) δεν αποτελεί, αντικείμενο μελέτης. Ο κυριότερος λόγος, που έχει παραμεληθεί η νόσος, φαίνεται ότι είναι οι υλικοτεχνικές ελλείψεις των υπαρχόντων εργαστηρίων, που θα μπορούσαν να ασχοληθούν με τη μελέτη του μικροοργανισμού.

Διεθνώς, το νόσημα ανήκει πλέον επίσημα στην κατηγορία των «νέο-αναδυόμενων» νοσημάτων σημαντικών τόσο στη Δημόσια Υγεία όσον και στην οικονομία πολλών χωρών (WHO, 2006; Mahajan anChhabra, 2008; Pappas et al., 2008; Vijayachari et la., 2008; Lau et al., 2010; Hartskeerl et al., 2011; Abdollapour, 2013;). Άρα, η δημιουργία ενός εργαστηρίου αφιερωμένου στον μικροοργανισμό στην Ελλάδα είναι θέμα εθνικής πολιτικής βούλησης, αφού η αρχική οικονομική, τεχνολογική και επιστημονική επένδυση απαιτεί εθνικούς πόρους. Μόνο μέσω ενός καλά οργανωμένου και οικονομικά ενισχυμένου εθνικού φορέα μπορούν να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα προβλήματα.

Η αναγκαιότητα για μια εθνική πολιτική, ως προς τη Λεπτοσπείρωση, πηγάζει και από την έλλειψη αντιγονικής συγγένειας μεταξύ των οροτύπων του μικροοργανισμού, που έχει ως συνέπεια την αναποτελεσματικότητα των εισαγόμενων εμβολίων. Οι σημαντικοί ορότυποι στη χώρα μας διαφέρουν από αυτούς, που υπάρχουν στα εμπορικά εμβόλια για την προφύλαξη από το παθογόνο, όπως

διαφαίνεται από διερευνητικές πρωτοβουλίες που αφορούσαν ένα μεγάλο ποσοστό ζώων (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Bisias et al., 2010β).

1.12. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Η ανοσία, που αναπτύσσεται, μετά τη μόλυνση με *Leptospira* spp, είναι κυρίως χυμική. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος του παθογόνου και κάποιες από τις γλυκολιποπρωτεΐνες του φαίνεται ότι παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή αντιγονικότητα. Η σύνθεση αυτή του κυτταρικού τοιχώματος καθορίζει την ανοσολογική εξειδίκευση των παραγόμενων αντισωμάτων, που καθορίζουν την προστασία ενός ζώου προς συγγενείς μόνο οροτύπους (Naiman et al., 2001; Cullen et al., 2005; Choy, 2012; Cesar et al., 2012).

Τα αντισώματα δεσμεύουν και καταστρέφουν τον ορότυπο στην παρουσία συμπληρώματος, που πιθανώς διεγείρεται από ουσίες, όπως οι προαναφερθείσες (Adler and Faine, 1983; Vishith and Kearnat, 2005; Adler and Moctezuma, 2010; Cesar et al., 2012). Η επίδραση του ζώου ξενιστή στην ανοσολογική αντίδραση φαίνεται να καθορίζει και την προσαρμογή των οροτύπων σε διάφορα είδη ζώων. Επομένως αυτές οι αντιδράσεις καθορίζουν τη δυνατότητα ανάπτυξης αποτελεσματικών εμβολίων με δυνατότητα κάλυψης όσο το δυνατόν περισσότερων ειδών ξενιστών (Wang et al. 2007).

Η χρήση αποτελεσματικού/ων εμβολίου/ων είναι ο καλύτερος τρόπος προφύλαξης των ζώων και του ανθρώπου, αφού η επαφή τους με πιθανές δεξαμενές του παθογόνου είναι δύσκολο έως αδύνατον να αποτραπεί. Μέχρι σήμερα, σε περιοχές όπου είτε λόγω κλίματος, είτε λόγω της φύσης των αγροτικών δραστηριοτήτων (εργάτες ρυζιού και κτηνοτροφίας) (Herath et al., 2014) απαιτούνται εμβόλια για την προφύλαξη από την κλινική έκφραση της μόλυνσης, τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται με επιτυχία είναι νεκρά και αποτελούνται από ολόκληρους μικροοργανισμούς.

Οι ορότυποι, που πρέπει να περιλαμβάνονται σε αυτά, είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενοι τοπικά. Για τον λόγο αυτό, αυτοί πρέπει να αναγνωριστούν πριν επιλεγεί το καταλληλότερο εμβόλιο ή αποφασιστεί η παρασκευή ενός αυτεμβολίου (Martinez et al., 2004; Wang et al., 2007). Ιδιαίτερη προσοχή δε, πρέπει να δίνεται

στις οδηγίες χορήγησης, αλλά και στις πληροφορίες του αποτελέσματος, όταν ο εμβολιασμός αφορά ζώα. Στην τελευταία περίπτωση είναι αναγκαίο να γνωρίζουν οι ιδιοκτήτες εμβολιασμένων ζώων και το βαθμό της δικής τους προφύλαξης.

Είναι γνωστό ότι τα υπάρχοντα εμβόλια προλαμβάνουν μόνο την κλινική εκδήλωση της νόσου από τον ομόλογο ορότυπο. Δηλαδή τα εμβόλια που υπάρχουν δεν σταματούν την μόλυνση ούτε την απέκκριση ακόμη και του ομόλογου οροτύπου, πόσων δε ετερόλογων οροτύπων (Adler and Moctezuma, 2010). Τα δύο αυτά προβλήματα του εμβολιασμού των ζώων είναι σοβαροί λόγοι συστηματικών μελετών για την επιτυχή παραγωγή αποτελεσματικού μοριακού εμβολίου, ικανού να προφυλάξει, κυρίως κλινικά, διαφορετικά είδη ζώων κατά των περισσότερων γνωστών παθογόνων οροτύπων (Nascimento et al., 2004; Wang et al., 2007; Ko et al., 2009).

Η προσπάθεια αυτή είναι διαρκής, λόγω δε της εξέλιξης των μοριακών μεθόδων της μελέτης του παθογόνου, είναι πλέον αυξημένες οι πιθανότητες παρασκευής αποτελεσματικού γενικού εμβολίου. Η συνεχής εξέλιξη των μοριακών μεθόδων προσθέτει νέα δεδομένα στη υπάρχουσα γνώση γύρω από το παθογόνο, άρα αλλάζουν και τα επιδημιολογικά του δεδομένα παγκοσμίως. Για αυτό το νόσημα αναφέρεται πλέον ως «νέο-αναδυόμενο», προκαλώντας αυξημένο ενδιαφέρον για την περαιτέρω μελέτη του.

Στην Ελλάδα, όμως, δεν έχει η μόλυνση ακόμη συμπεριληφθεί στη λίστα των σημαντικότερων ζωνοόσων. Άρα, ελλιπέστατη είναι και η επιδημιολογική μελέτη της λεπτοσπείρωσης στα κατοικίδια και τα άγρια ζώα. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη συστηματική προσπάθεια ανάδειξης της σημαντικότητας του γένους *Leptospira* στην ζωική παραγωγή και τη Δημόσια Υγεία.

ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με απόλυτη επίγνωση των πολλαπλών προβλημάτων μελέτης της λεπτοσπείρωσης, όπως αυτά αναλύθηκαν ανωτέρω, αποφασίστηκε η μελέτη της μόλυνσης των μικρών μηρυκαστικών από είδη του γένους *Leptospira*. Εξ όσων δε είναι δυνατόν να γνωρίζουμε, αυτή εδώ η προσπάθεια είναι η πρώτη, που διενεργήθηκε στα παραγωγικά ζώα στην Ελλάδα. Ελάχιστες ήταν δε οι αναφορές, που βρέθηκαν, ακόμη και στην απλή ορολογική μελέτη της λεπτοσπείρωσης των ζώων γενικώς (Sarris et al., 1987; Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Mylonakis et al., 2005).

Αρχικός ερευνητικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της παθογενετικότητας του παθογόνου στα επιλεγμένα είδη ζώων. Μετά όμως, από τη μελέτη της κείμενη βιβλιογραφίας, προτεραιότητα δόθηκε στην διερεύνηση και συλλογή όλων των πληροφοριών, που αφορούσαν τα ενδιάμεσα στάδια της επιδημιολογικής σημασίας του παθογόνου στα μικρά μηρυκαστικά.

Επομένως, ένα σύνολο σκοπών διαβαθμίστηκε εξ αρχής ως μέρος του κύριου στόχου μελέτης της λεπτοσπείρωσης των μικρών μηρυκαστικών. Αυτοί οι σκοποί ήταν:

1. Η εκτεταμένη ανασκόπηση και δημοσιοποίηση της κείμενης βιβλιογραφίας με σκοπό την παροχή χρήσιμων πληροφοριών για μια λοίμωξη των ζώων, που θεωρείται νέο-αναδυόμενη στον άνθρωπο, αλλά είναι ελάχιστα μελετημένη στην Ελλάδα.
2. Η ανίχνευση της σημαντικότητας οροτύπων του γένους *Leptospira*, που αναγνωρίζονται ως εμπλεκόμενοι σε περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών και η ανάδειξη της οικονομικής τους σημασίας.
3. Η ανίχνευση του παθογόνου σε μολυσμένους ιστούς των προς μελέτη ειδών ζώων με μεθόδους εφικτές για τα πραγματικά δεδομένα της Ελλάδας. Μεταξύ αυτών στόχος ήταν κυρίως η απομόνωση του παθογόνου, ώστε να μελετηθούν συγκριτικά κάποιοι παράγοντες παθογένειας των οροτύπων του γένους *Leptospira* και
4. Η συσχέτιση των παρατηρούμενων μικροσκοπικών αλλοιώσεων του ιστού προτίμησης του παθογόνου, δηλαδή του νεφρικού, με τις ιδιότητες αναγνωρισμένων οροτύπων για κάθε είδος ζώου ξεχωριστά.

Για την πραγματοποίηση των προαναφερθέντων σκοπών ακολουθήθηκε η πιο κάτω συνοπτικά περιγραφόμενη διαδικασία εκτέλεσης της ερευνητικής προσπάθειας.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Η πρακτική διερεύνηση της παθογενετικότητας της μόλυνσης των μικρών μηρυκαστικών από το γένος *Leptospira* απαιτούσε,

1. Την εντόπιση περιοχών με υψηλή πιθανότητα ύπαρξης του μικροοργανισμού στα προς διερεύνηση είδη ζώων
2. Την εντόπιση κοπαδιών με υψηλή πιθανότητα ενεργής λοίμωξης από το μικροοργανισμό, άρα ύπαρξης του μικροοργανισμού σε μεγάλους αριθμούς στους ιστούς προτίμησής του
3. Την ύπαρξη ιστικών μικροσκοπικών βλαβών, που θα μπορούσαν να ήταν αποτέλεσμα της δράσης παθογόνων οροτύπων στους ιστούς προτίμησής τους
4. Την μελέτη και τη σύνδεση των δυσλειτουργιών, που προκαλούνται κατά τη δράση ενός παθογόνου οροτύπου στους ιστούς, χρησιμοποιώντας

A) τεχνικές **έμμεσης διερεύνησης** της ύπαρξης του παθογόνου σε ιστούς και στη συνέχεια συσχέτισή τους με ευρήματα, που δηλώνουν την παθογένειά του. Δηλαδή είτε με την κλινική εκδήλωση των βλαβών αυτών είτε με την μικροσκοπική τους παρατήρηση. Μια τέτοια τεχνική είναι η PCR και

B) τεχνικές **άμεσης διερεύνησης** της παρουσίας του παθογόνου στους ιστούς προτίμησής του. Σε αυτή την κατηγορία μεθόδων μελέτης της μόλυνσης από το γένος *Leptospira* ανήκουν:

- α. η απομόνωση του παθογόνου και
- β. η παρατήρηση αυτού στους ιστούς

Η απομόνωση του παθογόνου είναι απαραίτητη για την εργαστηριακή του μελέτη, ως προς κάποια χαρακτηριστικά, που χρησιμοποιεί για να προκαλέσει τις παρατηρούμενες βλάβες στους ιστούς προτίμησής του. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η βιοαντοχή του σε κοινώς χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά και η μελέτη της παθογόνου δράσης του στα κύτταρα του αίματος μέσω τοξικών παραγόντων, που πιθανώς παράγει.

Άρα η διερεύνηση της λεπτοσπειρώσεως των μικρών μηρυκαστικών ακολούθησε την εξής δομή:

1. Εντόπιση των περιοχών υψηλού κινδύνου

2. Εντόπιση, εντός των αναγνωρισμένων περιοχών υψηλού κινδύνου, κοπαδιών μικρών μηρυκαστικών με προβλήματα αναπαραγωγής (αποβολές, γεννήσεις θνησιγενών νεογνών, μη ικανοποιητική γαλακτοπαραγωγή, κτλ)
3. Συλλογή δειγμάτων ορού αίματος και ιστών προτίμησης του παθογόνου από κοπάδια των περιοχών υψηλού κινδύνου και
4. Εργαστηριακή διαγνωστική διερεύνηση του παθογόνου στα δείγματα προς εξέταση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

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

Γ. Μπίσιας, DVM, Σ. Κρήτας, DVM, PhD, DipECPHM, Α. Μπουριέλ, DVM, MSc, MSc, PhD, MRCVS, Β. Κοντός, DVM, PhD

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(1): 76-84
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2010, 61(1): 76-84

■ 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 Διεύθυνση Κτηνιατρικής Ανατολικής Αττικής

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

³ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παροστατολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

⁴ Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας

ABSTRACT. 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 μηδισμένη ή ελάχιστη αντιγονική συγγένεια, οι οποίοι ταξινομούνται σε 8 παθογόνα είδη, που προκαλούν κλινική ή υποκλινική νόσο. Φυσιολογική δεξαμενή του μικροοργανισμού στο περιβάλλον θεωρούνται κυρίως τα τρωκτικά, αλλά φορείς είναι και πολλά άλλα είδη ζώων. Οι φορείς απελευθερώνουν τον μικροοργανισμό με τα ούρα τους, μόλυνοντας το περιβάλλον. Στο περιβάλλον ο μικροοργανισμός επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα, όταν η θερμοκρασία διατηρείται γύρω στους 25°C. Το ποσοστό μόλυνσης των ζώων στις διάφορες

Correspondence: Bisias G.

Directory of Veterinary Services of East Attica, 14th km, Marathonas 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^η γμ. Αττικής, Μαραθώνα, Παλλήνη Αττικής

Τηλ: 210-6033391, Κιν: 6936705138, Fax 210-6665703, E-mail: gbisias@yahoo.gr

Submission date: 13.01.2010

Acceptance 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 ορθοθετικότητα περιστατικών αεροβόλων μικρών μηρυκατικών, υποδηλώνουν ποσοστό μόλυνσης γύρω στο 25%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά μεταξύ φανογενεϊκών υγρών παραγωγικών ζώων κυμαίνεται από 5,7% έως 16,2%. Σημαντικότερα ορόσηπα να είναι οι Bratislava, Australis και Copenhagen. Στην Ελλάδα απαιτούμενη είναι η συστηματικότερη μελέτη της λεπτοσπείρωσης, άρα και η δημιουργία επιστημονικής και τεχνολογικής υποδομής (κυρίως λόγω των πιθανών κλιματικών αλλαγών).

Λέξεις κλειδιά: βιβλιογραφική ανασκόπηση, λεπτοσπείρωση, ζoonosis, επιρροήματα ζώα

Ο αιτιολογικός παράγων και οι ιδιαιτερότητές του

Η λεπτοσπείρωση 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 ταξινόμικές αναπροσαρμογές, από οκτώ παθογόνα είδη, τρία ενδιάμεσα, εξήκω μη παθογόνα και δύο που δεν έχουν ακόμη εξανιστοποιηθεί 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 ανταγωνιστικά διακριτές ομάδες, ενώ κατά άλλους σε 25 (WHO, 2003). Διαχρονικά, και από την αναγνώριση των μικροοργανισμών 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 προσαρμολογία 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 επιζωολογία του κάθε ορότυπου στα ευπαθή είδη ζώων.

Διασπορά του μικροοργανισμού στη φύση

Πολλά είδη ζώων, τροπικών 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 εσπεριζόμενα σπληνάρια του νεφρού (WHO 2003). Μέσω αυτών περνάει στα ουροφόρα σπληνάρια, 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 υπόλοιγες 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 λεπτοσπείρωση 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, Cicconi 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 προσαρμολογία των ορότυπων στο είδος του ζώου, η φυσική αντοχή των ξενιστών ζώων σε έναν ορότυπο, πιθανότητα αλλαγής στις περιβάλλοντικές συνθήκες (κλίμα, υγρασία, γεωγραφική 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, ασκία και η ακροτερόπλευρη αγγειάζια 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 πτυνοθυμίτιδα των σαρκοκράνων (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 σιγήτως 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 απομόνωσης της λεπτοσπείρας 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 ακραίες 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 πλήθους 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 τεχνολογίας (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 επιζωοτιολογικών 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 σπώνων δεν καλύπτουν το 60%, αφού είναι οροθετικοί και σε μη εμβολιασμένους ορότυπους. Το ίδιο αναφέρεται 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 ιατρομόνωση και διατήρηση σημαντικών ορότυπων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή αποτελεσματικότερων εμβολίων (αυτεμβολίων). 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 υδάνια 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 εξεπλάσια 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 ζωονόσων 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 παραδοσιακά παρατηρούμενη τάση αύξησης των δηλωμένων κρουσμάτων, λόγω πιθανώς αύξησης των ποσοστών μόλυνσης, αλλά είναι πιθανό

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 (Levet 2004, Bomfim M.R. Q 2006, Saglam Y.S. 2008). Τα προβλήματα αργονιότητας και αποβολών των μηρυκαστικών, τα οποία μπορούν να πάρουν επιζωοτιολογική μορφή μαζικότητας (θύελλα αποβολών), έχουν διττή οικονομική επίπτωση, αφού τελικά καταλήγουν σε μείωση της κρεοαποπαραγωγής όσο και της γαλακτοπαραγωγής – η μόλυνση των μηρυκαστικών εκδηλώνεται και ως αργαλξία (Guitian et al. 2001, WHO 2002, Tooloei et al. 2008). Από τη σκοπιά της επίσης 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 περισσότερο ευπαθών στη λεπτοσπείρωση. Τα πρόβατα θεωρούνται ανθεκτικότερα, ακόμα και από τις αγεες (ΟΙΕ Terrestrial Manual 2008, Lilienbaum et al. 2009). Ωστόσο, ούτε αυτά είναι απαλλαγμένα του κινδύνου της οικονομικής ζημιάς, κυρίως αν βοσκάζουν 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 επέτρεψε σε περισσότερα είδη ζώων (Burriel et al. 2003) και αφορούσε φαινομενικά σε υγιή βοοειδή (277), πρόβατα (282), αίγες (198), χοίρους (516) και σκυλούς (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 σκυλούς ο Copenhageni.

Συνεπικριτώντας 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 αντίχενυση αντιγόνων του με μεθόδους ανοσοφθορισμού/ανοσοϊσοχημείας και γ) την αντίχενυση γενετικού του υλικού με τη μέθοδο της αλανιδωτής 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, Dounghawee 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 ταξινόμηση των 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 σιωπά 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 απολυμένοι 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 απολυμένα προϊόντα της αποβολής και κυρίως το έμβρυο. Από την απομόνωση του μικροοργανισμού από τα εσωτερικά όργανα του εμβρύου συνεπείγεται και η μόλυνση της μητέρας (Vemulapalli et al. 2005, Saglam et al. 2008).

Η απομόνωση του μικροοργανισμού γίνεται επιτυχώς με τη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων, των οποίων η οσμή παρασκευάζεται 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 Grippityphosa, απαιτούν χρόνο επώασης καλλιέργειών περίπου 10 ημερών (Ellis 1986, Letocart et al. 1997). Άρα, λόγω της αναγκαίας μακροχρόνιας

επώκισης των ενοφθαλμισμένων υποστρωμάτων, είναι απαραίτητη η αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων και μυκήτων που επιμολύνουν τα θεραπευτικά υλικά ή τη θερμοκρασία επώκισης (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 συντακτική 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 παράγωση αποτελεσματικών εμβολίων (αιτεμβολίων). Άρα, η απομόνωση αποτελεί μια αναγκαία 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 απαιτεί 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 λεπτοσπειρώση. 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 τεχνολογία (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 λεπτοσπειρώσης 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 γενικά ευαίσθητες, αλλά δεν διακρίνουν τους εμπλεκόμενους ορότυπους (Cullen et al. 2005, Saglam et al. 2008, Doungchawee 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 των ζωντανών μικροοργανισμών. 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 αξιόπιστη 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 (Faime 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. σκυλοί 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 καλλιεργειών 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 προσομοιωθεί στο εξεταζόμενο είδος ζώου.

10. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου MAT μεγεθύνονται 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 υλικότεχνικές αδυναμίες των υπαρχόντων εργαστηρίων, που θα μπορούσαν να ασχοληθούν με τη μελέτη του μικροοργανισμού.

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

ιστοπούτου ή εργαστηρίου αιμειζόμενου στον μικρο-οργανισμό είναι θέμα εθνικής πολιτικής βούλησης, αφού η αγροτική οικονομική, τεχνολογική και επιστημονική επένδυση απαιτεί εγγυήσιους οικονομικούς πόρους.

Η αναγκαιότητα για μια εθνική πολιτική ως προς τη λεπτοπείρωση 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 διαφύουν, όπως διαφαίνεται (Burtiel 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.
- Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, Montrouel 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.
- Burtiel 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.
- Burtiel 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 I (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, Nivetpathomwat A, Inwisai T, Samasraanee 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 WA & 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, Willis NH (2000) *J. Clin Microb* 38:2731-2733.
- Faine S, Adler B, Bojin 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, Kaliaperumal 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 raccoons (*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 Infectiönskr.* 142:27-37.
- Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyooka R, Koizumi N, Akasi H, Vongphithacham P, Watanabe H, Aoyama A (2008) Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in food-prone rural areas in Lao PDR. *Am 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. *Bras J vet Res anim Sci* 45:190-199.
- Leal-Castellanos CB, Garcia-Suarez R, González-Figueroa E, Fuentes-Allen JL, Escobedo-De La Rana 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, Lederq 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.
- Letoart M, Baranton G, Perolat P (1997) Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschnei*) 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, Vacconcellos SA (2009) Identification of *Leptospira* spp carriers among seroactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 87:16-19.
- Mahajan S, Chhabra 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.
- Mohanan AM, Callanan JJ and Nally JE (2009) Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 46:792-799.
- Mooney 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, Ratnam S (2002) Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. *Jpn J Infect Dis* 55:170-173.
- Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayagi K, Savalakarankulam 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.
- Petrakis M (1932) A propos d'une épidémie de spirochétose icterohémorragique à l'île de Syra: origine hydrique de l'épidémie, présence des spirochetes chez les rats d'égoût, en Grèce. *Bulletin de la Société 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-borne 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.
- Sagliam YS, Yener Z, Temur A, Yalcin E (2008) Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research*, 74:119-122.
- Salina-Melender JA, Narvaez-Arce C, Riojas-Valdes V, Cantá-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 1996. *Am J Trop Med Hyg*, 61:399-404.
- Sarris K, Alkateriniadou L, Mazarakis K, Bourti-Chatzopoulou E, Saoulidis K (1987) Leptospirosis in a pig farm in Thessaloniki area, Delta Ellinikis Kriniatrikis Eterias. 38:30-41.
- Schreier S, Triampo W, Dounghawee G, Triampo D, Chadsatji S (2009) Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. *Biol Res* 42:5-12.
- Sitpriya V, Pipatanagul V, Mertowidjono K, Boonpuchnavig V, Boonpuchnavig S (1980) Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. *Kidney Internat* 17:827-836.
- Stack AT, Galloway RL, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2009) Reclassification of *Leptospira meyeri* serovar Perameles to *Leptospira interrogans* serovar Perameles 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.
- Talbot MD, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM (2003) Prevalence of leptospirosis infection in Texas cattle: Implications for transmission to humans *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 3:141-147.
- Toofaei M, Abdollahpour 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 (2008) Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Veter Ophthalmol* 9:169-173.
- Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, Bellenger E, Baranton G, Posic 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, Kuempel 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 Sehgal. *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, Delhi-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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΚΑΙ ΚΟΠΑΔΙΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

3.1. Εισαγωγή

Η εντόπιση περιοχών με υψηλά ποσοστά μόλυνσης κοπαδιών προβάτων και αιγών στο γένος *Leptospira*, ήταν αποτέλεσμα της συνεργασίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του ΠΘ με το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τριπόλεως.

Η επιλογή της Πελοποννήσου έγινε βάσει πληροφοριών από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ (<http://www.keelpno.gr/>- Διαδραστικός Πίνακας Συχνότητας Κρουσμάτων), που έδειχναν ότι οι περιοχές της Δυτικής Ελλάδας ήταν περιοχές υψηλότερου κινδύνου λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών των περιοχών είναι και οι νομοί της Ηλείας και Μεσσηνίας της Περιφέρειας Πελοποννήσου.

Επίσης, μετά από προσωπική επαφή με το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τριπόλεως μάθαμε ότι, πρώτον το εργαστήριο παρελάμβανε δείγματα αίματος από περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών από έξι εκ των επτά νομών της Πελοποννήσου. Δηλαδή ελάμβανε δείγματα από τους νομούς Αρκαδίας, Αργολίδας, Ηλείας, Κορινθίας, Μεσσηνίας και Λακωνίας, άρα και τους νομούς Ηλείας και Μεσσηνίας (δυτική – νοτιοδυτική Πελοπόννησος). Δεύτερον, από τις διαχρονικές, επιδημιολογικά μη συστηματικά μελετημένες ενδείξεις, που είχε το εργαστήριο και αφορούσαν σποραδικά περιστατικά με κλινική εικόνα της κλασσικής μορφής της λεπτοσπείρωσης, φαινόταν ότι υπήρχε μεγαλύτερη πιθανότητα μελέτης του παθογόνου σε κοπάδια μικρών μηρυκαστικών της Πελοποννήσου. Τα περισσότερα από αυτά προέρχονταν από τη δυτική – νοτιοδυτική Πελοπόννησο.

Έτσι, η αρχική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης άρχισε με τον προσδιορισμό των ποσοστών μόλυνσης των κυριότερων λοιμωδών νοσημάτων με κλινική εκδήλωση την αποβολή, σε κοπάδια των προεπιλεγμένων περιοχών, μεταξύ των οποίων ήταν και το προς διερεύνηση παθογόνο.

Συνοπτικά, οροί αίματος, που διερευνούσε το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης για τα αίτια αποβολών, διαχωρίζονταν σε δύο μέρη. Το ένα το χρησιμοποιούσε το Κτηνιατρικό Εργαστήριο και το άλλο παρέμενε στους -80⁰ C για μελλοντική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης. Η συλλογή δειγμάτων διήρκησε δύο χρόνια.

Μετά το πέρας των δύο ετών το σύνολο των καταψυχθέντων ορών ανήλθε στους 463, εκ των οποίων οι 289 ήταν προβάτων και οι 174 αιγών. Οι οροί αυτοί διερευνήθηκαν για την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι πέντε πιθανών αιτίων αποβολών με ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία. Τα αίτια που διερευνήθηκαν ήταν τα γένη *Brucella* spp, *Chlamydophila* spp, *Leptospira* spp, *Coxiella brunetii* και *Toxoplasma gondii*.

Οι μέθοδοι διερεύνησης και τα αποτελέσματα αναγνώρισης οροθετικών κοπαδιών περιγράφονται στη δημοσίευση, που ακολουθεί.

A Serological Investigation of Some Abortion Causes among Small Ruminant Flocks in Greece

George Bisias Laboratory of Microbiology and Parasitology, University of Thessaly Karditsa Greece

Angeliki R. Burriel Laboratory of Microbiology and Parasitology, University of Thessaly Karditsa Greece

Sofia Boutsini Center of Athens Veterinary Institutions, Institute of Infectious and Parasitic Diseases Athens Greece

Spiros K. Kritas Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki Thessaloniki Greece

Leonidas S. Leontides Laboratory of Epidemiology, University of Thessaly Karditsa Greece

Citation: G. Bisias, A.R. Burriel, S. Boutsini, S.K. Kritas, L.S. Leontides: A Serological Investigation of Some Abortion Causes Among Small Ruminant Flocks In Greece. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*. 2010 Volume 8 Number 2. DOI: 10.5580/28f4

Keywords: Abortions, Infectious Diseases, Public Health, Small Ruminant

Abstract

Four hundred sixty three (463) serum samples collected from aborted ewes (289) and does (174) were tested for antibodies to five selected pathogens having public health importance. The investigation aimed in serologically ranking the importance of **Leptospira spp** infection, as compared to other causes of small ruminant abortion in Southern Greece. It involved 37 sheep flocks and 18 goat herds. All investigated farms were positive for antibodies to one or more of the selected microorganisms. Three hundred sixty eight (79.48%) of the examined serum samples were antibody positive. From them 219 ewe samples were positive to **Brucella spp.** (44 samples), **Chlamydophila spp.** (43 samples), **Leptospira spp.** (72 samples), *Coxiella burnetii* (141 samples) and *Toxoplasma gondii* (144 samples). From the 149 positive doe samples 39, 37, 32, 110 and 52 were positive to the above causes respectively. None of the positive ewes and does was positive to only **Leptospira spp.**, of which the highest antibody titers were observed for serovar Australis (ewes) and Copenhageni (does). Serovar Tarassovi had a significant presence in both animal species, but it showed lower titers.

Introduction

Abortions of food producing animals are the cause of considerable economic losses for the farmer¹⁰. In addition, they may have a public health importance, if they are the result of microorganisms causing disease to man. Some microorganisms of public

health importance causing also abortion are *Brucella*, *Listeria*, *Coxiella*, *Chlamydia* and *Toxoplasma* ¹⁰. These infectious agents are easily spreading among animals and man in all farming systems, but they are of increased importance where communal grazing is common and farms are family holdings ⁹. Communal grazing is common in Southern Europe, Middle East and African nations ²⁷, where *Brucella* spp. is a frequent cause of severe human illness, thus the first pathogen suspected when small ruminant abortions are investigated ². This approach to the investigation of abortions is often overlooking other causes, such as *Coxiella*, *Toxoplasma* or *Chlamydia*, vigorously investigated in nations where production is mostly intensive or they are [free](#) of brucellosis ¹⁷.

However, regardless of production system, *Leptospira* spp. infection is rarely investigated as a possible cause of abortion among small ruminants, because the systematic study of animal leptospirosis is rather difficult. Leptospirosis, a disease of animals and man, is a “re-emerging” infection of economic and public health importance. Its prevalence varies according to animal species and area where the disease is investigated. The reported prevalences of infection among the various animal species across the world are between 2 and 46%, the variation depending not only on the animal species, but also the method of testing, the geographic area and time of the year testing was performed ^{3,4,11,25,26}. Testing is difficult because the Microscopic Agglutination Test (MAT) ^{6,13,29}, which is the internationally recognized method for investigating leptospirosis, is neither easy to perform nor cheap. The MAT uses as antigen live leptospira serovars, thus requires a well equipped laboratory and trained personnel to maintain the large number of serovars needed. These difficulties affect the systematic and in depth investigation of the impact of the infection on animal production, including this of small ruminants ^{8,24,26}. However, to safely implicate *Leptospira* spp in abortion other infectious causes should be excluded. The present investigation attempted to serologically document the proportional importance of the most frequently investigated small ruminant abortion causes in Southern Greece, in relation to leptospirosis, which is systematically excluded. The aim was to serologically rank and further study the effects of *Leptospira* spp. infection on small ruminant production.

Material and Methods

Samples Selected

The investigation was performed during 2005-2006 in collaboration with the Veterinary Diagnostic Laboratory of Tripolis, Ministry of Agriculture, Southern Greece. The laboratory was receiving samples from a variety of cases among which were also serum samples from small ruminant abortion. Within a period of two years, 463 serum samples, 289 from ewes and 174 from does, were collected originating from 37 sheep flocks (totaling 2751 ewes), and 18 goat herds (totaling 3605 does).

Laboratory examination

Serum samples were tested for *Brucella* spp., *Chlamydophila* spp., *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii* and *Toxoplasma gondii*.

The cELISA kit COMPELISA 400 (Veterinary Laboratories Agency (VLA), New Haw, Addlestone, Surrey, UK) was used to test for brucella antibodies in serum. The kit is detecting antibodies to smooth *Brucella* spp. A sample with optical density equal to or higher than 60% of the mean optical density of the control was considered positive.

The CHEKIT Chlamydia ELISA Test Kit (Idexx Laboratories, USA) was used for the detection of antibodies against *Chlamydophila abortus* (formerly known as *Chlamydia psittaci*). A sample having an OD equal or over 40% to that of the control was considered positive.

The CHEKIT Q-Fever ELISA Test Kit (Idexx Laboratories, USA) was used for the detection of antibodies against *C. burnetii* in serum samples of ruminants. A sample having an OD equal or over 80% to that of the control was considered positive.

Antibodies to *T. gondii* were detected with immunofluorescence (IFAT) using the Toxo-IF slides (DIACHEL, USA). Samples with titers of 1/160 and above were considered positive.

The MAT was used to test for leptospirosis. The MAT was performed according to the Standard Operating Procedures of the Veterinary Laboratories Agency (VLA), UK, which uses as antigen 19 live serovars of *Leptospira* spp. belonging to six serogroups. A positive sample showed 50% or more of antigen agglutination in a titer of 1/100.

Results

From the ewe samples 219 (75.8%) were positive to one or more of the investigated causes. From the doe samples 149 (85.6%) were positive to one or more causes.

The proportion of positive samples from each ewe flock ranged from 33.4% to 75%, while the same for doe herds was from 48.32% to 85.7%.

The numbers of positive samples to each of the investigated causes are given in Table 1.

Animal species	<i>T. gondii</i>	<i>C. burnetii</i>	<i>Brucella</i> spp.	<i>Chlamydophila</i> spp.	<i>Leptospira</i> spp.
Sheep	144	141	44	43	72
N°289	(49.8%)	(48.8%)	15.2%	(14.9%)	(24.9%)
Goats	52	110	39	37	32
N°174	(29.9%)	(63.2%)	(22.4%)	(21.2%)	(18.4%)
Total	196	251	83	80	104

The highest number of positive ewe samples was positive to *T. gondii* and for doe samples to *C. burnetii*. *Leptospira* spp was third among ewes and fifth among does.

Leptospira spp serovars most frequently identified were Tarassovi, Australis and Bratislava for sheep, and Australis, Tarassovi and Copenhageni for goat serum samples. However serovar Tarassovi showed low titers (1/100-1/440) compared to the other serovars (1/100-1/3200).

A higher number of ewe samples 53 (36.6%) had high antibody titers to *T. gondii*, while a higher number 21 (56.7%) of doe samples had high titers to chlamydomphila infection compared to the other causes of abortion. All brucella positive samples had low titers (very close to 60% of OD). They originated from four sheep and six goat farms. All farms were serologically positive to two or more of the investigated causes, while 11 sheep and 10 goat farms had between one and five animals positive to four of the investigated abortion causes. Positive samples to *C. brunetii* were found in all sheep and goat farms. This microorganism was the one identified as the sole infectious agent in 19 ewes and 27 does.

Eight sheep flocks and 13 goat herds were positive to leptospirosis, but only four sheep and two goat farms had samples with rather high antibody titers (1/800 and above). In respect to high titers, the predominant serovars were Australis for ewes and Copenhageni for does.

Table 1: Positive serum samples to five abortion infectious agents

Discussion

Common grazing in Greece contributes to the spreading, between farms, of pathogens such as *Brucella* spp¹⁹. Thus, control measures are necessary for limiting brucellosis infection. The Rev-1 vaccine administered by instillation in the conjunctiva of young and adult animals is used since 1998 for the control of brucellosis^{18,27}. Thus, low antibody titers to *Brucella* spp could also result from vaccinating adults with Rev-1¹⁹. The ELISA method is influenced by vaccination with Rev-1^{5,27} when testing of animals is within a few months from administration. Unfortunately, due to the control measures when a farm is brucellosis positive, farmers do not volunteer information on farm procedures, animal history or origin of individual animals. *Chlamydomphila* spp. and *C. brunetii* have been concurrently involved in abortions of small ruminants¹. Both microorganisms are not only of economic importance, but also of public health. They also show similarities in their pathogenesis¹⁶, thus, they should be considered together when the causes of abortion are investigated. The investigation of both microorganisms in cases of abortion could lead to a better understanding of the role of the two in the epidemiology of abortion, thus contribute toward a more accurate estimation of the role other pathogens may have. In the present investigation the highest proportion of serum samples considered positive to *C. brunetii* were from goats. Perhaps, this species is of a greater risk to public health than sheep, as also is suggested by others¹². Some have reported a significant association between high numbers of strongly positive samples to *C. brunetii* and abortions²³. This was not appearing to be the case in the present investigation as only 36 (14.3%) were strong positive.

The overall proportion of seropositive animals to *T. gondii* observed here was lower than that reported from other parts of the world using the same testing method^{7,22}. Toxoplasmosis causes high rates of abortion among small ruminants. Thus, to contribute the abortions to *T. gondii* or any of the investigated infectious agents, paired serum samples should have been tested and this was not possible. The lower proportion of seropositive animals observed here compared to those reported by others^{7,22}, could have resulted from the differences in the production system. Samples examined were from a semi-extensive system for sheep and extensive for goats. In these kinds of production systems, animals have fewer chances to come in contact with young cats²¹, the source of the parasite.

The information in the above discussed causes of abortion was considered necessary for better evaluating the role of *Leptospira* spp in the epidemiology of abortion, thus further study its impact on the production of small ruminants on farm level. The proportions of positive sheep and goat samples to leptospirosis were similar to those found in an earlier investigation of abortion among small ruminants in Greece³ and to those among apparently healthy animals⁴. However, a difference in the prevalence of the reported serovars was recorded compared to these previous investigations. The variation was, perhaps, resulting from limiting the investigation to a smaller geographic area. Of interest was the predominance of serovar Tarassovi among sheep samples (second in goats), but not showing high antibody titers. High leptospira antibody titers in small ruminants have been associated to the presence of *Leptospira* spp in vaginal fluids and semen¹⁴. Perhaps, there is in such cases a higher risk for venereal transmission of *Leptospira* and abortion, although these species are considered more resistant to leptospirosis than others. Higher titers could, thus help in increasing the probability to isolate important *Leptospira* serovars and successfully study the pathogenesis of naturally occurring leptospirosis. The microorganism is difficult to isolate, thus the selection of method, animals and tissue is critical for accurate identification of leptospira as cause of abortion^{15,26}. Therefore, a combination of methods, such as serologic examination of target flocks, isolation and PCR, are necessary to reliably and economically investigate leptospirosis under field conditions^{14,15}. The reliable identification of serovar carriers could help in deciding upon the importance of leptospirosis in the pathogenesis of abortion, thus effective control programs. By determining, which serovars are found in vaginal fluids or colonize kidney tissue or cause clinical disease mainly expressed as abortion, the best commercial or locally produced vaccine for leptospirosis could be selected for maximum protection. PCR has been found as one such method significantly related to observed high antibody titers, as estimated by the MAT¹⁵.

Conclusion

The main conclusion of the present investigation is that when other pathogens are also serologically identified as possible causes of abortion, the role of *Leptospira* spp in the pathogenesis of naturally occurring abortions could not be easily defined. None of the animals or flocks/herds investigated were positive to only *Leptospira* spp.. Fortunately, none of the flocks/herds positive to leptospirosis had animals positive to brucellosis, but the same was not true with the serologic evidence from the other microorganisms. Thus, abortions among small ruminants in Greece should be

attributed to mixed infections, explaining partially their high prevalence. Furthermore, although *Leptospira* spp infection does not appear as one of the most important causes of naturally occurring abortion, its pathogenesis should be further investigated.

References

1. Berri M, Rekiki A, Boumedine K, Rodolakis A: 2009, Simultaneous differential detection of *Chlamydomydia abortus*, *Chlamydomydia pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminants clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol* 9:1-8.
2. Blancou J and Lefèvre, PC: 2006, Diseases that Threaten Livestock. In *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*, editor M. Tibayrenc, publ John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA.
3. Burriel AR, Magana-Vougiouka O, Butsini S, Nomikou K et al: 2002, A serologic investigation of some causes of reproductive failure among small ruminants in Greece. *OJVR* 1:57-63
4. Burriel AR., Dalley C, Woodward MJ: 2003, Prevalence of *Leptospira* species among farmed and domestic animals in Greece. *Vet Rec* 153:146-148
5. European Commission: 2001, Health and Consumer Protection Directorate-General. *Brucellosis in Sheep and goats (Brucella melitensis)*, SANCO.C.2/AH/R23?2001, 20-5-2010
6. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P: 2000, *Leptospira* and *Leptospirosis*. MediSci Press, Melbourne, Australia.
7. Filho MFS, Erzinger E, da Cunha IAL, Bungi FM, et al.: 2008, *Toxoplasma gondii*: abortion outbreak in a goatherd from Southern Brazil. *Ciências Agrárias Londrina* 29: 887-894
8. Guitian FJ, Garcia-Pena FJ, Oliveira J, Sanjuan ML et al.: 2001, Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet Microbiol* 80:275-284
9. Gwaze Rumosa F., Chimonyo M. and Dzama K 2009. Communal goat production in Southern Africa: a review. *Trop Anim Health Prod* 41: 1157-1168
10. Jonker HF: 2004, Fetal death: comparative aspects in large domestic animals. *Anim Rep Sci* 82-83:415-430
11. Kawaguchi L, Sengkeoprath B, Tsuyuoka R, Koizumi N, et al.: 2008, Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in food-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Med Hyg* 78:957-961
12. Khalili M, Sakhaee E: 2009, An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 80:1031-1032
13. Levett PN: 2004 *Leptospirosis: A forgotten zoonosis?* *Clin Appl Immunol Rev* 4:435-448
14. Lilenbaum W, Varges R, Brandao FZ, Cortez A, et al.: 2008, Detection of *Leptospira* spp in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenol* 69:837-842
15. Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, et al.: 2009, Identification of *Leptospira* spp carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 87:16-19
16. Lukacova M: 1996, Are *Coxiella burnetii* and *Chlamydia* related? Antigenic properties of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiae*. *Alpe Adria Microbiol J* 5:3-13
17. Menzies PI: 2006, The Ontario Health Program: A structured health management program for intensively reared flocks. *Small Rum Res*, 62: 95-99

18. Minas A, Minas M, Stournara A, Tselepidis S: 2004, The “effects” of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Rev Vet Med* 64:41-47.
19. Minas A: 2006, Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Rum Res* 62:101-107
20. Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayagi K, Savalaikarankulam S, et al.: 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
21. Pinheiro Jr JW, Mota RA, da Fonseca Oliveira AA, Faria EB. Et al.: 2009. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas. *Brazil Parasitol Res* 105:709-715
22. Reis CR, Lopes FMR, Freire RL, Goncalves DD. Et al.: 2007, Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in caprines from Pitanga city, Parana State Brazil. *Brazil. J Vet Res An Sci* 44:358-363.
23. Rousset E, Durand B, Berri M, Dufour P. et al.: 2007, Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet Microbiol* 124:286-297.
24. Saglam YS, Yener Z, Tenur A, Yalcin E: 2008, Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Rum Res* 74:119-122
25. 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
26. 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
27. Spickler RA and Roth AJ: 2008, Brucellosis. In: *Emerging and Exotic diseases of animals*. 3rd edition, Iowa State University, Ames Iowa, USA, pp 141-143
28. Stournara A, Minas A, Chatzopoulou-Bourtzi E, Stack J, et al.: 2007, Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (EPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Vet Microbiol* 119:53-64.
29. 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

Generated at: Mon, 14 Jan 2013 00:57:12 -0600 (000028f4) —

<http://www.ispub.com:80/journal/the-internet-journal-of-veterinary-medicine/volume-8-number-2/a-serological-investigation-of-some-abortion-causes-among-small-ruminant-flocks-in-greece.html>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *LEPTOSPIRA* SPP. ΣΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ

4.1

**Συλλογή ορών αίματος και νεφρικού ιστού
για την παθογενετική διερεύνηση της
μόλυνσης από *Leptospira* spp**

Μετά την οροδιερεύνηση περιστατικών αποβολών προβάτων και αιγών της Περιφέρειας Πελοποννήσου, η παθογενετική μελέτη της λεπτοσπείρωσης περιορίστηκε σε περιοχές που τα μικρά μηρυκαστικά είχαν εμφανίσει υψηλά ποσοστά (30-35%) οροθετικότητας και τίτλους αντισωμάτων πάνω από 1/800. Από αυτές τις περιοχές σχεδιάστηκε η συλλογή ορών αίματος και ιστών προς διερεύνηση. Δηλαδή, μεταξύ των επιδιώξεων για τη μελέτη της παθογενετικότητας του γένους *Leptospira* ήταν η συλλογή ιστών αποβολών, ορών αίματος και νεφρών από κοπάδια των προεπιλεγμένων περιοχών. Όμως, από την οροδιερεύνηση (Bisias et al., 2010β - **Κεφάλαιο 3**) διαφάνηκε ότι δεν υπήρχαν ικανοποιητικές συνθήκες συνεργασίας μεταξύ της ομάδας μελέτης και των παραγωγών. Έτσι, αποφασίστηκε εξ αρχής να περιοριστεί η διερεύνηση μόνο στη συλλογή νεφρικών ιστών και ορών αίματος κατά τη σφαγή. Η συλλογή αυτών έγινε με τη βοήθεια των κτηνιάτρων των Δ/νσεων Κτηνιατρικής των περιοχών, που είχαν αναγνωριστεί ως υψηλού κινδύνου και στις οποίες είχαν εντοπιστεί τα κοπάδια με υψηλή οροθετικότητα στη λεπτοσπείρωση. Η συλλογή ορών αίματος και νεφρικού ιστού γινόταν από ενήλικα θηλυκά πρόβατα και αίγες, σε δύο τοπικά σφαγεία (ένα σε κάθε περιοχή) ανεξάρτητα αιτιολογίας σφαγής τους.

Κατά τον κλινικό έλεγχο των ζώων προς σφαγή γινόταν αιμοληψία. Τα δείγματα μεταφέρονταν στην τοπική Κτηνιατρική Υπηρεσία για διαχωρισμό του ορού. Κατά τον έλεγχο του σφάγιου γινόταν αφαίρεση των νεφρών, οι οποίοι μεταφέρονταν με παγοκύστες στο κτηνιατρείο. Τα δείγματα νεφρών και ορών αίματος συσκευασμένα σε πάγο αποστέλλονταν με Εταιρεία Ταχυμεταφοράς στην Αθήνα. Η παραλαβή γινόταν συνήθως εντός 24 ωρών από την συλλογή των δειγμάτων. Με την παραλαβή των δειγμάτων στην Αθήνα, οι οροί αποθηκεύονταν άμεσα σε καταψύκτη των -80⁰ C. Οι ιστοί προετοιμάζονταν και εργαστηριακά επεξεργάζονταν όπως περιγράφεται στις επόμενες παραγράφους.

Συνολικά συλλέχτηκαν 110 δείγματα ιστών και 110 δείγματα ορών αίματος από ισάριθμα ζώα.

4. 2

Απομόνωση ορότυπων του γένους *Leptospira*

Η προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου *Leptospira* spp απαιτεί πρώτον εργαστήριο υψηλής ασφάλειας, που διασφαλίζει την προστασία των εργαζομένων και των επισκεπτών και δεύτερον κατάλληλες συνθήκες και θρεπτικά υποστρώματα για την **in vitro** ανάπτυξη του απαιτητικού αυτού γένους. Λόγω της μη ύπαρξης στην Ελλάδα κατάλληλου κρατικού εργαστηρίου για τη μελέτη της λεπτοσπειρώσης, μας παραχωρήθηκε η χρήση εργαστηριακού χώρου ασφάλειας P3 στο Εργαστήριο Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, της Σχολής Δημόσιας Υγείας, στην Αθήνα. Το εργαστήριο δεν είχε έτοιμη υποδομή για την προσπάθεια απομόνωσης και διατήρησης λεπτοσπειρών. Μετά από μικρή χρηματοδότηση ιδιωτικού φορέα, το εργαστήριο προετοιμάστηκε για την προσπάθεια απομόνωσης του μικροοργανισμού από ιστούς. Εδώ, αμέσως με την παραλαβή των νεφρών, γινόταν αποστείρωση της επιφάνειάς τους με εμβάπτιση σε κλινικό οινόπνευμα και άμεση καύση του οίνοπνεύματος. Στη συνέχεια και άσηπτα γινόταν εγκάρσια διατομή του κάθε νεφρού, ελεγχόταν το παρέγχυμα του για μακροσκοπικά παθολογικά ευρήματα και επιλέγονταν περιοχές για περαιτέρω μελέτη του ιστού.

Από τις περιοχές αυτές γινόταν άσηπτη αφαίρεση 3 γραμμαρίων νεφρικού ιστού. Μετά από ζύγιση, ο ιστός τοποθετείτο σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher, που περιείχε 30 ml αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (αναλογία 10% βάρος/όγκος).

Το δείγμα ομογενοποιείτο πλήρως στο stomacher (easymix, AES Laboratories, France) και στη συνέχεια αραιωνόταν διαδοχικά μέχρι την αναλογία του 1/1000 και σε ποσότητα ικανοποιητική για να μπορεί να φιλτραριστεί.

Το φιλτράρισμα γινόταν με τη χρήση φίλτρου χαμηλής προσρόφησης πρωτεϊνών (φίλτρα 0,45 μm , Sigma-Aldrich Hellas). Τρεις έως τέσσερις σταγόνες φιλτραρισμένου μίγματος από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονταν σε 7 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υποστρώματος Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) (Becton Dickinson Hellas) χωρίς αντιβιοτικό και εις διπλούν. Μια δεύτερη σειρά καλλιέργειών, πάλι εις διπλούν, από τα ίδια δείγματα και τις ίδιες αραιώσεις ετοιμαζόταν σε EMJH θρεπτικό υπόστρωμα, που περιείχε 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ της αντιμικροβιακής ουσίας 5-Fluorouracil (5-FU, Sigma - Aldrich Hellas).

Οι καλλιέργειες επωάζονταν στους $28 \pm 1^\circ \text{C}$ και σε σκοτεινό, ήσυχο περιβάλλον για τουλάχιστον 28 ημέρες. Ο έλεγχος της ανάπτυξης των μικροοργανισμών γινόταν εβδομαδιαία με μικροσκόπηση σκοτεινού πεδίου. Αν μια

καλλιέργεια ήταν ύποπτη επιμολύνσεων από βακτήρια ή κυρίως μύκητες επανφιλτραριζόταν με φίλτρα της ίδιας διαμέτρου αυτών της προετοιμασίας.

Επίσης, από το φιλτραρισμένο μίγμα της αρχικής αραίωσης (1/10) γινόταν καλλιέργεια μιας σταγόνας εναιωρήματος σε αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα Columbia blood Agar (CBA) (Oxoid Hellas), που επωαζόταν στους 37⁰ C για τουλάχιστον 48 ώρες. Σκοπός αυτής της καλλιέργειας ήταν ο έλεγχος των πιθανών επιμολύνσεων της αρχικής αραίωσης του δείγματος ή η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών στο νεφρικό ιστό.

Στη συνέχεια από τον ιστό, που είχε απομείνει, επιλέγονταν 3-4 τεμάχια 50 χιλιοστών, τα οποία εμβαπτιζόνταν σε φορμόλη 10% και προετοιμάζονταν για ιστολογική εξέταση. Το υπόλοιπο των ομογενοποιημένων δειγμάτων και ο εναπομείναντας ιστός έμπαιναν για συντήρηση σε κατάψυξη των -80⁰ C, διότι δεν υπήρχε η δυνατότητα ψύξης σε υγρό άζωτο, όπως συνίσταται.

4.3

Οροδιερεύνηση Ύποπτων για Λεπτοσπείρωση Ζώων κατά τη Σφαγή

Η οροδιερεύνηση των 110 ορών αίματος έγινε με δύο μεθόδους μικροσυγκόλλησης.

α) Το kit *Leptospira* Serology (Bio-Rad, France), που χρησιμοποιείται ως μέθοδος προελέγχου στον άνθρωπο και διερευνήθηκε εδώ για την καταλληλότητά του ως μέθοδος προελέγχου της οροθετικότητας στα μικρά μηρυκαστικά και

β) Τη διεθνώς αναγνωρισμένη μέθοδο MAT, που είναι αποδεκτή ως η επίσημη μέθοδος επιδημιολογικής διερεύνησης των οροτύπων της λεπτοσπείρωσης των ζώων (OIE, 2008).

4.3. 1. Μέθοδος kit *Leptospira* Serology

Οι 110 οροί αίματος διερευνήθηκαν για την οροθετικότητά τους στο γένος *Leptospira* βάση των οδηγιών του kit. Το kit περιελάμβανε μη ειδικό (non-specific) αντιγόνο και θετικό μάρτυρα. Μια σταγόνα αντιγόνου αναμιγνυόταν με μια σταγόνα ορό και η παρατήρηση του 50% της συγκόλλησης του αντιγόνου γινόταν με μικροσκόπηση σκοτεινού πεδίου. Η εκτέλεση της μεθόδου έγινε στο Ινστιτούτο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών.

4.3. 2. Μέθοδος MAT

Ένα έως δύο ml από κάθε ορό από τους 110 ορούς αίματος συσκευάστηκαν βάσει διεθνών κανονισμών και στάλθηκαν για ορολογική διερεύνηση στο Veterinary Laboratories Agency, UK (VLA), που είναι το Εργαστήριο Αναφοράς της λεπτοσπείρωσης της Μεγάλης Βρετανίας.

Οι οροί διερευνήθηκαν βάση των Standards Operating Procedures του VLA, όπως έγινε και με την πρότερη διερεύνηση για αναγνώριση περιοχών με αυξημένη πιθανότητα μόλυνσης μικρών μηρυκαστικών (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**). Οι ορότυποι, που χρησιμοποιήθηκαν από το Βρετανικό VLA ήταν αυτοί του **Πίνακα 2**. Οι ορότυποι ανήκαν σε 6 διαφορετικές ορο-ομάδες.

Πίνακας 2: Ορότυποι του γένους *Leptospira* για τη διερεύνηση ορών αίματος με την μέθοδο MAT

Ορο-ομάδα	ορότυπος	Στέλεχος αναφοράς
1	Canicola	Hond Utrecht V
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Ballum	Mus 127
	Copenhageni	Winberg
2	Pomona	Pomona
	Gripotyphosa	Moskva V
	Tarassovi	Perepelicin
	Mozdok	Pomona 5626
3	Australis	Ballico
	Bratislava	Jez Brat
	Autumnalis	Akiyami A
4	Sejroe	M24
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Mini	Sari
5	Bataviae	Swart
	Zanoni	Pyrogenes
	Javanica	Veldradbad
6	Hardjo	Hardjo prajitno Hardjo bovis

4. 4

Διερεύνηση της Μόλυνσης Ιστών με τη Μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR)

4.4. 1 . Απομόνωση του DNA

Η απομόνωση του DNA από τα 110 δείγματα νεφρικού ιστού έγινε σε διάστημα μιας εβδομάδας. Τα δείγματα νεφρικού ιστού είχαν διατηρηθεί στους -80°C , διότι δεν υπήρχε δυνατότητα χρησιμοποίησης υγρού αζώτου. Δεν χρησιμοποιήθηκαν τα ομογενοποιημένα δείγματα, διότι υπήρχε φόβος ότι είχαν καταστραφεί οι μικροοργανισμοί λόγω της μη παραμονής τους σε υγρό άζωτο. Έτσι, η απομόνωση του DNA έγινε από τα τεμάχια των κατεψυγμένων ιστών. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν μικροποσότητες ιστού, από περιοχές του νεφρού παρακείμενες των προηγούμενων δειγματοληψιών. Η επιλογή γινόταν με άσηπτη διαδικασία αμέσως μετά την απόψυξη του νεφρικού ιστού.

Η απομόνωση έγινε βάση των οδηγιών του εμπορικού kit εξαγωγής DNA (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) που χρησιμοποιήθηκε. Ο θετικός μάρτυρας ήταν καθαρή καλλιέργεια του ορότυπου *Icterohaemorrhagiae* του είδους *L. interrogans*, που είχε διατηρηθεί σε θρεπτικό ημίρρευστο υπόστρωμα EMJH. Ο θετικός μάρτυρας ήταν συνεισφορά του Τμήματος Μικροβιολογίας του Ινστιτούτου Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων, του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών.

4.4. 2. Συνθήκες εκτέλεσης της μεθόδου PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της multiplex PCR ήταν τα ζεύγη:

G1 5'-ctgaatcgctgtataaaagt-3' G2 5'-ggaaaacaaatggtcggaag-3' και
B64-I 5'-ctgaattctcatctcaactc-3' και B64-II 5'-gcagaaatcagatggacgat-3'.

Η εκτέλεση της PCR έγινε βάση των οδηγιών των Kwok and Higuchi (1989). Οι αλληλουχίες των primers και οι συνθήκες PCR για την αναγνώριση του DNA των παθογόνων ειδών του γένους *Leptospira* ήταν όπως περιγράφηκαν από τους Gravekamp et al., (1993) με ελάχιστες αλλαγές.

Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο PlatinumTaq DNA polymerase της εταιρίας Invitrogen Corporation, UK (cat No: 10966-018). Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια της κλασσικής PCR, δηλαδή το Buffer, το MgCl_2 και τα dNTPs ήταν επίσης της εταιρίας Invitrogen. Ως αρνητικός μάρτυρας

χρησιμοποιούνταν νερό επεξεργασμένο με DEPC, για να αποκλειστούν οι επιμολύνσεις των δειγμάτων.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνταν σε συνολικό όγκο 25μl στα οποία περιέχονταν

- 5μl 10X buffer,
- 0.75μl MgCl₂ (50 mM),
- 1μl dNTPs (10 mM),
- 0.2μl Platinum *Taq* DNA polymerase (5 u/ul),
- 25pmoles από τους primers και
- 2μl template DNA.

Το αρχικό στάδιο μετουσίωσης πραγματοποιείτο στους 94 °C για 2 λεπτά. Τα θερμικά στάδια της PCR ήταν

- 94°C για 90 δεύτερα,
- 55 °C για 60 δεύτερα και
- 72 °C για 120 δεύτερα επί 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους.

Το τελικό στάδιο επέκτασης πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 5 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων τα προϊόντα ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Συγκεκριμένα, από κάθε προϊόν αναλύονταν 10μl και η εξέταση του ηλεκτροφορητικού προτύπου γινόταν μετά από χρώση με ethidium bromide σε συγκεντωση 0.5 mg mL⁻¹. Τα μεγέθη προσδιορίζονταν με τη βάση 100-bp DNA ladder της εταιρίας New England BioLabs Inc (Cat No: N3231L).

4. 5

Ιστολογική Διερεύνηση Αλλοιώσεων στο Νεφρικό Ιστό

Τεμάχια νεφρικού ιστού, που είχαν επιλεχτεί για ιστολογική διερεύνηση Και συντηρούνταν σε 10% φορμόλη διερευνήθηκαν στο Τμήμα Ιστοπαθολογίας του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών. Η διαδικασία προετοιμασίας για ιστολογική παρατήρηση ήταν η εξής:

4.5. 1. Μονιμοποίηση

Για τη μονιμοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκε έτοιμο διάλυμα φορμόλης 10% (ΚΩΔ 410CE, Βιοδυναμική Α.Ε., Ελλάς). Τα ιστοτεμάχια νεφρών παρέμειναν στο διάλυμα για 48 ώρες. Μετά την μονιμοποίησή τους, τεμαχίζονταν σε μικρότερα τεμάχια και έμπαιναν για άλλες 24 ώρες σε φρέσκο διάλυμα φορμόλης, αναλογίας και στις δύο περιπτώσεις όγκου 1:10 (ιστός-υγρό). Στη συνέχεια γινόταν η αφυδάτωση, η διαύγαση και η έγκληση των ιστοτεμαχίων σε παραφίνη.

Η αρχική αφυδάτωση γινόταν σε μια σειρά διαλυμάτων οиноπνεύματος με βαθμούς που ξεκινούσαν από 70° και έφταναν τους 100°. Με τη χρήση αυτόματης ιστοκινέττας με προγραμματισμό τεμαχίζονταν οι ιστοί σε τεμάχια μεγέθους 5 χλστ περίπου το καθένα κλεισμένα σε πλαστικό καψάκι. Κάθε περιέκτης υποβαλλόταν στην εξής διαδικασία:

Αφυδάτωση

Η αφυδάτωση έγινε με αρχική εμβάπτιση σε μίγμα φορμόλης – οινόπνευματος 96° αναλογία ½, όπου το ιστοτεμάχιο παρέμενε για μισή ώρα. Στη συνέχεια εμβαπτιζόταν διαδοχικά σε

- οινόπνευμα 70° και παραμονή για 1 ώρα
- οινόπνευμα 80° και παραμονή για 1 ώρα
- οινόπνευμα 90° και παραμονή για 2 ώρες
- οινόπνευμα 96° και παραμονή για 4 ώρες
- οινόπνευμα 100° και παραμονή για 4 ώρες

Η απόλυτη αλκοόλη (100°) (absolute analytical grade alcohol, ACS UN 1170) αραιώθηκε με αποσταγμένο νερό και οι βαθμοί της μετρήθηκαν με αλκοολόμετρο.

Διαύγαση

Η διαύγαση γινόταν με παραμονή του ιστοτεμαχίου σε ξυλόλη για 4 ώρες. Η ξυλόλη ήταν της εταιρείας BVH (Analar Normapun UN 1307)

4.5. 2. Δημιουργία Block παραφίνης

Τα ιστοτεμάχια συγκρατήθηκαν με ζεστή λαβίδα από τα καψάκια και τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά καλούπια, που περιείχαν ζεστή παραφίνη (MERK Hellas, K.93152064) με θερμοκρασία πήξης τους 56° - 58° C.

Τα καλούπια παρέμειναν 8 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για πήξη. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλαστικά δακτυλίδια προσαρμογής για μικροτόμο και ακολούθως σε θερμοκρασία ψυγείου για 20 περίπου ώρες.

Τα block παραφίνης με τους ιστούς αφαιρέθηκαν από τα καλούπια και με μικροτόμο Jung ελήφθησαν τομές σε φύλλα πάχους 5 μικρών. Τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60° C. Τέλος τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες στεγνώθηκαν σε κλίβανο στους 37- 40° C.

4.5. 3. Χρώση μικροϊστοτεμαχίων

Πριν βαφτούν τα μικροϊστοτεμάχια με τις επιλεγμένες χρωστικές ουσίες έγινε η αποπαραφίνωσή τους.

Η **αποπαραφίνωση** έγινε με το εξής σταδιακό πρωτόκολλο εργασίας:

- ο παραμονή σε ξυλόλη 30° C για 15 λεπτά,
- ο αλλαγή της ξυλόλης 30° C και παραμονή των μικροϊστοτεμαχίων σε αυτή για άλλα 15 λεπτά

μεταφορά και παραμονή των μικροϊστοτεμαχίων

- ο σε οινόπνευμα 96° για 1 λεπτό,
- ο σε οινόπνευμα 80° για 1 λεπτό,
- ο σε οινόπνευμα 70° για 1 λεπτό,
- ο αλλαγή του οινόπνευματος 70° και παραμονή τους σε αυτό για 1 λεπτό,
- ο ξέπλυμα των μικροϊστοτεμαχίων με νερό της βρύσης για 1 λεπτό και
- ο διαφοροποίηση σε μίγμα 100 ml αλκοόλης 70°, που περιέχει 1 ml υδροχλωρικού οξέος.

Στη συνέχεια ακολούθησε παραμονή των μικροϊστοτεμαχίων

- ο σε οινόπνευμα 70° για 1 λεπτό
- ο σε οινόπνευμα 80° για 1 λεπτό
- ο σε οινόπνευμα 96° για 4 λεπτά
- ο σε οινόπνευμα 100° για 4 λεπτά

Η **δεύτερη διαύγαση** έγινε σε ξυλόλη αρχικά για 2 λεπτά και μετά από αλλαγή της ξυλόλης παραμονή των τεμαχίων στην καθαρή ξυλόλη για 5 λεπτά.

Η **χρώση** των ιστοτεμαχίων με χρωστικές αιματοξυλίνης – εωσίνης έγινε με διαδοχική εμβάπτιση στις επιλεγμένες χρωστικές ως εξής:

1. Εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη (Harris solution, IVD - DC 253949.1612) και παραμονή για 15 λεπτά. Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό της βρύσης μέχρι οι τομές να πάρουν βαθύ κυανούν χρώμα.
2. Στη συνέχεια έγινε η διαφοροποίηση των μερών του ιστού με εμβαπτίσεις στο υγρό διαφοροποίησης μέχρι να πάρουν οι τομές ιώδες χρώμα. Ξεπλύθηκε ο ιστός με νερό βρύσης μέχρι οι τομές να ξαναγίνουν κυανές. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν χωρίς παραμονή για 5-6 φορές σε εμπορική αλκοολούχο εωσίνη (IVD, Surgipath, code 01602 E).
3. Στην τελευταία εμβάπτιση τα πλακίδια παρέμειναν στην εωσίνη για 4-5 δευτερόλεπτα. Μετά από αυτή την παραμονή έγινε γρήγορο ξέπλυμα σε νερό βρύσης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα.
4. Η καλυπτρίδα επικολλήθηκε με την βοήθεια συγκολλητικού DPX (toluene base mounting medium fast, Panreac - DC 255254.1610) προσέχοντας να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ της καλυπτρίδας και του ιστού.

4.5. 4. Παρατήρηση του Μικροοργανισμού σε Τεμάχια Ιστού

Τα ιστοτεμάχια διερευνήθηκαν για μικροσκοπικές αλλοιώσεις, που αναφέρονται βιβλιογραφικά ότι παρατηρούνται κατά τη μόλυνση του νεφρού με παθογόνους ορότυπους του γένους *Leptospira*.

Μετά την ιστολογική διερεύνηση των δειγμάτων ιστών, όσα δείγματα ιστών σε παραφίνη έδειξαν μικροσκοπικά ευρήματα συναφή με τις βιβλιογραφικές αναφορές, που τις αποδίδουν στη μόλυνση από *Leptospira spp.*, προετοιμάστηκαν για τη χρώση silver stain. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Steiner Modified Silver Stain (Sigma – Aldrich, Greece). Το πρωτόκολλο επεξεργασίας των μικροϊστοτεμαχίων ήταν της εταιρίας Newcomer Supply Laboratory (USA). Συγκεκριμένα έγινε αποπαραφίνωση των ιστοτεμαχίων και χρώση με τις χρωστικές του kit. Το kit περιείχε θετικό μάρτυρα. Ο ιστός βάφτηκε κίτρινος και οι λεπτόσπειρες μαύρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5. 1. Εντόπιση Οροθετικών Κοπαδιών προβάτων και αιγών

Η διερεύνηση διήρκησε περίπου δύο χρόνια. Τα αποτελέσματα της προσπάθειας εντόπισης περιοχών με οροθετικά κοπάδια μικρών μηρυκαστικών στη μόλυνση από το γένος *Leptospira* περιγράφονται στην επισυναπτόμενη στο **Κεφάλαιο 3** δημοσίευση (Bisias et al., 2010β). Βάση των ευρημάτων αυτών επιλέχθηκαν οι δύο περιοχές της Περιφέρειας Πελοποννήσου με αυξημένο κίνδυνο λεπτοσπείρωσης των μικρών μηρυκαστικών, ώστε να γίνει προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου. Στις περιοχές αυτές είχαν εντοπιστεί τέσσερα κοπάδια προβάτων και δύο αιγών με υψηλούς τίτλους μόλυνσης από *Leptospira* spp. και ποσοστά μόλυνσης 30 – 35% περίπου.

5. 2. Απομόνωση των *Leptospira* spp.

Από τις περιοχές που εντοπίστηκαν κοπάδια με υψηλή οροθετικότητα έγινε η συλλογή νεφρών με σκοπό την απομόνωση του παθογόνου. Συνολικά 24 δείγματα νεφρικού ιστού από 24 ενήλικα πρόβατα καλλιεργήθηκαν για την απομόνωση του μικροοργανισμού. Η προσπάθεια παρατήρησης του μικροοργανισμού με μικροσκόπηση σκοτεινού πεδίου διήρκησε περίπου τέσσερις μήνες. Όμως, η παρατήρηση ήταν αρνητική.

Λόγω της υποφαινόμενης αποτυχίας της προσπάθειας απομόνωσης του μικροοργανισμού, το εργαστήριο φιλοξενίας αποφάσισε, για οικονομικούς λόγους, να μη συνεχίσει τη βοήθεια, που μας παρείχε με τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων ασφάλειας. Επειδή δεν υπήρχε άλλος κατάλληλα διαμορφωμένος χώρος για την προσπάθεια απομόνωσης λεπτοσπειρών, το σημαντικό αυτό κομμάτι της διερεύνησης διεκόπη, αλλά συνεχίστηκε η συλλογή νεφρικού ιστού και ορών αίματος.

Κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό σε άλλους μικροοργανισμούς κατά την αερόβια καλλιέργεια.

5. 3. Οροδιερεύνηση Ύποπτων για Λεπτοσπείρωση Ζώων κατά τη Σφαγή

α) kit *Leptospira* Serology

Διερευνήθηκαν 110 οροί αίματος, αλλά κανένας εξ αυτών δεν έδειξε το βαθμό συγκόλλησης, που περιέγραφε το kit. Όμως, καταγράφηκαν ως ύποπτες συγκόλλησης ακόμη και ελαφρές αλλαγές του μίγματος ορού – αντιγόνου. Έτσι, 55 οροί έδειξαν

«ψιλά αραχνοειδή» συσσωματώματα και περιφερειακές συγκολλήσεις με ή χωρίς ελάττωση του αριθμού των λεπτοσπειρών του αντιγόνου του kit. Αυτά τα ευρήματα καταγράφηκαν ως ύποπτα μόλυνσης, επειδή δεν έδειξαν την κλασική περιγραφή του πρωτόκολλου του πραγματικού οροθετικού δείγματος (**Πίνακας 3 – Παράρτημα 1**).

β) MAT μέθοδος

Από τους 110 ορούς αίματος που διερευνήθηκαν στη Βρετανία, 28 (25,45%) ήταν θετικοί σε οκτώ διαφορετικούς οροτύπους του γένους *Leptospira*. Οι τίτλοι ήταν από 1/100 έως 1/800 (**Πίνακας 3 – Παράρτημα 1**). Πέντε θετικοί οροί ήταν θετικοί σε δύο οροτύπους. Οι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν ήταν οι

Tarassovi (10 οροί)

Autumnalis (10 οροί),

Zanoni (6 οροί)

Hebdomadis και Javaniva (2 οροί) και

από ένας ορός στους οροτύπους Bratislava, Hardjo prajinto και Bataviae

Από τα 28 θετικά ζώα στην MAT τα 16 ήταν ύποπτα με την μέθοδο του kit.

5. 4. Διερεύνηση της Μόλυνσης του Νεφρικού Ιστού με τη Μέθοδο της Polymerase Chain Reaction (PCR)

Από τα 110 δείγματα ιστών που διερευνήθηκαν με την μέθοδο της PCR, 38 (34,5%) βρέθηκαν θετικά στο γένος *Leptospira*. Από τα 38 δείγματα θετικά στην PCR, 23 (60,5%) ήταν θετικά και στη μέθοδο MAT και 17 ήταν ύποπτα λεπτοσπείρωσης στο kit (**Πίνακας 3 – Παράρτημα 1**).

5. 5. Ιστολογική Διερεύνηση Αλλοιώσεων στο Νεφρικό Ιστό

Από την ιστολογική διερεύνηση των δειγμάτων νεφρών 110 ενήλικων προβάτων και αιγών ετοιμάστηκαν και διερευνήθηκαν 263 ιστοτεμάχια (2-3 τεμάχια ανά ζώο). Από τα 110 ζώα που διερευνήθηκαν, τα 29 (26,36%) είχαν ιστολογικά ευρήματα που θεωρούνται συναφή με τη μόλυνση από παθογόνους οροτύπους του γένους *Leptospira* (**Πίνακας 3 – Παράρτημα 1**).

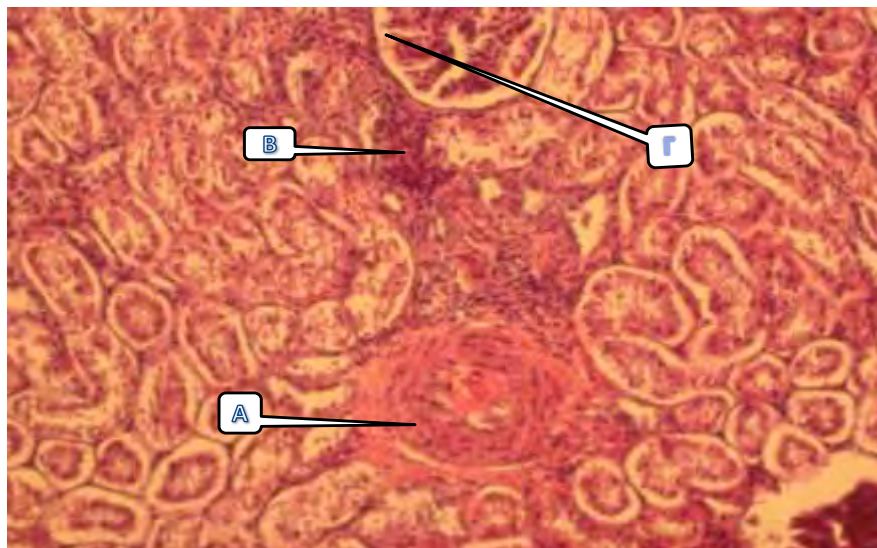
Οι ιστολογικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν δεν ήταν μεμονωμένες για κάθε νεφρό, αλλά συνδυασμοί των κάτωθι:

- ατροφία των νεφρικών σωληναρίων (16 ζώα)

- ήπια σπρισματονεφρίτιδα (17 ζώα),
- λεμφοκυττάρωση – μονοκυτταρική διήθηση (18 ζώα) και
- σοβαρή διάμεση ίνωση (9 ζώα) (Εικόνες 1, 2, 3, 4,)

Από τα 29 δείγματα με ιστολογικές αλλοιώσεις, 11 ήταν επίσης ύποπτα στο kit, 17 (58,6%) ήταν θετικά στη μέθοδο MAT και 21 (72,3%) ήταν θετικά στην PCR. Σε συνδυασμό μεθόδων, πέντε ήταν θετικά στην silver stain και την PCR, 16 ήταν θετικά στην MAT και την PCR και έξι (6) ήταν θετικά στην MAT, το kit και την PCR (Πίνακας 3 – Παράρτημα 1).

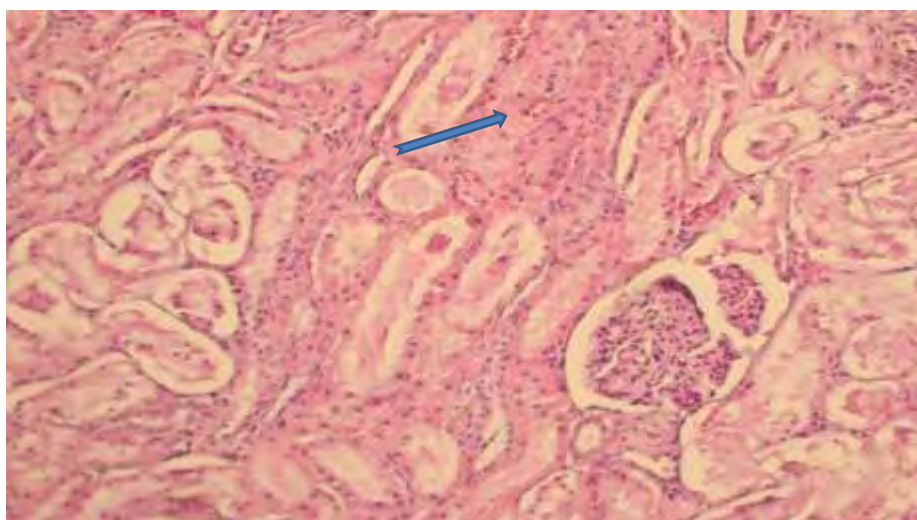
5.5. Εικόνες με ιστολογικές αλλοιώσεις στο Νεφρικό Ιστό



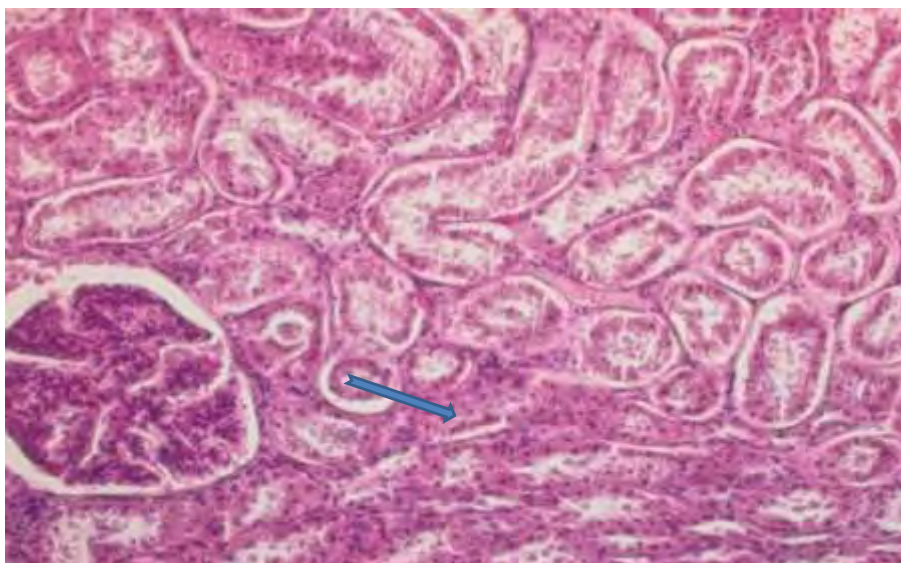
A: Εστίες αγγειίτιδας

B: Λεμφοκυτταρικά διηθήματα και διάμεση ίνωση

Γ: Ατροφία σωληναρίων



Λεμφοκυτταρικά διηθήματα
Μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση



Λεμφοκυτταρική διήθηση και μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση



Σοβαρή διάμεση ίνωση

5.6

Τα ανωτέρω αποτελούν εργασία που έγινε δεκτή προς δημοσίευση με τίτλο :

**Laboratory investigation of adult small ruminant Leptospirosis, a neglected infection in Greece: problems and recommendations
Bisias AG, Kritas CS, Billinis Ch and Burriel RA, 2014
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY**

Laboratory investigation of adult small ruminant Leptospirosis, a neglected infection in Greece: problems and recommendations

Bisias AG (ORCID#0000-0002-6295-4577)¹, Kritas CS (ORCID#0000-0002-3540-9928)², Billinis Ch (ORCID#)¹ and Burriel RA (ORCID# 0000-0002-7801-7625)¹

¹ Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Trikalon 224, Karditsa 43100, Greece, tel/fax +3024410-66088, aburriel@vet.uth.gr, gbisias@yahoo.gr, billinis@vet.uth.gr

² Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, 54124, Greece, tel +302310-999940, skritas@vet.auth.gr

Έγινε αποδεκτή Δεκέμβριος 2014, Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Abstract

Leptospirosis is in Greece a neglected infection. Small ruminants and specifically sheep are accidental hosts of *Leptospira spp*, but they could also be disseminators of pathogenic serovars. Thus, the objective was to investigate leptospirosis of adult small ruminants coming from areas in Southern Greece, where accidental evidence had showed that leptospirosis could be an important infection for man and animals. For this purpose, blood and kidney samples were collected at slaughter from adult females. Collected samples were examined with a commercial serological screening kit, the microagglutination test (MAT), histology and PCR. One hundred ten serum and 110 tissue samples were collected. Of the examined serum samples 55 (50%) were suspect for leptospirosis in the screening kit and 28 (25.45%) were MAT positive. Of the tissue samples 38 (34.5%) were PCR positive and 29 (26.3%) showed various degrees of microscopic kidney lesions. The serovars identified by the MAT were Tarassovi (10 animals), Autumnalis (8 animals), Zannoni (4 animals), Hebdomadis and Javanica (2 each), Bratislava and Hardjo prajitno (one each). The conclusion is that small ruminants and specifically sheep (98 animals) are disseminators of pathogenic *Leptospira spp*. serovars in areas where they predominate and climatic factors favor the survival of the pathogen.

Keywords: histology, leptospirosis, MAT, PCR, small ruminant

Εργαστηριακή διερεύνηση της ελλιπώς μελετημένης στην Ελλάδα λεπτοσπείρωσης των μικρών μηρυκαστικών: προβλήματα και συστάσεις

Μπίσιας ΑΓ¹, Κρήτας ΚΣ², Μπιλλίνης Χ¹ and Μπουριέλ ΡΑ¹

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Τρικάλων 224, Καρδίτσα 43100, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, τηλ/φαξ 24410-66088, aburriel@vet.uth.gr, gbisias@yahoo.gr, billinis@vet.uth.gr

Περίληψη

Η λεπτοσπείρωση στην Ελλάδα είναι μια παραμελημένη μόλυνση. Τα μικρά μηρυκαστικά, ιδιαίτερα τα πρόβατα, αν και θεωρούνται τυχαίοι ξενιστές του γένους *Leptospira*, θα μπορούσαν να γίνουν πηγές διασποράς παθογόνων ορότυπων. Ως εκ τούτου, σκοπός μας ήταν η διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης μικρών μηρυκαστικών σε περιοχές της νότιας Ελλάδας, που προηγούμενα ευρήματα έδειχναν ότι η λεπτοσπείρωση αποτελούσε πιθανή σημαντική λοίμωξη των ζώων και του ανθρώπου. Για το σκοπό αυτό οροί αίματος και νεφροί ενήλικων ζώων συλλέχτηκαν κατά τη σφαγή από θηλυκά ζώα. Εκατόν δέκα δείγματα (ορών και ιστών) διερευνήθηκαν με ένα εμπορικό kit ταχείας οροδιερεύνησης, την μέθοδο της μικροσυγκόλλησης (MAT), ιστολογική εξέταση και PCR. Από τα δείγματα ορών 55 (50%) ήταν ύποπτα λεπτοσπείρωσης στο kit and 28 (25.45%) θετικά στη μέθοδο MAT. Από τα δείγματα ιστών 38 (34.5%) ήταν PCR θετικά and 29 (26.3%) είχαν διάφορους βαθμούς μικροσκοπικών αλλοιώσεων. Οι ορότυποι που αναγνωρίστηκαν με τη μέθοδο MAT ήταν Tarassovi (10 ζώα), Autumnalis (8 ζώα), Zanonii (4 ζώα), Hebdomadis and Javanica (2 στον καθένα), Bratislava and Hardjio prajitno (1 στον καθένα). Συμπεραίνεται ότι τα μικρά μηρυκαστικά και συγκεκριμένα τα πρόβατα (98 από τα 110 ζώα) είναι πηγές διασποράς παθογόνων ορότυπων *Leptospira spp.* Σε περιοχές που οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την επιβίωση του παθογόνου.

Λέξεις κλειδιά: ιστολογία, λεπτοσπείρωση, MAT, μικρά μηρυκαστικά, PCR

Introduction

The systematic investigation of animal leptospirosis across the world depends on each government's ability to finance national disease surveillance. Some nations include leptospirosis in the list of diseases with significance for public health (Biosecurity Australia, 2001; Sambasiva et al., 2003; Jansen et al., 2005; Zhang et al., 2012). Others have yet to recognize its importance and systematically investigate the infection (Hartskeerl et al., 2011). Thus, international knowledge on the spread of leptospirosis and the serovars involved in animal and human infections is contributed by those systematically investigating leptospirosis. They report prevalences from man and animals reaching 90% in tropical regions (Kawaguchi et al., 2008; Zhang et al., 2012).

Greece is not among the states systematically investigating leptospirosis. Thus, there are few published contributions. They are reporting prevalence rates from 5.7 to 24.9%, depending on the clinical history of the examined animals and geographic area of their origin (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003; Bisias et al., 2010).

The reported prevalence values across the world and the predominant serovars are deriving from the use of the microagglutination test (MAT), an internationally recognized serologic method (the gold standard) for investigating animal infections (ILS - WHO, 2003; Levett, 2004; OIE, 2008; Hartskeerl et al., 2011). The method uses live *Leptospira spp* serovars, thus it requires the maintenance of a large set of serovars (over 20) needing weekly subculturing by knowledgeable and dedicated scientists. On addition, a positive result in the MAT does not always associate to active infection, thus examination of paired serum samples is necessary (OIE, 2008). However, the MAT is the best available serologic method for serovar specific information, hence helping to accurately record the predominant serovars in an area or country. This is the reason the method is to this day recognized as the best official method for testing serum from animals and man regardless of stage of infection. What should be noticed, however, is that if a serovar is not included in the set of serovars for testing against it, it will not be recorded as present in an area (Levett, 2004; OIE, 2008; Cerqueria and Picardeau, 2009; Hartskeerl et al., 2011).

Other serologic methods used for investigating leptospirosis lack specificity and sensitivity as to involved serovars (Levett, 2004; OIE, 2008; Cerqueria and Picardeau, 2009) or need animal and serovar specific reagents, which are not commercially available or cannot be easily produced (Croda et al., 2007; Dounngchauwee et al., 2008; Saglam et al., 2008). For the majority of important bacterial infections, isolation and identification of the causative agent is the confirmation and, in most cases, it is quicker than paired serum samples. Unfortunately, this is not the case with *Leptospira spp*. (Levett, 2004; OIE, 2008; Hartskeerl et al., 2011).

Isolation for confirmation of leptospirosis is difficult, time consuming, expensive and requires a well organized reference laboratory (Levett, 2004; OIE, 2008; Hartskeerl et al., 2011). Hence, nations considering the pathogen of secondary public health importance do not finance its systematic study due to costs. Similar difficulties are faced when using methods for indirect recognition of the microorganism's presence in tissue or methods molecularly identifying it in body fluids and tissue samples. Problems result from either lack of commercially available reagents or lack of costly technology (Dounngchauwee et al., 2008; Lilenbaum et al., 2008; Saglam et al., 2008; Lilenbaum et al., 2009).

With these difficulties in mind and lack of state support, the ambitious objective of the present work was to evaluate small ruminant leptospirosis in association to serologic identification of positive animals, kidney lesions and the confirmation of the pathogen's presence in tissue using PCR, staining and isolation.

MATERIAL AND METHODS

Collection of serum and tissue samples

After a preliminary serological investigation of infectious abortion causes in small ruminants (Bisias et al., 2010) in the province of Peloponnesus Southern Greece, two areas were identified as having the highest probability of isolating *Leptospira spp* from small ruminants. Female adults arriving to two slaughter houses of the two selected areas were bled before slaughtering and their kidneys were removed from the carcass by the meat inspectors. Kidneys immediately packed in ice and serum samples were sent in Athens by public transport. As soon samples were received, kidney surface was sterilized by dipping in clinical alcohol, flamed and aseptically dissected. Tissue sections were selected from areas with macroscopic or suspect for microscopic lesions associated to the presence of leptospira microorganisms. Selected tissue sections collected from both kidneys of each animal were divided in three parts. One was immediately prepared for culturing, one was placed in a sterile plastic universal and freezed in -80⁰C and the third was put in 10% formalin solution. All serum samples collected were kept in -80⁰C for later use.

Isolation of *Leptospira spp*

Isolation was attempted and financially supported by the Public Health Veterinary Laboratory of the *Athens School of Hygiene*. The attempted isolation of *Leptospira spp* followed the guide lines of the OIE Terrestrial Manual (2008) using the commercially available culture media Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) (Becton Dickinson Hellas). Selected tissue sections from each animal were aseptically homogenized by stomacher (easymix, AES Laboratories, France). Dilutions up to 1/1000 were prepared and filtered with 0.45 µm filters (Merck, Germany). Two to three drops from each filtered dilution were inoculated into EMJH medium with or without 5-Fluorouracil and incubated at 29+-1⁰ C for up to four months.

Serologic Investigation

One hundred ten serum samples kept in -80°C were split into two aliquots. Two serologic methods were used. Thus, one aliquot was sent for testing by the Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Centre of Athens Veterinary Institutions, Greece. They were tested with a rapid agglutination screening kit (*Leptospira* Serology, BIO-RAD, France) used for screening human sera. Any evidence of agglutination was recorded regardless of the kit's instructions of what is a positive sample. The other aliquot was sent by courier to the National Veterinary Laboratories Agency (NVAL) of the UK. Here the Standard Operating Procedures of the MAT using 19 live serovars belonging to six serogroups was used for testing the mailed 110 serum samples. A positive serum sample agglutinated 50% of the chosen live serovars at a dilution of 1/100.

PCR detection of *Leptospira* spp in tissue

PCR was performed by the Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, according to procedures published by Kwok and Higuchi (1989) and Gravenkamp et al. (1993), with small modifications. Frozen sections were defrosted and small tissue sections (2-3) were removed and prepared for PCR following the protocol for DNA purification from tissue, published by Puregene (Gentra Systems, USA). For the multiplex PCR the commercial kits Puregene (Gentra Systems, Minneapolis Minnesota, USA) and Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used with reagents supplied from the same suppliers. The two pairs of primers used were, pairs G1 5'-ctgaatcgctgtataaaagt-3' / G2 5'-ggaaaacaaatggtcggaag-3' and pairs B64-I 5'-ctgaattcatctcaactc-3' / B64-II 5'-gvagaaatvagatggacgat-3'. They are identifying pathogenic species of *Leptospira*. One hundred ten tissue samples were examined. The positive control was *L. interrogans*, seovar Icterohaemorrhagiae and the negative water with DEPC.

Histological evaluation of Kidney tissue

Two to three tissue blocks from each animal were sectioned for histological examination. A total of 263 blocks were sectioned and stained with hematoxylin –

eosin stains (IVD, Merck, Greece). The staining method was according to the working protocol of Fischer et al., (2008). Kidney sections microscopically having evidence of lesions possibly associated to leptospira microorganisms were prepared for staining by the Steiner Modified Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich, Greece) following the recommended protocol of Newcomer Supply Laboratory, USA.

RESULTS

Isolation

Twenty four kidney tissue samples from 24 animals were cultured. The attempted isolation did not yield any positive results during a four month trial period. Thus, the hosting laboratory withdrew its financial support before the completion of the project.

Serologic Investigation

Fifty five (50%) serum samples showed evidence of agglutination (light diffuse or peripheral partial agglutination) by the rapid screening kit. These samples were characterized only as suspect due to lack of agglutination in the degree suggested by the working protocol of the kit.

Twenty eight (25.45%) serum samples were positive to the MAT (NVLA, UK) at titers of 1/100 to 1/800. Five of them had positive titers to two serovars. Fifteen (53.5%) were also suspect with the commercial rapid kit. The serovars identified by the MAT were Tarassovi (10 animals), Autumnalis (8 animals), Zanoni (4 animals), Hebdomadis and Javanica (2 each), Bratislava and Hardjio prajitno (one each).

PCR detection of *Leptospira spp* in tissue

Thirty eight (34.5%) tissue samples were positive with the multiplex PCR. Of them 23 (60.5%) were also positive with the MAT and 17 (56.6%) were suspect with the rapid screening kit, but only 8 (21%) were positive with all three methods.

Histological evaluation of Kidney tissue

Twenty nine (26.3%) animals showed mixed microscopic evidence of kidney damage ranging from mononuclear interstitial infiltrations (18 animals), interstitial fibrosis (9 animals), mild glomerulonephritis (17 animals) and mild tubular atrophy

(16 animals). Of these animals, 21 (72.3%) had a positive PCR, 17 (58.6%) were from MAT positive animals and 10 (33.3%) had a suspect rapid screening kit. Furthermore, 16 (53.3%) were positive in both the MAT and PCR, but only 6 (20.6%) were positive in all four methods. Five (17.2%) tissue samples of those having histological lesions showed evidence of microorganisms present in tissue sections. Four of them had MAT titers between 1/200 and 1/400 and they were also positive to PCR.

DISCUSSION

Various problems developed during the present investigation due to lack of state supported laboratory facilities to successfully investigate the pathogen. The most important problem faced was the decision of the Public Health Veterinary Laboratory of the Athens School of Hygiene to withdraw its support for isolating the pathogen, due to costs. This decision is evidence of the low National priorities on the zoonotic agent *Leptospira* spp in Greece. Other problems were the complete lack of state support of this research making sampling and sample delivery extremely difficult and time consuming. Thus, the failing of isolating the pathogen could be caused by the time elapsed between tissue collection and attempted isolation, although seven of the 24 animals examined by isolation were PCR positive and four of them were also MAT positive at titers 1/100 and 1/200.

The MAT results showed that leptospirosis was subclinically present, but due to the very small number of goat samples, a comparison between the two species was impossible. Previous reported serologic investigations in Greece showed that the prevalence between sheep and goats not having evidence of clinical disease significantly differs (5.7 Vs 16.2 respectively) (Burriel et al., 2003). However, when serum samples are examined from sheep flocks and goat herds with a history of abortion the reported prevalence is found similar (13.6 vs 12.4 %) (Burriel et al., 2002). In the work preceding the present investigation and examining serum samples from confirmed abortion cases from high risk areas, goats appeared more resistant to infection (18.4%) compared to sheep (24.9%) (Bisias et al., 2010) and this is in agreement with the findings of others (Lilenbaum et al., 2010). Unfortunately, in the current investigation the number of goats was very small for their comparison with sheep.

Significant differences were also observed on the reported serovars between previous investigations in Greece and the present. Previously reported serovars predominant in sheep were Bratislava with Australis second and in goats of equal importance Bratislava and Copenhageni (Burriel et al., 2003). In the report preceding the present and concerning abortion cases (Bisias et al., 2010) significant serovars for sheep were Tarrasovi, Australis and Bratislava and for goats Australis, Tarassovi and Copenhageni. In the present report, the common characteristic of all samples was their origin from high risk areas, thus explaining the observed high proportion (25.4%) of MAT positive animals without any clinical evidence of infection. In addition, the predominant serovars differed from previous investigations (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003), but they were closer to those from the preliminary investigation (Bisias et al., 2010) between abortion cases. They were serovar Tarassovi of the species *L. borgpetersenii* and Autumnalis and Zanoni of the species *L. interrogans* (Sakolvaree et al., 2007; Cerqueria et al., 2010). All three considered pathogenic for man (Biosecurity Australia, 2001).

If past and present results from Greece are compared, when defining the prevalent serovars, it becomes evident, that there is a need for systematically investigating the infection using the MAT. Such knowledge is required for evaluating the need of a vaccination program for small ruminants in high risk areas. Because vaccines confer best protection only to homologous serovars (ILS-WHO, 2003; Wang et al., 2007; Cerqueria and Picardeau, 2009; Hartskeerl et al., 2011), knowledge of the predominant serovars will determine the success of commercially available vaccines.

Nevertheless, a positive MAT does not indicate active infection, thus it requires confirmation with other available methods or means for establishing active infection. One such method is isolation, but due to its time limitations and the time required for examining a second serum sample, various PCR versions have been established for quickly confirming clinical leptospirosis (Gravenkamp et al., 1993; Bomfim and Koury, 2006; Lilenbaum et al., 2008; Lilenbaum et al., 2009). However, comparisons between PCR, culture and serologic results are not always satisfactory (Faber et al., 2000; Soto et al., 2006; Barbante et al., 2014), if infecting serovars are not included in the MAT testing. In such cases, PCR could be positive, but the MAT negative. Thus, the larger the number of serovars included in the MAT the greater

should be its sensitivity and agreement with the results of a PCR.

In the present investigation, from the 38 tissue samples positive with the PCR only 23 were also positive with the MAT. PCR appeared as more sensitive compared to the MAT, as others report (Bomfim and Koury, 2006; Lilenbaum et al., 2008; Barbante et al., 2014), but there is also a possibility that the group of serovars used in the MAT for testing in the UK is not suitable for Greece. Therefore, some MAT negative animals could be positive in serovars not included in the testing panel. Perhaps, a different set of serovars could have shown a better agreement between the two methods and could also have changed the predominant serovars, thus decisions on a vaccine. Another possibility is that PCR false positives were contributing to the observed differences and this could have been clarified with successful isolation, histochemical staining or the visualization of the pathogen in tissue using transmission electron microscopy (Hamir et al., 2001; Szeredi and Haake, 2006; d'Andon et al., 2014). One PCR problem, which is also a problem for other methods used for screening animals or confirming human cases is lack of serovar recognition, which is the major advantage of the MAT method (Levett, 2004; Doungchawee et al., 2008; Saglam et al., 2008; Lilenbaum et al., 2009; Hartskeerl et al., 2011). Until serovar recognition by molecular methods becomes possible, the MAT using a large number of serovars will remain the preferred method for epidemiologically investigating animal leptospirosis.

Of the 29 animals having microscopic evidence of kidney lesions, 21 (72.3%) were also positive in the PCR, an agreement similar to that of the MAT and PCR (60.5%). If the MAT and PCR findings are considered evidence of *Leptospira spp* presence in kidney tissue during the life of the animal, then increased is the possibility that the observed microscopic lesions were caused by the presence of the pathogen. The last is strongly supported by the observations that 16 (55.3%) of those having histological lesions were positive in the MAT and PCR. Experimentally, the same lesions are observed in chronic infection (d'Andon et al., 2014) supporting our present hypothesis, that observed lesions are resulting from the chronic colonization of kidney tissue by leptospira, although it was not confirmed here by isolation or visualization of the pathogen in all the samples. The modified silver staining method was developed many decades ago (Blenden and Goldberg, 1965). Today, it uses commercially

stabilized reagents, but its use in the present work did not show evidence of the pathogen for the majority of the tissue with lesions. Perhaps, the reason of failing to visualize the pathogen was the low numbers of leptospiral cells in the examined tissue or their absence at the time of staining. Accidental hosts of *Leptospira spp.*, like sheep, become chronically infected, but the pathogen is intermittently reaching high numbers in urine, thus tissue (Monahan et al., 2009). In some other cases, the infecting serovar may persist for longer, if it has adapted to its host (Ahmed et al., 2012), thus be visualized by staining. Sheep, considered an accidental host, is, perhaps, eliminating quicker some of the pathogen's serovars.

Nevertheless, the results obtained by this investigation are evidence that sheep (the majority of the sampled animals) are not only accidental hosts of the pathogen. They maintain, in high risk areas, serovars of the pathogen, thus, becoming an important reservoir of serovars potentially pathogenic to man and animals.

REFERENCES

- Ahmed A, Klaasen HLB, van der Veen M, van der Linden H, Goris MGA, Hartskeerl RA (2012) Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of Leptospire in Canine Samples. *Adv Microbiol* 2:162-170
- Barbante P, Shimabukuro FH, Langoni H, Richini-Pereira VB, Lucheis SB (2014) *Leptospira spp.* infection in sheep herds in southeast Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 20(20):1-7, doi: 10.1186/1678-9199-20-20
- Biosecurity Australia. Scientific review of leptospirosis and implications for quarantine policy, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry – Australia
http://www.daff.gov.au/data/assets/pdf_file/0008/23201/2001-23.pdf, 15-7—2014
- Bisias G, Burriel AR, Boutsini S, Kritas S, Leontidis L (2009) A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. *Int J Vet Med* 9(2): 1-7
- Blendon DC, Goldberg HS (1965) Silver impregnation stain for *Leptospira* and flagella. *J. Bacteriol* 89(3):899-900.
- Bomfim MRQ, Koury MC (2006) Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira spp.* in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. *Vet Microb* 118:278-288
- Burriel AR, Magana-Vougiouka O, Boutsini S, Nomikou K, Patakakis M (2002) A serologic investigation of some causes of reproductive failure among small ruminants in Greece. *OJVR* 1:57-63, <http://users.comcen.com.au/~journals/ojb/jvet196a.htm>, 15-7-2014
- Burriel AR, Dalley C, Woodward MJ (2003) Prevalence of *Leptospira* species among farmed and domestic animals in Greece. *Vet Rec* 153:146-148

Cerqueria GM and Picardeau M (2009) A century of *Leptospira* strain typing. *Inf Gen Evol* 9:760–768, doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009

Cerqueira GM, McBride AJA, Queiroz A, Pinto LS, Silva ÉF, Hartskeerl RA, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA (2010) Monitoring *Leptospira* Strain Collections: The Need for Quality Control. *Am J Trop Med Hyg* 82(1):83–87 doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0558

Croda J, Ramos JRG, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, Haake DA, Reis MG, Ko AI (2007) *Leptospira* immunoglobulin like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 45(5): 1528–1534, doi: [10.1128/JCM.02344-06](https://doi.org/10.1128/JCM.02344-06)

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adlers B (2005) Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun* 73(8):4853–4863, doi:[10.1128/IAI.73.8.4853-4863.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4853-4863.2005)

d’Andon MF, Quellard N, Fernandez B, Ratet G, Lacroix – Lamande S, Vandewalle A, Boneca IG (2014) *Leptospira Interogans* induces fibrosis in the mouse kidney through Inos-dependent, TLR – and NLR-independent signaling pathways. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1):e2664, doi:10.1371/journal.pntd.0002664

Doungchawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inwisai T, Sagarasaerane P, Haake DA (2008) Early Diagnosis of Leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. *Clin Vaccine Immunol* 15(3):492–498, doi:10.1128/CVI.00152-07

Faber NA, Crawfords M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH (2000) Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol* 38(7):2731–2733

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2006) Hematoxylin and Eosin staining of tissue and cell sections. Preparation of Cells and Tissue for Fluorescence Microscopy In: (eds: Spector DL, Goldman RD) *Basic Methods in Microscopy*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp. 63–68

Gravenkamp C, Van de Kamp H, Franzen M, Hartskeerl, RA, de Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ (1993) Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 139:1691–1700

Hamir AN, Hanlon CA, Niezgoda M, Rupprecht CE (2001) The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States of America. *Can Vet J* 42(11):869–871

Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA (2011) Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *CI Microbiol Inf* 17:494–501, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x

Jansen A, Schoneberg I, Frank Ch, Alpers K, Schneider T, Stark K (2005) Leptospirosis in Germany, 1962 – 2003. *Emerg Infect Dis* 1048–1054

International Leptospirosis Society, WHO
http://www.leptonet.net/assets/images/LeptoGuidelines_Print_version_19May03.pdf
 14-7-2014

Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, Watanabe H, Aoyama A (2008) Seroprevalence of Leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg* 78(6): 957-961

Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238, doi:10.1038/339237a0

Levett PN (2004) Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin Applied Immunol Rev* 4:435-438, doi: 10.1016/j.cair.2004.08.001

Lilenbaun W, Varges R, Branadao FZ, Cortez A, de Souza SO, Branadao PE, Richtzenbain LJ, Vasconcellos SA (2008) Detection of *Leptospira spp* in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 69:837-832, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.10.027

Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenbain LJ, Vasconcellos SA (2009) Identification of *Leptospira spp.* carriers among seroactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 87:16-19, doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.014

Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2009) Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol* 46:792-9, doi:10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV

Newcomer Supply Laboratory, USA <http://www.newcomersupply.com/documents/staining-kits/Steiner%20Chapman.pdf> , 26-6-2014

OIE Terrestrial Manual (2008) Leptospirosis, 251-263.
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.09.%20Leptospirosis.pdf , 10-5-2014

Saglam YS, Yener Z, Temur A, Yalcin E (2008) Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in case of naturally occurring abortions in Sheep. *Small Rum Res* 74:119-112, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.04.006>

Sakolvaree Y, Maneewatch S, Jiemsup S, Klayasing B, Tongtawe P, Srimanote P, Saengjaruk P, Banyen S, Tapchaisri P, Chonsa-nguan M, Chaicumpa W (2007) Proteome and immunome of pathogenic *Leptospira spp.* revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum. *Asian Pac J Allergy Immunol* 25(1):53-63.

Sambasiva RR, Naveen G, Bhalla P, Agarwal SK (2003) Leptospirosis in India and the rest of the World. *Braz J Infect Dis* 7(3):178-183, doi.org/10.1590/S1413-86702003000300003

Soto FRM, de Azevedo SS, de Moraes ZM, Pinheiro SR, Delbem ÁCIB, Moreno AM, Paixão R, Vuaden ER, Vasconcellos SA (2006) Detection of leptospires in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Braz J Microbiol* 37(4):582-586, doi.org/10.1590/S1517-83822006000400034

Szeredi L, Haake DA (2006) Immunochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. *Vet Pathol* 43:755-761

Wang Z, Jin L, Wegrzyn A (2007) Leptospirosis Vaccines. *Microbial Cell Factories* 6:39, doi:10.1186/1475-2859-6-39, <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/39>, 15-7-2014

Zhang C, Wang H, Yan J (2012) Leptospirosis prevalence in Chinese populations in the last two decades. *Microbes Infect* 14:317-323, doi:10.1016/j.micinf.2011.11.007

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1. Εισαγωγή

Αν και η μελέτη του γένους *Leptospira*, ως αιτίου της σοβαρής ζωνόσου «λεπτοσπείρωσης», αριθμεί περισσότερα από 120 χρόνια, το παθογόνο είναι ακόμη σχεδόν άγνωστο. Οι μελετητές του γένους *Leptospira*, συνεπαρμένοι από την αδιευκρίνιστη ακόμη μοριακή δομή των ειδών και κυρίως από την παρουσία περισσότερων από 270 οροτύπων, έχουν δημιουργήσει διεθνείς οργανισμούς και κοινότητες με αποκλειστικά ερευνητικά ενδιαφέροντα, που αφορούν το παθογόνο (LERG – WHO, 2009; ILS-WHO, 2014).

Πρόσφατα, οι διεθνείς μελετητές του μικροοργανισμού, αδυνατώντας να εκμεταλλευτούν όλες τις δημοσιευμένες πληροφορίες, που αφορούν τη μοριακή του δομή, δημιούργησαν τη LepBank (Eslabao et al., 2010) για συστηματοποίηση της συσσωρευμένης γνώσης. Ελπίζουν δε, ότι μέσα από αυτούς τους διεθνείς οργανισμούς συνεργασίας των 10 -15 τελευταίων ετών, θα απαντηθούν πολλά από τα αναπάντητα ερωτήματα, που αφορούν κυρίως τους μηχανισμούς παθογενετικότητας του μικροοργανισμού.

Είναι κοινώς αποδεκτό, ότι λόγω των δυσκολιών απομόνωσης ή αναγνώρισης του μικροοργανισμού στους ιστούς (Freitas et al., 2004; Harskeerl et al., 2011; Abdollahpour, 2013; ILS-WHO, 2014; Pan Am Heal Org, 2014), οι μελέτες που αφορούν τους μηχανισμούς παθογενετικότητας γίνονται κυρίως **in vitro** (Hamir et al., 2001; Gullen et al., 2005; Subramarian and Sekaran, 2006). Όμως, είναι ακόμη και για αυτές τις μελέτες απαραίτητη η απομόνωση νέων στελεχών, κυρίως από ιστούς που έχουν μικροσκοπικές αλλοιώσεις συναφείς αυτών, που παρατηρούνται στις ελάχιστες **in vivo** μελέτες του παθογόνου (Nally et al., 2007; Adler and Moctezuma, 2010; d'Andon et al., 2014).

Ως συνέπεια, η πρώτη προτεραιότητα της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση του παθογόνου από υλικά ύποπτα μόλυνσης, όπως οι εμβρυϊκοί υμένες και τα εσωτερικά όργανα αποβληθέντων εμβρύων και από ιστούς προτίμησης του παθογόνου, όπως ο νεφρικός ιστός. Για την επιτυχία αυτής της προσπάθειας ήταν απαραίτητες οι εξής προϋποθέσεις:

1. Διαθέσιμος εργαστηριακός χώρος με υποδομές ασφάλειας κατάλληλες για το παθογόνο.

2. Υλικοτεχνική υποστήριξη από τον εμπλεκόμενο φορέα διάθεσης του χώρου ασφάλειας για μεγάλο χρονικό διάστημα, αφού η ανάπτυξη του παθογόνου στο εργαστήριο είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και απαιτητική (ΟΙΕ, 2014).
3. Ανεύρεση ικανοποιητικής οικονομικής ενίσχυσης, ώστε να καλυφθούν τα έξοδα μελέτης των συλλεγμένων δειγμάτων, αφού τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη μελέτη του γένους *Leptospira* είναι ιδιαίτερα ακριβά, εξ αιτίας του γεγονότος ότι διατίθενται μόνο από συγκεκριμένα ανεγνωρισμένα εργαστήρια.
4. Αφοσιωμένοι στη δειγματοληψία συνεργάτες κτηνίατροι, ώστε να εντοπίζονται, να συλλέγονται και να αποστέλλονται στον προορισμό τους έγκαιρα και ορθά προετοιμασμένα τα ύποπτα δείγματα και
5. Κυρίως για την επιτυχία των ανωτέρω και ακριβέστερα του (4), απαιτείτο η προηγούμενη εντόπιση των περιοχών υψηλού κινδύνου και ως εκ τούτου των κοπαδιών με τη μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσης από το γένος *Leptospira*.

Μόνο μέσω αυτής της οργάνωσης της διερεύνησης θα ήταν εφικτή η διασφάλιση της μεγαλύτερης πιθανότητας απομόνωσης του παθογόνου παράγοντα της λεπτοσπείρωσης των μικρών μηρυκαστικών.

Όμως, διαφαίνεται από τα ανωτέρω, ότι για τη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της λεπτοσπείρωσης οι δυσκολίες ήταν πολλές και επηρέαζαν την επιτυχή έκβαση του εγχειρήματος. Μεταξύ των ανωτέρω προϋποθέσεων, καθοριστική ήταν η πέμπτη. Για την εκπλήρωση της προϋπόθεσης αυτής έγινε αρχικά εκτενής ανασκόπηση και δημοσίευση της συναφούς βιβλιογραφίας (Bisias et al., 2010α - **Κεφάλαιο 2**). Αφού εκτιμήθηκαν βιβλιογραφικά οι δυσκολίες και οι ιδιαιτερότητες του νοσήματος σχεδιάστηκε ο τρόπος εντόπισης των περιοχών, όπου υπήρχε η μεγαλύτερη πιθανότητα παρουσίας της λοίμωξης των μικρών μηρυκαστικών.

Η εντόπιση των περιοχών αυτών για τη συλλογή δειγμάτων και την αυξημένη πιθανότητα απομόνωσης του παθογόνου βασίστηκε, πρώτον στις πληροφορίες από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, δεύτερον τις πληροφορίες από την προϋπάρχουσα συνεργασία με το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης και τρίτον στη δυνατότητα επαγγελματικής συνεργασίας με τις κτηνιατρικές υπηρεσίες της Περιφέρειας Πελοποννήσου.

6.2. Εντόπιση περιοχών και κοπαδιών υψηλού κινδύνου για μόλυνση με

Leptospira spp

Οι πληροφορίες, που υπήρχαν από την διαδραστική ιστοσελίδα του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ και το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης έδειχναν ότι τα ποσοστά λοίμωξης από το γένος *Leptospira* ήταν αυξημένα σε διάφορες περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου. Άρα, η ακριβής εντόπιση των καλύτερων περιοχών βασίστηκε στην οροδιερεύνηση της λοίμωξης μεταξύ μικρών μηρυκαστικών της Περιφέρειας Πελοποννήσου. Μετά από συνεννόηση με το Κτηνιατρικό Εργαστήριο Τρίπολης, κάθε ορός αίματος, που έφτανε στο εργαστήριο για τη διερεύνηση του αιτίου περιστατικών αποβολής, χωριζόταν στα δύο και ένα μέρος του αποθηκευόταν στους -80°C για μελλοντική χρήση. Ο στόχος, που είχε τεθεί, ήταν η συλλογή τουλάχιστον 400 ορών αίματος από πραγματικά περιστατικά αποβολών. Ο αριθμός αυτός θεωρήθηκε ικανοποιητικά αντιπροσωπευτικός για μια καλή εικόνα της κατάστασης στην ευρύτερη Περιφέρεια Πελοποννήσου.

Ο περιορισμός της διερεύνησης σε μόνο περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών ήταν αποτέλεσμα προηγούμενων βιβλιογραφικών αναφορών, που αφορούσαν τη Νότια Ελλάδα και έδειχναν ότι οι μεσαίες τιμές των ποσοστών μόλυνσης από περιστατικά αποβολών μικρών μηρυκαστικών ήταν σημαντικά υψηλότερες αυτών από υγιή ζώα (22,4 vs 11%) (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003).

Λόγω του μικρού αριθμού εισροής δειγμάτων, η συλλογή τους διήρκεσε περίπου δύο χρόνια. Τελικά συλλέχθηκαν 463 οροί αίματος, εκ των οποίων 270 (50,9%) ήταν από περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου εκτός του Νομού Αχαΐας. Οι οροί διερευνήθηκαν για τέσσερα διαφορετικά αίτια αποβολών, που συχνότερα διερευνώνται στην Ελλάδα και επιπλέον για τη λεπτοσπείρωση, που δεν διερευνάται στη Ελλάδα ως αίτιο αποβολών των παραγωγικών ζώων (Bisias et al., 2010).

Από τα ευρήματα διαφάνηκε ότι από τα 289 δείγματα προβάτων τα 72 (24,9%) ήταν θετικά στη λεπτοσπείρωση και από τα 174 δείγματα αιγών τα 32 (18,4%) ήταν θετικά. Στο σύνολο των 463 δειγμάτων τα 104 (22,4%) ήταν θετικά στη λεπτοσπείρωση.

Άρα, ορολογικά διαφαίνεται ότι το γένος *Leptospira* είναι ένα πιθανό αίτιο αποβολών μεταξύ μικρών μηρυκαστικών στην Πελοπόννησο. Οι μεσαίες τιμές των

ποσοστών οροθετικότητας μεταξύ αυτών των ειδών παραγωγικών ζώων ήταν συγκρίσιμες με αυτές άλλων ερευνητών (23,5%), που αφορούσαν αποβολές από την ευρύτερη Νότια Ελλάδα (Burriel et al., 2002). Εξαίρεση αποτέλεσαν τέσσερα κοπάδια προβάτων και δύο αιγών της Δυτικής Πελοποννήσου στα οποία παρατηρήθηκε οροθετικότητα μεταξύ 30-35%.

Όμως, η οροθετικότητα σε ένα ή περισσότερους ορότυπους του γένους *Leptospira* δεν επιβεβαιώνει ως αίτιο των αποβολών το μικροοργανισμό, αν δεν γίνει είτε η απομόνωσή του από τα προϊόντα αποβολής είτε η αναγνώρισή του με μοριακές μεθόδους (Lilenbaum et al., 2009; OIE, 2014).

Ένας τρίτος τρόπος επιβεβαίωσης της ενεργούς λοίμωξης είναι η λήψη δεύτερου ορού αίματος από το ίδιο ζώο 15 ημέρες αργότερα και η επανεξέτασή του για τα ίδια παθογόνα αίτια αποβολών με τις ίδιες μεθόδους διερεύνησης (OIE, 2014). Αυτός ήταν στόχος του πρώτου σκοπού της παρούσας μελέτης. Δυστυχώς αυτή η δυνατότητα δεν ήταν εφικτή στην παρούσα διερεύνηση και επομένως ήταν αδύνατη η ανίχνευση του ανερχόμενου τίτλου αντισωμάτων, που θεωρείται επιβεβαιωτική της υποψίας συμμετοχής του παθογόνου στην πρόκληση αποβολής.

Η επιβεβαίωση ενεργούς λοίμωξης από το παθογόνο *Leptospira* θα μπορούσε επίσης να τεκμηριώσει την οικονομική σημασία της λοίμωξης, η οποία είναι απαραίτητη για να πειστούν οι κρατικοί φορείς για τη σημασία του παθογόνου στη ζωική παραγωγή και τη Δημόσια Υγεία (Pan. Am. Heal. Org, 2014; Hartskeerl et al., 2011). Η ανάδειξη της οικονομικής σημασίας της λεπτοσπείρωσης των παραγωγικών ζώων θα μπορούσε να βοηθήσει στην κρατική και ιδιωτική εξεύρεση οικονομικής ενίσχυσης της έρευνας για το παθογόνο, άρα να οδηγήσει στη δημιουργία υλικοτεχνικών υποδομών αναγκαίων για τη μελέτη του γένους *Leptospira* στην Ελλάδα.

Παγκοσμίως η λεπτοσπείρωση θεωρείται ως «νέο-αναδυόμενο» νόσημα (Ko et al., 2009; Bisias et al., 2010; Hartskeerl et al., 2011; Abdollahpour, 2013) με ιδιαίτερη σημασία για τη Δημόσια Υγεία. Για το λόγο αυτό γίνονται διεθνείς προσπάθειες αναγνώρισης των παθογενετικών μηχανισμών της λοίμωξης από σημαντικούς οροτύπους, ώστε να βρεθεί τρόπος παρασκευής αποτελεσματικού εμβολίου προστατευτικού για τα περισσότερα είδη ζώων από όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό οροτύπων (Wang et al., 2007; Thongboonkerd, 2008; Tarhan and Karagoz,

2013). Πιθανώς, η έλλειψη επαρκούς πληροφόρησης για την εμπλοκή του παθογόνου στην μη ικανοποιητική παραγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης και τη Δημόσια Υγεία στην Ελλάδα ήταν και ο λόγος αποχής πηγών χρηματοδότησης από την παρούσα ερευνητική προσπάθεια. Βέβαια η παρούσα διερεύνηση βασίσθηκε σε προηγούμενα δημοσιευμένα δεδομένα (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003), που είχαν δείξει ότι το παθογόνο πιθανότατα εμπλέκεται σε αποβολές μικρών μηρυκαστικών με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγικότητας.

Η συμφωνία των παρόντων ευρημάτων, ως προς τα ποσοστά μόλυνσης προβάτων και αιγών από το μικροοργανισμό, με αυτά προηγούμενων ετών δηλώνει ότι τα μικρά μηρυκαστικά, τα οποία στην εδώ διερεύνηση ήταν στην πλειοψηφία τους πρόβατα, όπως και στις προηγούμενες διερευνήσεις, έχουν σημαντική συμμετοχή και στη διασπορά του παθογόνου στη φύση με τα προϊόντα αποβολής, αφού το παθογόνο ανιχνεύεται στους εμβρυϊκούς υμένες (Vemulapalli et al., 2005; Leon et al., 2006; Szeredi and Haake, 2006; Saglam et al., 2008), αλλά και με το ούρο, αφού αποικεί το νεφρικό ιστό, όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα διερεύνηση.

Χρήσιμο συμπλήρωμα της παρούσας ορολογικής διερεύνησης και επιβεβαιωτικό της υποψίας του αιτίου των αποβολών θα ήταν η συλλογή προϊόντων αποβολής, συμπεριλαμβανομένων των εσωτερικών οργάνων του εμβρύου (Soto et al., 2006), και η ανίχνευση του παθογόνου εργαστηριακά. Δυστυχώς, για μία ακόμη φορά η έλλειψη, κυρίως κρατικής οικονομικής ενίσχυσης, αλλά και χώρου κατάλληλα οργανωμένου για τη μελέτη του παθογόνου, ήταν καθοριστική. Η έλλειψη πηγών χρηματοδότησης για τη συστηματική συλλογή δειγμάτων άφησε τη συλλογή τους στο προσωπικό των κτηνιατρικών υπηρεσιών και των παραγωγών, με αποτέλεσμα να είναι ευκολότερη η αποστολή μόνο δειγμάτων ορού αίματος.

Η συλλογή προϊόντων αποβολής και η απομόνωση του παθογόνου, πέρα από ότι είναι επιβεβαιωτική της μόλυνσης, δίνει τη δυνατότητα συγκριτικής μελέτης **in vitro** των απομονωμένων στελεχών *Leptospira*. Η επιτυχία απομόνωσης ήταν ιδιαίτερα απαραίτητη για την ολοκληρωμένη μελέτη της παθογενετικότητας της λοίμωξης των μικρών μηρυκαστικών στην Ελλάδα, αλλά ανέφικτη, αφού δεν παρατάθηκε η διαθέσιμη κρατική εργαστήριο-οικονομική βοήθεια, που αρχικά μας είχε δοθεί. Η διακοπή αυτών των πολύ αναγκαίων υποδομών, λόγω αποτυχίας απομόνωσης του παθογόνου εντός των πρώτων τεσσάρων μηνών, δείχνει πόσο

άγνωστος είναι ο μικροοργανισμός και οι ιδιότητές του μεταξύ των Ελλήνων κτηνιάτρων και Εθνικών Φορέων παρακολούθησης λοιμωδών νοσημάτων. Δείχνει επίσης το μέγεθος της παραμέλησης των επιπτώσεων της λεπτοσπείρωσης των παραγωγικών ζώων στην οικονομία και τη Δημόσια Υγεία.

Μια μικρή ένδειξη της σημασίας της λεπτοσπείρωσης των παραγωγικών ζώων δείχνει ο σημαντικά υψηλός μέσος όρος οροθετικότητας στο παθογόνο μεταξύ περιστατικών αποβολών μικρών μηρυκαστικών (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**), όπως συγκρίνεται με αυτή από μικρά μηρυκαστικά χωρίς τέτοια προβλήματα προηγούμενων ετών (Burriel et al., 2003) (22,4 vs 11%), από συγκρίσιμες περιοχές. Αυτή η οροθετικότητα αναδεικνύει τη σημασία του παθογόνου και την πιθανή εμπλοκή του στην παθογένεια προβλημάτων υγείας των παραγωγικών ζώων οικονομικής σημασίας. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την υψηλή οροθετικότητα (25,45%), που παρατηρήθηκε με τη διερεύνηση του παθογόνου στο σφαγείο. Αν και τα δείγματα ορών στο σφαγείο δεν είχαν προέλθει από περιστατικά αποβολών, η οροθετικότητα ήταν περίπου ίδια με αυτή των αποβολών προβάτων της προηγούμενης οροδιερεύνησης. Αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού η διερεύνηση έγινε σε προεπιλεγμένες περιοχές, στις οποίες τα πρόβατα και οι αίγες εμφάνιζαν υψηλή οροθετικότητα (περίπου 35%) (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**). Οι κλιματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες προφανώς συντηρούσαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα το μικροοργανισμό.

Η ολοκληρωμένη μελέτη της παθογενετικότητας της λοίμωξης των μικρών μηρυκαστικών και άλλων ζώων και του αποτελέσματός της απαιτεί κρατική συστηματική διερεύνηση του παθογόνου, όταν πρόκειται για αποβολές και θνησιγεννήσεις, ως ελάχιστη συνεισφορά για ορθολογική εκτίμηση της οικονομικής σημασίας της λεπτοσπείρωσης. Αν και δεν κατέστη δυνατή η συλλογή και διερεύνηση του παθογόνου παράγοντα σε προϊόντα αποβολής, λόγω έλλειψης υλικοτεχνικών υποδομών, η οροδιερεύνηση ανέδειξε την εμπλοκή του παθογόνου στα μικρά μηρυκαστικά. Επίσης ανέδειξε τις περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου με αυξημένη οροθετικότητα και υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, άρα και αυξημένη πιθανότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού. Αυτές οι περιοχές ταυτίζονται με αυτές που αναφέρονται από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ ως περιοχές υψηλού κινδύνου.

Τα δείγματα ορών από περιστατικά αποβολών, που διερευνήθηκαν, είχαν προέλθει από 37 κοπάδια προβάτων και 18 κοπάδια αιγών (Bisias et al., 2010β – **Κεφ'αλαιο 3**). Από αυτά, τέσσερα κοπάδια προβάτων και δύο αιγών με τίτλους στη λεπτοσπείρωση πάνω από 1/800 βρίσκονταν σε δύο συγκεκριμένες περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου. Σύμφωνα με τις δημοσιεύστες πληροφορίες των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, από τις ίδιες, αλλά και παρακείμενες περιοχές, δηλώνονταν συχνότερα μεταξύ μικρών μηρυκαστικών κλινικά περιστατικά με τυπική εικόνα λεπτοσπείρωσης. Άρα, ο αρχικός σκοπός της ορολογικής διερεύνησης, που ήταν η εντόπιση περιοχών υψηλού κινδύνου, έδειξε θετικά ευρήματα. Οι δε περιοχές, που εντοπίστηκαν, καθορίστηκαν ως περιοχές μελέτης της λεπτοσπείρωσης των μικρών μηρυκαστικών.

6. 3. Μελέτη της Παθογενετικότητας της Λοίμωξης των Μικρών Μηρυκαστικών από το γένος *Leptospira*

Η εξειδίκευση της μελέτης της λοίμωξης των μικρών μηρυκαστικών από το γένος *Leptospira* απαιτούσε:

1. Τη συλλογή παθολογικών δειγμάτων από ιστούς, που είτε μολύνονται από το παθογόνο κατά την εξέλιξη της λοίμωξης, όπως η εγκυμονούσα μήτρα (Vemulapalli et al., 2005; Leon et al., 2006; Szeredi and Haake, 2006; Saglam et al., 2008), είτε αποτελούν τους ιστούς προτίμησης και μακροχρόνιας εγκατάστασης του παθογόνου, όπως είναι ο νεφρικός ιστός (Hamir et al., 2001; Bomfim and Koury, 2006; Fornazari et al., 2012).
2. Την απομόνωση του παθογόνου από τα παθολογικά και άλλα υλικά του ιδίου ζώου, ώστε να διερευνηθούν **in vitro** χαρακτηριστικά του, που θα ερμηνεύονταν έστω και υποθετικά, λόγω έλλειψης δυνατότητας **in vivo** μελέτης, τις παρατηρούμενες ιστικές αλλοιώσεις (Vinh et al., 1984; Turhan and Karagoz, 2013; Lehmann et al., 2014).
3. Στην περίπτωση αδυναμίας απομόνωσης του παθογόνου, λόγω των δυσκολιών, που αντιμετωπίζουν ακόμη και έμπειροι ερευνητές οργανωμένων εργαστηρίων (Hartskeerl et al., 2011; OIE, 2014), απαιτούσε την επιλογή έμμεσου τρόπου σύνδεσης της παθογένειας στελεχών του μικροοργανισμού με τις παρατηρούμενες αλλοιώσεις σε επιλεγμένους ιστούς (Nascimento et al., 2004; Palaniappan et al., 2005; Nally et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Fornazari et al., 2012) και

4. Την εξασφάλιση συλλογής των καταλληλότερων δειγμάτων για την επιτυχή έκβαση των ανωτέρω (1-3)

Η ορολογική διερεύνηση για την εντόπιση των περιοχών αυξημένου κινδύνου, ώστε να εξασφαλιστεί η δυνατότητα μελέτης του παθογόνου, αν και ήταν εκτενής, ήταν εφικτή μόνο με τη μεγάλη συμβολή και προσωπική εργασία συναδέλφων κτηνιάτρων των περιφερικών κτηνιατρικών υπηρεσιών. Η εργαστηριακή διερεύνηση και η εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων ήταν αποτέλεσμα της μεγάλης οικονομικής και τεχνικής υποστήριξης των Βρετανικών Κτηνιατρικών Εργαστηρίων (VLA).

Άρα, διαφάνηκε αρκετά νωρίς ότι το παθογόνο ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να απομονωθεί χωρίς το κατάλληλο εργαστήριο και κυρίως χωρίς γενναία χρηματοδότηση. Τα παραπάνω αποτέλεσαν τα δύο κρίσιμα σημεία καθορισμού της επιτυχίας που αφορούσε την ορολογική διερεύνηση και της αποτυχίας του σκοπού της απομόνωσης του μικροοργανισμού. Δηλαδή, οι δυσκολίες που διαφάνηκαν ακόμη και από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και διερευνήθηκαν στην πορεία της πρώτης φάσης της παρούσας μελέτης, η οποία εξ αρχής σχεδιάστηκε εν γνώσει των εν λόγω δυσκολιών, επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω κατά την προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου από τους ιστούς επιλογής του.

6.4. Συλλογή Νεφρικού Ιστού και Απομόνωση του Παθογόνου

Μετά από συνεκτίμηση των πρακτικών προβλημάτων, που εμφανίστηκαν για τη συλλογή προϊόντων αποβολής, η συνέχιση της ερευνητικής προσπάθειας περιορίστηκε στη συλλογή ορών αίματος και νεφρικού ιστού από το ίδιο ενήλικο θηλυκό ζώο στο σφαγείο. Άρα, αποκλείστηκε η μελέτη ύποπτων κλινικών περιστατικών. Τα ζώα από τα οποία έγιναν δειγματοληψίες ήταν μεταξύ 4 και 7 ετών και κλινικά υγιή, διότι μόνο υγιή ζώα έφταναν στο σφαγείο. Όπως άλλοι ερευνητές ανακοινώνουν (Hartskeerl et al., 2011; Wunthiekanum et al., 2013; OIE, 2014), η προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου ήταν ιδιαίτερα δύσκολη, χρονοβόρα και οικονομικά ανέφικτη χωρίς κρατική ή άλλη επιχορήγηση. Για αυτό και εγκαταλείφτηκε μετά από τετράμηνη περίπου προσπάθεια. Η μη απομόνωση του παθογόνου από το νεφρικό ιστό μπορούσε να ήταν αποτέλεσμα

1. της απειρίας των ερευνητών (OIE, 2014),

2. των εργαστηριακών αντιδραστηρίων, του τρόπου ανασύστασης των απαραίτητων θεραπευτικών υποστρωμάτων και αντιβιοτικών και του περιβάλλοντος ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Wunthiekanum et al., 2013) και
3. της μη παρουσίας του παθογόνου στους φαινομενικά υγιείς ιστούς (Soto et al., 2006; Langoni et al., 2007; Lilenbaum et al., 2008), αφού τα δείγματα δεν ήταν από παθολογικό υλικό με υποψία παρουσίας του παθογόνου, όπως τα προϊόντα αποβολών (Vemulapalli et al., 2005; Leon et al., 2006; Saglam et al., 2008).

Μετά την αποτυχία απομόνωσης του παθογόνου αποκλείστηκε η δυνατότητα εργαστηριακής συγκριτικής μελέτης κάποιων μηχανισμών παθογένειας μεταξύ ελληνικών στελεχών, όπως γίνεται με όλα τα παθογόνα βακτήρια (Ballard et al., 1986; Kazuyo et al., 1993; Zhong et al., 2011; Lehmann et al., 2013). Για να συνδεθεί ένα απομονωμένο στέλεχος οροτύπου με κλινικά ή ιστολογικά ευρήματα απαιτείται είτε η πειραματική αναπαραγωγή των ευρημάτων είτε η μελέτη μηχανισμών παθογένειας του οροτύπου, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τις παρατηρούμενες ιστολογικές αλλοιώσεις (Gebriel et al., 2006; Murray et al., 2009; Caimaro et al., 2014).

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα παθογόνα στελέχη προσαρμόζονται στο βιολογικό περιβάλλον του ζώου κατά την εξέλιξη της μόλυνσης (Nally et al., 2007). Η εργαστηριακή μελέτη οροτύπων του παθογόνου εντοπίζει την ικανότητα προσαρμογής του μικροοργανισμού στη δομή των πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών του κυτταρικού του τοιχώματος (Barocchi et al., 2002; Nally et al., 2007). Όμως, οι δυσκολίες απομόνωσης του παθογόνου από δείγματα ύποπτα λεπτοσπείρωσης περιορίζουν την εργαστηριακή και πειραματική σύγκριση στελεχών εντός των οροτύπων (ILS-WHO, 2001; Nascimento et al., 2004; De Faria et al., 2007; He et al., 2007; Palaniappan et al., 2007; Barbosa et al., 2009; Choy, 2012).

Αυτές οι δυσκολίες και η πρόσφατη προσπάθεια συγκέντρωσης της γνώσης, ως προς τη μοριακή δομή του παθογόνου (Eslabao et al., 2010), δεν έχουν ακόμη καταλήξει σε ευκολόχρηστες τεχνολογικές δυνατότητες συστηματικής μελέτης των μηχανισμών παθογένειας των απομονωμένων ή μη στελεχών του γένους *Leptospira*. Η παρούσα προσπάθεια θα είχε προσφέρει την ευκαιρία δημιουργίας διεθνών συνεργασιών ελληνικών ομάδων διερεύνησης της λεπτοσπείρωσης των ζώων, αν ήταν επιτυχής η απομόνωση. Αν και αυτή η αδυναμία ήταν καθοριστική, δεν ήταν πλήρως αποτρεπτική για τη συνέχιση της προσπάθειας, αφού τέτοιες δυσκολίες μελέτης της

παθογένειας του μικροοργανισμού αφορούν ακόμη και τα οργανωμένα εργαστήρια με πολύ έμπειρο ερευνητικό προσωπικό.

Βέβαια, η αποτυχία απομόνωσης του παθογόνου απέκλεισε ακόμη και την εφικτή εργαστηριακή μελέτη και σύγκριση οροτύπων, ως προς κάποιους μηχανισμούς παθογένειας, όπως είναι η παραγωγή ή μη αιμολυσινών (Stamm and Charon 1979), η ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά (Wuthiekanum et al., 2013), η **in vitro** προσκόλληση των λεπτοσπειρών σε κύτταρα των διερευνούμενων ειδών ζώων (Vinh et al., 1984), ο χημειοτακτισμός τους ως προς συστατικά του αίματος (Kazuho et al., 1993), ακόμη και η ανάπτυξη αυτών των οροτύπων στα διάφορα σωματικά υγρά των ζώων ξενιστών τους (Schreier et al., 2009). Κάποια από τα ανωτέρω ήταν στόχος μελέτης της παρούσας προσπάθειας σε σύγκριση με τις παρατηρούμενες κλινικές ή άλλες βλάβες στα μικρά μηρυκαστικά. Όμως, αν και η απομόνωση απέτυχε, η συνέχιση της παρούσας προσπάθειας βοήθησε ώστε,

1. να αναγνωριστούν οι δυσκολίες που υπάρχουν στην Ελλάδα για τη συστηματική μελέτη του σημαντικού αυτού παθογόνου, αφού φαίνεται από τα καταγεγραμμένα ευρήματα του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, ότι η λεπτοσπείρωση του ανθρώπου στην Ελλάδα δείχνει αυξητική τάση. Μάλιστα αυξάνονται οι αναφορές στο νόσημα, ενώ δημοσιοποιούνται κλινικά ευρήματα πέραν των τυπικών (Antoniadis et al., 1995; Sion et al., 2002; Pappas et al., 2008; Papa et al., 2009; Jelastopulu et al., 2010; Assimakopoulos et al., 2012) και
2. να προστεθούν νεότερα επιδημιολογικά ευρήματα, ως προς τους σημαντικότερους οροτύπους των παραγωγικών ζώων σε περιοχές ανεγνωρισμένες από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ ως υψηλού κινδύνου. Η αναγνώριση των ορότυπων Tarassovi και Zanonι μεταξύ των συχνότερων σε αυτές της περιοχές, διαφέρει από την αναγνώριση συχνότερων ορότυπων από άλλες περιοχές και προγενέστερες διερευνήσεις (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003). Οι δύο αυτοί ορότυποι θεωρούνται ιδιαίτερα παθογόνοι για τον άνθρωπο σε χώρες όπου, πρώτον διερευνούν συστηματικά τη λεπτοσπείρωση και δεύτερον τα κύρια παραγωγικά τους ζώα είναι τα μικρά μηρυκαστικά (Biosecurity Australia, 2001; Agampodi et al., 2008; Slack et al., 2008; Scott et al., 2013).

Αυτή εδώ είναι, εξ όσων γνωρίζουμε, η πρώτη μελέτη των πιθανών ιστικών αλλοιώσεων, που προκαλούν ορότυποι των μικρών μηρυκαστικών, που απαντώνται σε περιοχές υψηλού κινδύνου στην Ελλάδα. Η εκτεταμένη βιβλιογραφική συσχέτιση

των μικροσκοπικών ιστολογικών αλλοιώσεων, που παρατηρήθηκαν, με αναγνωρισμένους μηχανισμούς παθογένειας των οροτύπων, που αναγνωρίστηκαν με το είδος του ζώου και με τη σημασία τους στη Δημόσια Υγεία, βοηθάει όσους αποφασίσουν να συνεχίσουν την προσπάθεια οργάνωσης της μελέτης του παθογόνου στην Ελλάδα.

6. 5. Σημασία της οροδιερεύνησης σε περιοχές υψηλού κινδύνου κατά τη σφαγή

Αν και τα δείγματα ορών, που διερευνήθηκαν, προήλθαν από φαινομενικά υγιή ενήλικα θηλυκά, κυρίως πρόβατα (98 από τα 110), η υψηλή οροθετικότητα στη μέθοδο MAT (25,45%) δείχνει ότι το γένος *Leptospira* είναι σημαντικό παθογόνο στα μικρά μηρυκαστικά. Άρα, όπως φάνηκε και στην προδιερεύνηση, το γένος *Leptospira* εμπλέκεται στην παθογένεια νοσημάτων των μικρών μηρυκαστικών, που επηρεάζουν την παραγωγικότητα, όπως είναι οι αποβολές και η γέννηση εξασθενημένων νεογνών. Τέτοια προβλήματα αναφέρονται για πολλές συνεχόμενες δεκαετίες από πολλές χώρες, που έχουν σημαντική παραγωγή προϊόντων από μικρά μηρυκαστικά (Kingscote, 1985; Kirkbird and Johnson, 1989; Ellis, 1994; Lilenbaum et al., 2008; Dorjee et al., 2009; Lilenbaum et al., 2009; Ciceroni et al., 2000; da Silva et al., 2012). Άρα, αυτές είναι οι χώρες, που συστηματικά διερευνούν τα αίτια προβλημάτων αναπαραγωγής και τις επιπτώσεις τους στην οικονομία και τη Δημόσια Υγεία. Επίσης προτείνουν και τα οικονομικότερα μέτρα μείωσης των επιπτώσεων από λοιμογόνους οροτύπους στην παραγωγικότητα μεταξύ των οποίων είναι και τα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια.

Στην Ελλάδα, τα ποσοστά οροθετικότητας στη *Leptospira* στις περιοχές υψηλού κινδύνου είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά υγιών μικρών μηρυκαστικών άλλων περιοχών της χώρας, όπου ο μέσος όρος, που έχει ανακοινωθεί, είναι κοντά στο 11% (Burriel et al., 2003). Η παρατηρούμενη διαφορά ήταν αναμενόμενη, αφού οι περιοχές της παρούσας μελέτης προεπιλέχθηκαν λόγω του υψηλού κινδύνου για μόλυνση από τη λεπτόσπειρα.

Θα είχε ιδιαίτερη οικονομική σημασία, αν στις ίδιες αυτές περιοχές υπήρχε δυνατότητα, διερεύνησης της ύπαρξης του παθογόνου, πέραν της προσπάθειας απομόνωσης του, με μεθόδους ανίχνευσής του στους εμβρυϊκούς υμένες και τα εσωτερικά όργανα αποβληθέντων εμβρύων σε συνδυασμό με την οροδιερεύνηση

(Vemulapalli et al., 2005; Soto et al., 2006; Saglam et al., 2008; Leon et al., 2006; Szeredi and Haake, 2006).

Όμως, αν και τέτοια δείγματα αναζητήθηκαν αρχικά, δεν ήταν δυνατόν να συγκεντρωθούν, αφού έπρεπε οι κρατικές υπηρεσίες και οι παραγωγοί να συνεργαστούν στη συλλογή και ποιοτική συντήρηση τους ή να έχει υπάρξει πηγή χρηματοδότησης για εναλλακτική λύση. Ο συσχετισμός της οροθετικότητας με την παρουσία του γένους *Leptospira* στα εκκρίματα και απεκκρίματα του γεννητικού συστήματος οροθετικών μικρών μηρυκαστικών και τους ιστούς της εγκυμονούσας μήτρας, θα έδειχνε και την έκταση του προβλήματος, ως προς την οικονομική του σημασία. Για τους λόγους αυτούς, θα πρέπει να αποτελέσει αυτή η διερεύνηση στόχο μελλοντικών ερευνητικών προσπαθειών.

Το εγχείρημα καθορισμού της οικονομικής σημασίας της λεπτοσπείρωσης στα μικρά μηρυκαστικά απαιτεί όχι μόνο την αναγνώριση της ύπαρξης του παθογόνου, αλλά και τη διερεύνηση του ρόλου άλλων παθογόνων με την ίδια κλινική εικόνα, όπως είναι τα γένη *Brucella*, *Chlamydophila*, *Coxiella* και το πρωτόζωο *Toxoplasma*. Τα παθογόνα αυτά και κυρίως το γένος *Brucella* διερευνώνται συστηματικά από της Ελληνικές κρατικές κτηνιατρικές υπηρεσίες, κάτι που δεν γίνεται με το γένος *Leptospira*.

Άρα, μεταξύ των παθογόνων, που αναγνωρίζονται στην Ελλάδα ως κύρια αίτια προβλημάτων αναπαραγωγής με σημασία στη Δημόσια Υγεία δεν είναι η λεπτοσπείρωση των ζώων γενικώς. Όμως, τα εδώ ευρήματα, όπως και προηγούμενα (Burriel et al., 2002), δείχνουν ότι επιβάλλεται πλέον να συμπεριλαμβάνεται το γένος *Leptospira* στα διερευνούμενα αίτια αποβολών.

Από την προεργασία, που έγινε και αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής, φάνηκε ότι το γένος *Leptospira* ήταν τρίτο μεταξύ των πέντε αιτίων αποβολών, που ορολογικά διερευνήθηκαν (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**). Μεταξύ δε των πέντε, θα πρέπει να αναγνωριστεί, βάσει της σημασίας του στη Δημόσια Υγεία, ίσης σημασίας με το γένος *Brucella*, που θεωρείται ως το σημαντικότερο, αν και η λεπτοσπείρωση καταλήγει συχνά στο θάνατο κάτι που δεν γίνεται με τα άλλα προς διερεύνηση παθογόνα και κυρίως την *Brucella* (Minas et al., 2007; Antoniou et al., 1995; Antoniou et al., 2002; Hadjichristodoulou et al., 1999).

Στα παραγωγικά ζώα η διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης έχει συμπεριληφθεί μόνο σε περιπτώσεις ατομικών ερευνητικών και όχι διαγνωστικών προσπαθειών (Sarris et al., 1987; Burriel et al., 2002; Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**). Πέραν τούτου, οι ερευνητικές αυτές προσπάθειες δεν έχουν τύχει του ενδιαφέροντος της πολιτείας για συστηματικότερη διερεύνηση του παθογόνου.

Από αυτές τις ελάχιστες προσπάθειες διαφάνηκαν, εκτός από τη συμμετοχή του παθογόνου σε πιθανά προβλήματα αναπαραγωγής και οι σημαντικότεροι ορότυποι στις περιοχές διερεύνησης. Σε προηγούμενες διερευνήσεις συχνότεροι ορότυποι ήταν οι Bratislava, Australis και Copenhageni (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003). Στην παρούσα διατριβή σημαντικότεροι ορότυποι περιστατικών αποβολής στην ευρύτερη περιφέρεια Πελοποννήσου ήταν μεταξύ των προβάτων οι Tarassovi και Australis και μεταξύ των αιγών οι Tarassovi και Copenhageni (Bisias et al., 2010β). Ο ορότυπος Tarassovi, που φάνηκε σημαντικός σε αυτή την οροδιερεύνηση δεν είχε αναγνωριστεί τα προηγούμενα χρόνια σε προσπάθεια οροδιερεύνησης της μόλυνσης από άλλες περιοχές και άλλους ερευνητές (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003).

Στην αναγνωρισμένη περιοχή υψηλού κινδύνου με ζώα κατά τη σφαγή σημαντικότεροι ορότυποι αναδείχθηκαν οι Tarassovi (10 δείγματα), Autumnalis (10 δείγματα), Zanoni (6 δείγματα), Hebdomadis και Javanica (από 2 δείγματα) και Bratislava και Hardjio prajintno (από 1 δείγμα).

Οι ανωτέρω, αναγνωρισμένοι ως συχνότερα απαντώμενοι ορότυποι στην Ελλάδα, είναι μεταξύ αυτών που απομονώνονται ή αναγνωρίζονται παγκοσμίως ως σημαντικοί στον άνθρωπο (Ratman et al., 1983; Cinco et al., 1989; Everard et al., 1995; Travejo et al., 1998; Campagnolo et al., 2000; Koteeswaran, 2006; Yanagihara et al., 2007). Στις περισσότερες περιπτώσεις αφορούν συνήθως άτομα, που έρχονται σε επαφή με παραγωγικά ζώα, τα οποία θεωρούνται φυσικές πηγές αυτών των οροτύπων. Βέβαια είναι παραδεκτό ότι η μέθοδος MAT δεν αναγνωρίζει, κυρίως στην ενδημική μόλυνση, όπως στις παρούσες περιοχές, με ασφάλεια τον ορότυπο, που προκαλεί την κλινική νόσο στο ζώο (Levett, 2003; Smythe et al., 2009). Άρα, απαιτείται και συσχετισμός της νόσου με τον παθογόνο ορότυπο.

Τα αντισώματα που ανιχνεύονται με την MAT αναπτύσσονται μετά την οξεία φάση. Δηλαδή είναι κυρίως αντισώματα IgG, ενώ δεν υπάρχουν τρόποι ορολογικής

διερεύνησης των IgM αντισωμάτων για κάθε ορότυπο ξεχωριστά (Bercovich et al., 1990; Cumberland et al., 2001).

Η ειδικότητα της MAT μεθόδου στον άνθρωπο συγκρινόμενη με την απομόνωση είναι ιδιαίτερα χαμηλή (Levett, 2003), όμως η απομόνωση του παθογόνου στον άνθρωπο και τα ζώα είναι ιδιαίτερα δύσκολη (Levett and Haake, 2010; Harskeerl et al., 2011; OIE, 2014). Ως εκ τούτου η μέθοδος MAT παραμένει ως σήμερα η μέθοδος επιλογής για οροδιερεύνηση των εμπλεκόμενων οροτύπων σε υποψία λεπτοσπείρωσης.

Υπάρχουν επίσης περιορισμένες μελέτες πειραματικής σύγκρισης της μεθόδου με την παρουσία του παθογόνου ή το χρόνο ανάπτυξης των ανιχνεύσιμων αντισωμάτων για κάθε ορότυπο, αφού είναι πολλοί και όχι καλά μελετημένοι, ως προς την παθογενετικότητά τους (Cumberland et al., 2001). Η αξιοπιστία της μεθόδου αυξάνει, όπως και η διαγνωστική της αξία, όταν εκτελείται από εργαστήρια με καλά εκπαιδευμένο προσωπικό για την εκτέλεσή της (Chappel et al., 2004). Επίσης η διαγνωστική αξιοπιστία της αυξάνει με τη χρήση διπλών ορών και την ανίχνευση της ανόδου του τίτλου αντισωμάτων (Dutta and Cristopher, 2005). Σε τέτοιες περιπτώσεις γίνεται διαπίστωση και της ενεργού λοίμωξης, αλλά και του πιθανότερου οροτύπου, που την προκαλεί, με την προϋπόθεση ότι αυτός συμπεριλαμβάνεται στο σετ των προς διερεύνηση οροτύπων (ILS – WHO, 2002; Abdollahpour, 2013).

Στην προκαταρκτική οροδιερεύνηση της παρούσας διατριβής (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**) δεν υπήρξε δυνατότητα συλλογής δεύτερου ορού αίματος από το ίδιο ζώο, ενώ στην δεύτερη οροδιερεύνηση (διερεύνηση στο σφαγείο) τα ζώα ήταν κλινικά υγιή και η δειγματοληψία γινόταν προ της σφαγής.

Τα προβλήματα ταχείας οροδιερεύνησης στον άνθρωπο (οξεία φάση) και επιβεβαίωσης της κλινικής υποψίας έχουν αντιμετωπιστεί με την ανάπτυξη άλλων αξιόπιστων μεθόδων οροδιερεύνησης. Οι μέθοδοι αυτές βελτιώνονται συνεχώς ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα τους, αλλά δεν έχουν επιδημιολογική εφαρμογή, αφού δεν αναγνωρίζουν τους οροτύπους (Flannery et al., 2001; Effler et al., 2002; Ooteman et al., 2006; Neves et al., 2007).

Επίσης, αυτές οι μέθοδοι δεν προσαρμόζονται εύκολα για οροδιερεύνηση στα ζώα, αφού απαιτούν αντιδραστήρια εξειδικευμένα για κάθε είδος ζώου, κάτι που δεν δικαιολογεί το κόστος, αφού στα ζώα χρησιμότερη είναι η αναγνώριση του

εμπλεκόμενου οροτύπου (Bercovich et al., 1990; Bomfim et al., 2005; Marivya et al., 2006; OIE, 2014).

Προφανώς η χαμηλή συσχέτιση του Kit ταχείας συγκόλλησης, που χρησιμοποιήθηκε εδώ, με τις άλλες μεθόδους διερεύνησης της λοίμωξης, οφείλεται στο ότι έχει παρασκευαστεί για χρήση στον άνθρωπο. Αν, είχαν αυστηρά ακολουθηθεί οι οδηγίες ερμηνείας του, ως προς το τι είναι θετικό αποτέλεσμα συγκρινόμενο με το θετικό του μάρτυρα, τότε κανένα δείγμα ορού δεν θα ήταν ούτε καν ύποπτο. Επομένως, το kit δεν συνίσταται ως μέθοδος προδιερεύνησης της λεπτοσπείρωσης των ζώων. Δηλαδή ως μέθοδος που μπορεί να μειώσει τον προς διερεύνηση αριθμό δειγμάτων με την ακριβότερη και πολύ δυσκολότερη μέθοδο MAT.

Από τα προβλήματα αυτά της οροδιερεύνησης της λοίμωξης στα ζώα με μεθόδους άλλες της MAT, κυρίως η μη αναγνώριση των οροτύπων μέσω αυτών, κάνει την MAT μέθοδο επιλογής της οροδιερεύνησης των ζώων. Η μέθοδος MAT, ανεξάρτητα από τα προβλήματά της και την ταχεία ανάπτυξη μοριακών μεθόδων, παραμένει η μέθοδος επιλογής (gold standard) (OIE, 2014), διότι η αναγνώριση των σημαντικότερων οροτύπων των ζώων σε μια χώρα, περιοχή ή εκτροφή βοηθάει στην οικονομική εκτίμηση της σημασίας του αναγνωρισμένου οροτύπου και στην επιλογή του κατάλληλου εμβολιακού τρόπου προφύλαξης των ζώων.

Δυστυχώς, η μέθοδος MAT δεν επιβεβαιώνει την ενεργή λοίμωξη χωρίς τη χρήση διπλών ορών, όπως επίσης δεν επιβεβαιώνει κατά τη στιγμή της οροδιερεύνησης ότι ο αναγνωρισμένος ορότυπος εξακολουθεί να μολύνει το ζώο. Ως εκ τούτου, εάν δεν είναι εφικτή η απομόνωση, όπως ήταν εδώ, τότε η περαιτέρω μελέτη της ανάμειξης του παθογόνου στην παθογένεια της λεπτοσπείρωσης μπορεί να διερευνηθεί μόνο με τη χρήση της PCR.

6. 6. Ανίχνευση της *Leptospira* spp με PCR στο νεφρικό ιστό

Από τη δεκαετία του 90, που η μοριακή μικροβιολογία άρχισε να αναπτύσσεται ταχύτατα, το γένος *Leptospira* έγινε αντικείμενο μοριακής διερεύνησης. Από τότε μπήκαν οι βάσεις για την ανάπτυξη μεθόδων PCR (Gravenkamp et al., 1993) για την αναγνώριση του παθογόνου. Σήμερα, υπάρχουν αρκετές αξιόπιστες εφαρμογές της PCR στην ανίχνευση του παθογόνου σε σωματικά υγρά (Ruiz et al., 2005; Bomfim and Koury, 2006; Jouglard et al., 2006; Lilenbaum et al., 2008; Thongboonkerd, 2008;

Ahmed et al., 2012; Fornazari et al., 2012) ή διάφορους ιστούς (Bunnell et al., 2000; Vemulapalli et al., 2005; Leon et al., 2006; Soto et al., 2006; Cai et al., 2010).

Στην παρούσα διερεύνηση, νεφρικός ιστός από 36 ενήλικα πρόβατα και δύο (2) αίγες, δηλαδή το 34,5% των εξετασμένων ζώων βρέθηκε θετικός στην PCR. Από τα 38 αυτά ζώα τα 24 ήταν θετικά και στην οροδιερεύνηση με τη μέθοδο MAT. Δηλαδή περισσότερα ζώα βρέθηκαν θετικά με την PCR σε σχέση με την MAT. Αυτό δείχνει εκ πρώτης όψεως ότι η PCR είναι περισσότερο ευαίσθητη της MAT, αλλά η ευαισθησία αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί εδώ με την απομόνωση ή την παρατήρηση του παθογόνου στους ιστούς. Άρα, δεν γνωρίζουμε αν όλα ή ποια ακριβώς από τα θετικά ήταν πραγματικά θετικά και όχι αποτέλεσμα άλλων παραγόντων, όπως τυχαίων επιμολύνσεων της μεθόδου.

Οι διάφορες μέθοδοι PCR, που έχουν σχεδιαστεί για να ανιχνεύουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά παθογόνων οροτύπων (Leon et al., 2006) θα ανιχνεύσουν το παθογόνο, που τα φέρει, όχι όμως και τους οροτύπους, που ίσως διαφέρουν κατ' ελάχιστον μεταξύ τους μοριακά. Η PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διερεύνηση είναι εμπορική και σχεδιασμένη να αναγνωρίζει παθογόνα είδη του γένους *Leptospira* και όχι συγκεκριμένους οροτύπους, άρα μπορεί να θεωρηθεί ότι έδειξε εδώ υψηλότερη ευαισθησία από την MAT για λόγους που εξηγούνται παρακάτω και έχουν επίσης παρατηρήσει άλλοι ερευνητές (Bomfim and Koury, 2006; Lilenbaum et al., 2008; Barbante et al., 2014).

Ερευνητές που έχουν προσπαθήσει να διερευνήσουν την αξιοπιστία της PCR σε σωματικά υγρά, όπως το ούρο, σε συνδυασμό με την MAT και με παρατήρηση - απομόνωση του παθογόνου, συνιστούν το συνδυασμό των δύο μεθόδων. Δηλαδή συνιστούν ως καλύτερο συνδυασμό αυτό της PCR και της MAT για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα (Lilenbaum et al., 2009), όταν πρόκειται για προσπάθεια αναγνώρισης πραγματικών φορέων του παθογόνου. Επομένως, στην παρούσα διερεύνηση τα 24 (21,8%) ζώα, που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους, μπορούν να θεωρηθούν πραγματικοί φορείς του παθογόνου. Επειδή δε, το παθογόνο ανιχνεύτηκε στο νεφρό, είναι πολύ πιθανή ή έστω και διαλείπουσα απέκκρισή του στο περιβάλλον. Μια τέτοια απέκκριση καθιστά τα μικρά μηρυκαστικά πηγές παθογόνων οροτύπων σε περιοχές που ευνοούν την παραμονή του παθογόνου στο περιβάλλον, όπως είναι η υγρασία και θερμοκρασία γύρω στους 22⁰ C (Sanders et al., 1999; Ricaldi and Vinetz, 2006;

Vijayachari et al., 2008; Lau et al., 2010; ILS – WHO, 2014; Martins and Lilenbaum, 2014)

Πειραματικά η Real Time PCR έχει δείξει υψηλή ευαισθησία (91.7%) και ειδικότητα (90%) (Ahmed et al., 2012) και παρόμοια ευαισθησία προσδίδεται και σε άλλους τύπους PCR για χρήση σε κλινικά περιστατικά (Bomfim and Kougy, 2006). Είναι δε συχνές οι αναφορές, όπου αν και παρατηρήθηκαν στους ιστούς λεπτόσπειρες, η απομόνωση ήταν αρνητική, ενώ η PCR ήταν θετική (Bomfim and Kougy, 2006; Lilenbaum et al., 2008; Ahmed et al., 2012).

Αν λάβουμε υπόψη την αξιοπιστία της PCR όπως αναφέρεται, τότε στην παρούσα διερεύνηση το 90% των 38 θετικών ζώων, δηλαδή 34 ζώα είναι πιθανοί φορείς. Όταν η PCR συγκρίνεται με την μέθοδο MAT σε κάποιες διερευνήσεις, η MAT δείχνει περισσότερα θετικά από την PCR (Lilenbaum et al., 2008; Lilenbaum et al., 2009; Shekatkar et al., 2010) ενώ σε κάποιες περιπτώσεις τα ίδια περίπου θετικά (Hernandez-Rodriguez et al., 2011). Αυτό είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της ύπαρξης αναμνηστικών τίτλων αντισωμάτων. Δηλαδή μη παρουσίας του παθογόνου στον προς διερεύνηση ιστό, λόγω πχ αυτοϊασης.

Το τελικό αποτέλεσμα της διερεύνησης φαίνεται να επηρεάζεται από το είδος του ιστού και το χρόνο μόλυνσης του ξενιστή (Bunnell et al., 2000; de Abreu et al., 2006; Soto et al., 2006; Ahmed et al., 2012). Όλοι, όμως, οι ερευνητές συστήνουν συνδυασμό της MAT και της PCR για αύξηση της ευαισθησίας των δύο και φυσικά της ειδικότητάς τους με την προϋπόθεση ότι η μέθοδος MAT περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό οροτύπων προς διερεύνηση.

Άρα, τα 24 (21,8%) δείγματα ιστών που ήταν θετικά και στις δύο μεθόδους, στην παρούσα διερεύνηση θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πραγματικά θετικά μέσα από ένα σύνολο θετικών και με τις δύο μεθόδους, που ήταν 42 (38%) από τα 110 δείγματα. Επομένως, το 21,8% των μικρών μηρυκαστικών, που διερευνήθηκαν και βρέθηκαν θετικά και στις δύο μεθόδους, μπορούν ως φορείς παθογόνων οροτύπων να τους διασπείρουν στο περιβάλλον τους, μολύνοντας άλλα ευπαθή ζώα και τον άνθρωπο.

Πάντως, η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου MAT θεωρείται χαμηλή όταν χρησιμοποιείται από μόνη της για διαγνωστικούς σκοπούς (de Abreu et al., 2006; Shekatkar et al., 2010; Hernandez – Rodriguez et al., 2011). Η χαμηλή ειδικότητα και

ευαισθησία της MAT προφανώς επηρεάζεται από τους επιλεγμένους οροτύπους (OIE, 2014). Αυτή η επιλογή μπορεί να ήταν και ο λόγος των διαφορών που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διερεύνηση. Δηλαδή ανίχνευση περισσότερων θετικών με την PCR από ότι με την MAT.

Το σύνολο των οροτύπων της MAT, που διερευνήθηκαν αφορούσε τη Μεγάλη Βρετανία και θα μπορούσαν κάποιοι σημαντικοί για την Ελλάδα ορότυποι να μην είχαν συμπεριληφθεί στην MAT, αλλά να ανιχνεύθηκαν με την PCR. Ένας άλλος λόγος μπορεί να ήταν η πιθανή προσαρμογή στο διερευνώμενο είδος ζώου κάποιων οροτύπων, λόγω της περιοχής, και η ανοσολογική αντίδραση να μην ήταν ανιχνεύσιμη. Θα ήταν ίσως ωφέλιμο να είχαμε στη διάθεσή μας και χαμηλότερους τίτλους, ώστε να τους συγκρίνουμε με την PCR. Όμως το VLA μας ενημέρωσε για τίτλους θετικούς βάσει της δικής του διαγνωστικής διαδικασίας (Standard Operating Procedures).

Ανεξάρτητα, όμως, από τα προβλήματα, που παρατηρούνται εδώ και έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές όταν συγκρίνεται η MAT με την PCR, η διαγνωστική αξία της PCR δεν αμφισβητείται, αφού είναι γενικώς αποδεκτό ότι η απομόνωση είναι πολύ λιγότερο επιτυχής, άρα έχει μικρότερη διαγνωστική αξία, πέραν άλλων δυσκολιών που την χαρακτηρίζουν, όπως είναι η χρονοβόρα διαδικασία και η δυσκολία αναγνώρισης των οροτύπων μετά από επιτυχή απομόνωση (Bunnel et al., 2000; de Abreu et al., 2006; Soto et al., 2006; Hernandez – Rodriguez et al., 2011; Ahmed et al., 2012). Επομένως, η PCR μπορεί στην παρούσα διατριβή να θεωρηθεί ως ικανοποιητική μέθοδος ερμηνείας των ιστολογικών μικροσκοπικών αλλοιώσεων, που παρατηρήθηκαν.

6.7. Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Εικοσιεννέα τεμάχια ιστών από ισάριθμα ζώα έδειξαν ιστολογικές αλλοιώσεις συναφείς της φυσικής και πειραματικής λοίμωξης από *Leptospira* spp. (Hamir et al., 2001; Delbem et al., 2002; de Faria et al., 2007; Monahan et al., 2009; de Daher et al., 2010; Agudelo – Florez et al., 2013; d'Andon et al., 2014).

Οι ιστολογικές αλλοιώσεις, που παρατηρήθηκαν ήταν από ήπια κυτταρική διήθηση με μονοπύρηννα κύτταρα, κυρίως λεμφοκύτταρα, μέχρι διάμεση ινώδης εκφύλιση και ατροφία των σπειραματοειδών σωληναρίων. Σε καμία των περιπτώσεων

δεν παρατηρήθηκε μεμονωμένος τύπος ιστικής αλλοίωσης. Δηλαδή οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις ήταν μικτού τύπου (**Πίνακας 3 - Παράρτημα 1**), διέφεραν όμως από ζώο σε ζώο ως προς το βαθμό της βλάβης.

Επομένως, ο νεφρικός ιστός εμφάνιζε πολλαπλούς διαφορετικούς τύπους ιστικών αλλοιώσεων. Συγκεκριμένα 18 (60%) νεφροί ισάριθμων ζώων είχαν κυτταρική διήθηση, 9 (30%) διάμεση ινώδη εκφύλιση, 17 (56,6%) ήπια σπειραματονεφρίτιδα και 16 (53,3%) ήπια ατροφία των νεφρικών μικροσωληναρίων (Εικόνες σελίδες 105 & 106).

Πειραματική μελέτη της μόλυνσης νεφρών ποντικών από *Leptospira* spp διαβαθμίστηκε ως προς την σφοδρότητα σε τυφλή μελέτη (d'Andon et al., 2014). Βάση των πειραματικών ευρημάτων και του χρόνου διάρκειας της μόλυνσης, παρατηρήθηκε ότι το 50% περίπου των πειραματόζωων εμφάνισαν διάχυτη εκτεταμένη ατροφία των νεφρικών μικροσωληναρίων και μόνο το 25% έδειξαν πολύ ήπια διάμεση ίνωση. Ενδιαφέρον είναι δε, ότι κανένα από τα πειραματόζωα, εκτός των αρνητικών μαρτύρων, δεν βρέθηκε χωρίς καμία ιστική βλάβη, παρατήρηση που πιθανότατα αποδεικνύει ότι, ακόμη και σε φυσικούς ξενιστές, οι παθογόνοι ορότυποι προκαλούν μόνιμες νεφρικές αλλοιώσεις.

Στη φυσική μόλυνση πρόσφατης μελέτης, με άγρια τρωκτικά, παρατηρήθηκαν νεφρικές ιστολογικές αλλοιώσεις μόνο στο 20% των αιχμαλωτισμένων τρωκτικών. Αυτές ήταν κυρίως διάφορου βαθμού κυτταρική διήθηση και δευτερευόντως ατροφία των νεφρικών μικροσωληναρίων, ενώ σε ελάχιστα ζώα παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις σοβαρής σπειραματονεφρίτιδας (Agudelo-Florez et al., 2013).

Άρα, μπορούμε να υποθέσουμε από τα ερευνητικά δημοσιευμένα δεδομένα, ότι η φυσική παρουσία ενός πολύ παθογόνου ορότυπου και η εγκατάστασή του στο νεφρικό ιστό συνεπάγεται ιστικές αλλοιώσεις. Βάση αυτών των δημοσιευμένων δεδομένων, οι εδώ παρατηρούμενες αλλοιώσεις, που ιστολογικά ομοιάζουν με τις πειραματικά παρατηρούμενες (Monahan et al., 2009; d'Andon et al., 2014), αλλά και αυτές κατά τη φυσική μόλυνση τρωκτικών (Agudelo-Florez et al., 2013), είναι αποτέλεσμα χρόνιας λοίμωξης του ζώου από πολύ παθογόνο ορότυπο του γένους *Leptospira*. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα της PCR, όπου ήταν θετικοί οι 21 από τους 29 ιστούς με αλλοιώσεις, ενώ 17 ήταν από ζώα που ήταν θετικά στην MAT.

Τα ευρήματα ερευνητών ως προς την αξιοπιστία των δύο μεθόδων, δηλαδή της PCR και της MAT, δείχνουν ότι η σύγχρονη χρήση των δύο αυξάνει την διαγνωστική τους αξιοπιστία ανεξάρτητα είδος ζώου και διερευνούμενου ιστού (Lilenbaum et al., 2008; Dorjee et al., 2009; Lilenbaum et al., 2009; Shekatkar et al., 2010; Hernandez – Rodriguez et al., 2011; Mineiro et al., 2011; Cesar et al., 2012). Οι δύο μέθοδοι συμφώνησαν ως προς τις ιστολογικές αλλοιώσεις για 16 (55,2%) από τα 29 ζώα.

Δηλαδή 14,5% των ζώων (110), που διερευνήθηκαν στο σφαγείο, είχαν αλλοιώσεις που πιθανώς ήταν αποτέλεσμα της υποκλινικής λοίμωξης με ορότυπο ή οροτύπους του γένους *Leptospira*, όπως αυτό επιβεβαιώνεται από την PCR και την MAT. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις του νεφρικού ιστού αυτών των ζώων ήταν από ενδιάμεση έως σοβαρή μορφή. Τα παρατηρούμενα ευρήματα συμφωνούν με τα παρατηρούμενα σε πειραματική μόλυνση από τον πολύ παθογόνο ορότυπο Copenhageni (d'Andon et al., 2014), ο οποίος όμως, δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα διερεύνηση στο σφαγείο. Αυτό το εύρημα διαφέρει αυτών προηγούμενων διερενήσεων (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003), αλλά και των ευρημάτων από τη διερεύνηση της λοίμωξης σε περιστατικά αποβολών (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**).

Ενδιαφέρον ήταν ότι οι τίτλοι των αντισωμάτων ήταν ιδιαίτερα χαμηλοί σε όλες τις περιπτώσεις (**Πίνακας 3 - Παράρτημα 1**), ένα εύρημα που δεν είχε παρατηρηθεί στα περισσότερα κοπάδια των ίδιων περιοχών στην οροδιερεύνησης περιστατικών αποβολών. Σε αυτή τη διερεύνηση (Bisias et al., 2010β – **Κεφάλαιο 3**) ήταν, πρώτον σημαντικά περισσότερες οι αίγες, δεύτερον όλα τα ζώα, που διερευνήθηκαν, ήταν από περιστατικά αποβολών και τρίτον μεταξύ των ανιχνευμένων οροτύπων ήταν και ο ορότυπος Copenhageni. Προφανώς η χαμηλοί τίτλοι ήταν αποτέλεσμα είτε της μεγάλης διάρκειας της λοίμωξης, είτε του είδους ζώου (πρόβατα), είτε των οροτύπων που ανιχνεύτηκαν. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν εξάγει και άλλοι ερευνητές (Martinez et al., 2006; Mineiro et al., 2011). Αυτό ίσως ενισχύεται και από την αδυναμία μικροσκοπικής παρατήρησης του παθογόνου στους ιστούς, όπως και άλλοι αναφέρουν (Dorjee et al., 2009; Martinez et al., 2006).

Δηλαδή αν και η PCR ήταν θετική, οι αριθμοί του παθογόνου ήταν μικροί, άρα δύσκολο να παρατηρηθούν. Ενδιαφέρον δε είναι ότι το παθογόνο παρατηρήθηκε στον νεφρικό ιστό έξι ζώων εκ των οποίων μόνο ένα είχε ιστικές νεφρικές αλλοιώσεις 3^{ου}

βαθμού κατά τον d'Andon et al., (2014). Στις άλλες πέντε περιπτώσεις οι αλλοιώσεις ήταν ήπιου βαθμού αγγειίτιδα και λεμφοκυτταρική διήθηση.

Οι τελευταίες παρατηρούνται κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης (Monahan et al., 2009) και συγκεκριμένα τους πρώτους δύο με τρεις μήνες μετά την μόλυνση. Οι πειραματικές παρατηρήσεις δείχνουν επίσης ότι η αποίκηση του νεφρικού ιστού από το παθογόνο δεν συνεπάγεται και την πρόκληση ιστικών αλλοιώσεων (Cesar et al., 2012; d'Andon et al., 2014). Αυτό θεωρείται αποτέλεσμα του διαφορετικού τρόπου με τον οποίο αντιμετωπίζεται η εισβολή του κάθε διαφορετικού οροτύπου ή ακόμη και του στελέχους ενός οροτύπου από ένα άτομο ξενιστή και όχι είδος ζώου ξενιστή (Monahan et al., 2009). Λόγω του κόστους της χρώσης ιστών με την Steiner Modified Silver Stain δεν χρώστηκαν ιστοί χωρίς ιστολογικές αλλοιώσεις, άρα δεν υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω σύγκρισης της επιτυχίας της προσπάθειας αυτής. Ας σημειωθεί ότι και ερευνητές με χρήματα και εμπειρία, που χρησιμοποιούν την παρατήρηση, λόγω αποτυχίας της απομόνωσης, δηλώνουν ότι η παρατήρηση αποτυγχάνει, όπως και η απομόνωση.

Η παρατήρηση των λεπτοσπειρών μετά από ειδική χρώση ιστών συγκρινόμενη με την PCR και την MAT τόσο στη φυσική λοίμωξη, αλλά και την πειραματική, δεν συνδέεται με τις βλάβες στους μολυσμένους ιστούς σε βαθμό απόδειξης του αιτίου πρόκλησης της βλάβης, αφού παρατηρείται το παθογόνο και σε ιστούς χωρίς αλλοιώσεις (Hamir et al., 2001; D'Faria et al., 2007; Monahan et al., 2009; Cesar et al., 2012; d'Andon et al., 2014). Γενικώς, αναφέρεται ότι οι ιστικές αλλοιώσεις, που ανελλιπώς παρατηρούνται κατά την πειραματική λοίμωξη, είναι αλλοιώσεις διάμεσης νεφρίτιδας και σε κάποιες περιπτώσεις υπάρχει βραδεία επιδείνωση.

Πρέπει, όμως, εδώ να παρατηρηθεί ότι λόγω των πολλαπλών δυσκολιών απομόνωσης και εργαστηριακής συντήρησης πολλών οροτύπων και στελεχών δεν είναι πολλές οι πειραματικές *in vivo* μελέτες και αυτές που υπάρχουν αναφέρονται σε δύο τρεις συχνά απαντώμενους οροτύπους, που καμία σχέση δεν έχουν με αυτούς που οροδιερευνήθηκαν εδώ. Αυτές που υπάρχουν αφορούν οροτύπους παθογόνους κυρίως στον άνθρωπο, όπως ο ορότυπος Copenhageni (d' Faria et al., 2007; d' Andon et al., 2014), ένας ορότυπος που δεν βρέθηκε σε κανένα από τους θετικούς ιστούς. Στη φύση η οροθετικότητα και οι ιστικές αλλοιώσεις αφορούν διαφορετικούς οροτύπους και

στελέχη τους (Hamir et al., 2001; Delbem et al., 2002; d' Faria et al., 2007), άρα είναι άγνωστες οι αλλοιώσεις που προκαλούν, αφού δεν έχουν πειραματικά μελετηθεί.

Επειδή δε η μεν PCR δεν αναγνωρίζει τους οροτύπους, η δε μέθοδος MAT αναγνωρίζει αντισώματα μόνο στον ορότυπο που περιέχεται στην εκτέλεση, πρέπει να γίνει κατανοητό ότι είναι ιδιαίτερα δύσκολος ο στατιστικός συσχετισμός των εδώ ιστολογικών ευρημάτων με τους συγκεκριμένους οροτύπους, που αναγνωρίστηκαν με την MAT για τα ίδια ζώα. Για αυτό και δεν γίνεται αναφορά σε στατιστικά ευρήματα, τα οποία έδειξαν δυστυχώς χαμηλή συμαντικότητα συσχετισμού μεταξύ όλων αυτών που παρατηρήθηκαν. Για το λόγο αυτό η ανάλυση των ευρημάτων και η συζήτηση έγινε με βάση τα ποιοτικά ευρήματα. Μπορεί όμως να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν, τουλάχιστον για τα 16 ζώα, που ήταν θετικά στις μεθόδους PCR και MAT, πιθανώς αποτέλεσμα της μόλυνσης του νεφρού από παθογόνους οροτύπους.

Από τον **Πίνακα 3 - Παράρτημα 1** φαίνεται ότι, από τους 16 ιστούς με θετική την PCR και την MAT, 8 (50%) είχαν τίτλους στον ορότυπο Tarassovi, ενώ στο σύνολο των MAT θετικών ζώων μόνο 10 ήταν θετικά στον ίδιο ορότυπο. Δηλαδή τα περισσότερα θετικά ζώα σε αυτό τον ορότυπο είχαν ιστολογικές αλλοιώσεις, πιθανώς γιατί ο ορότυπος αυτός είναι περισσότερο παθογόνος για τα είδη ζώων, που διερευνήθηκαν. Ας σημειωθεί ότι μόνο δυο (2) από τις 12 αίγες, που διερευνήθηκαν, είχαν ήπια νεφρίτιδα, ενώ όλες ήταν αρνητικές σε κάθε μία από τις άλλες μεθόδους διερεύνησης με εξαίρεση το kit ταχείας συγκόλλησης στο οποίο ήταν ύποπτα οκτώ (8) ζώα, συμπεριλαμβανομένων των δύο (2) με ιστολογικά ευρήματα.

Ως προς τη σύνδεση του οροτύπου με τις ιστολογικές αλλοιώσεις, ο ορότυπος *Autumnalis* ήταν δεύτερος με έξι ιστολογικά θετικούς ιστούς.

Η δυσκολία απόδοσης με βεβαιότητα των ιστολογικών αλλοιώσεων σε συγκεκριμένο ορότυπο φαίνεται και από την παρατήρηση ιστολογικών νεφρικών αλλοιώσεων σε πέντε ζώα, που ήταν θετικά σε δύο διαφορετικούς οροτύπους, διαφορετικών μάλιστα παθογόνων ειδών.

Συγκεκριμένα οι ορότυποι *Autumnalis* και *Zanoni* ανήκουν στο είδος *L. interrogans* και ο ορότυπος *Tarassovi* στο γνωστό παθογόνο είδος *L. borgpetersenii* (Cerqueria et al., 2010; Lehman et al., 2014). Βέβαια άξιο παρατήρησης είναι (**Πίνακας 3 - Παράρτημα 1**) ότι με εξαίρεση τους οροτύπους *Tarassovi* και *Javanica*

(12 οροί), που ανήκουν στο πρόσφατα αναγνωρισμένο παθογόνο είδος *L. borgpetersenii*, όλοι οι άλλοι ορότυποι (16 οροί) ανήκουν στο είδος *L. interrogans* (Sakolvaree et al., 2007; Wangroongsarb et al., 2007; Bioportal, 2014).

Δηλαδή παρατηρούμε ότι ορότυποι του είδους *L. interrogans*, που ήταν το πλέον μελετημένο είδος του παθογόνου μέχρι πριν μια δεκαετία, είναι αυτοί που κυρίως εμπλέκονται στην οροθετικότητα, ενώ είναι ίσης σημασίας στον συσχετισμό τους με τις ιστικές αλλοιώσεις, που παρατηρήθηκαν.

Από τα ευρήματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι στα μικρά μηρυκαστικά περιοχών υψηλού κινδύνου, ορότυποι των παθογόνων ειδών *L. interrogans* και *L. borgpetersenii* είναι αυτοί που φέρουν μηχανισμούς παθογενετικότητας ικανούς να τους βοηθήσουν να παραμείνουν στους ιστούς αυτών των ειδών ζώων και να προκαλέσουν σημαντικές ιστικές αλλοιώσεις. Ενδιαφέρον δε θα είχε, αν ήταν δυνατόν, να μελετηθεί η βιοχημική σύσταση του ούρου αυτών των ζώων, ώστε να εκτιμηθεί και η επίδραση των ιστικών αλλοιώσεων στην γενική κατάσταση υγείας και απόδοσης τέτοιων ζώων.

Σε προηγούμενες οροδιερευνητικές μελέτες στην Ελλάδα, με ή χωρίς κλινικά ευρήματα, οι ορότυποι, που αναγνωρίστηκαν ως σημαντικότεροι ήταν στη μέγιστη πλειοψηφία τους του είδους *L. interrogans* (Burriel et al., 2002; Burriel et al., 2003)

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και η μελέτη της σημαντικής ζωνόσου «λεπτοσπείρωσης» αριθμεί περισσότερα από 120 χρόνια, η πολύπλοκη μοριακή δομή του παθογόνου άρχισε να γίνεται γνωστή μόλις τις δύο τελευταίες δεκαετίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται

1. Από την ανάπτυξη και ευκολότερη χρήση μοριακών μεθόδων, με τις οποίες οι ερευνητές δύνανται να μελετήσουν ένα βακτηρίδιο ιδιαίτερα δύσκολο να μελετηθεί και
2. Από τη δημιουργία ισχυρών, διεθνών οργανισμών και ομάδων μελέτης του παθογόνου, μετά από συμμετοχή πολλών οικονομικά εύρωστων χωρών, σε προγράμματα που διοργανώνονται από οργανισμούς όπως ο WHO. Η πιο πρόσφατη προσπάθεια οργάνωσης της μοριακής γνώσης προς όφελος των ερευνητών είναι η δημιουργία της LepBank. Σκοπός της είναι η συστηματοποίηση της συσσωρευμένης μοριακής γνώσης και η ελεύθερη διάχυσή της στον ερευνητικό κόσμο της υφελίου. Σε όλες αυτές τις ομάδες και οργανισμούς υπάρχει παντελής απουσία της Ελλάδας, με εξαίρεση την απλή αναφορά των διαπιστωμένων κλινικών περιστατικών στον άνθρωπο. Η απουσία της Ελλάδας σε αυτή την παγκόσμια ερευνητική και διαγνωστική δραστηριότητα οφείλεται στην αδιαφορία των Εθνικών Φορέων επιτήρησης σημαντικών ζωνόσων και την αδυναμία τους να επενδύσουν υλικοτεχνικά σε ένα λοιμώδες νόσημα, που θεωρείται διεθνώς ως «νέο - αναδυόμενο».

Αυτή η απουσία συντέλεσε ώστε μέχρι το 2002 να υπάρχουν μόνο τρεις αναφορές, που αφορούν την λεπτοσπείρωση στα ζώα. Από το 2002 και μετά η ομάδα μας έχει κάνει πολλές προσπάθειες

1. Να αναπτύξει διεθνείς συνεργασίες. Αποτέλεσμα ήταν η βοήθεια, οικονομική και τεχνική, που μας παρείχε το Βρετανικό Κεντρικό Κτηνιατρικό Εργαστήριο (VLA) και
2. Να παράγει σημαντικές πληροφορίες για τη λεπτοσπείρωση των ζώων στην Ελλάδα, ελπίζοντας ότι θα αφυπνίσει της Κτηνιατρικές Υπηρεσίες για την αναγκαιότητα μελέτης του νοσήματος, κυρίως στα παραγωγικά ζώα, ώστε να εκτιμηθεί ορθά η σημαντικότητά του στην ζωική παραγωγή και τη Δημόσια Υγεία. Από αυτές τις προσπάθειες, μέρος των οποίων είναι και η παρούσα διδακτορική διατριβή, εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα που συνοψίζονται στα εξής:

1. Μέσα από αυτούς τους διεθνείς οργανισμούς συνεργασίας των 10 -15 τελευταίων ετών, θα απαντηθούν πολλά από τα αναπάντητα ερωτήματα, που αφορούν κυρίως τους μηχανισμούς παθογενετικότητας του μικροοργανισμού.
2. Υπάρχει ελπίδα να δημιουργηθούν μοριακές μέθοδοι αναγνώρισης των οροτύπων στους ιστούς, ώστε να μειωθεί η ανάγκη εφαρμογής της μεθόδου MAT. Η μέθοδος MAT απαιτεί οργανωμένο εργαστήριο για τη διατήρηση μεγάλου αριθμού οροτύπων για αξιόπιστη επιδημιολογική μελέτη της διασποράς σημαντικών οροτύπων στη φύση.
3. Η μέθοδος MAT, όπως εφαρμόζεται στο VLA της Βρετανίας, έδειξε για τα μικρά μηρυκαστικά ότι:
 - α) η οροθετικότητα μεταξύ προβάτων της Πελοποννήσου, που είχαν αποβάλει ήταν 24,9%, υψηλότερη αυτής των αιγών (18,4%) στις ίδιες περιοχές. Άρα τα δύο είδη παραγωγικών ζώων φαίνεται να διαφέρουν ως προς την ευαισθησία στη μόλυνση. Η οροθετικότητα και των δύο ήταν σημαντικά υψηλότερη αυτής των υγιών προβάτων και αιγών (11%), από την ευρύτερη Νότια Ελλάδα και τα νησιά της.
 - β) Η οροθετικότητα μεταξύ προβάτων και αιγών, περιστατικών αποβολών περιοχών της Δυτικής Πελοποννήσου ήταν σημαντικά υψηλότερη (30 – 35%) από περιοχές της υπόλοιπης Πελοποννήσου.
 - γ) Το τελευταίο εύρημα συμπίπτει με τα υψηλά ποσοστά κλινικών περιστατικών στον άνθρωπο, που ανακοινώνονται από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ για τη Δυτική Ελλάδα.
 - δ) Από τα **α**, **β** και **γ** ανωτέρω εξήχθη το συμπέρασμα ότι υπήρχε αυξημένη πιθανότητα απομόνωσης οροτύπων του γένους *Leptospira*, αν η προσπάθεια επικεντρωνόταν στη Δυτική Πελοπόννησο.
4. Η προσπάθεια απομόνωσης του παθογόνου απέτυχε, αν και τα δείγματα προήλθαν από μικρά μηρυκαστικά περιοχών της Δυτικής Πελοποννήσου. Η απομόνωση απέτυχε κατά την άποψή μας,
 - α) διότι δεν υπήρχε μακροχρόνια εργαστηριακή υλικοτεχνική υποστήριξη, που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απομόνωση του παθογόνου, αφού η επώαση των ενοφθαλμισμένων υποστρωμάτων απαιτεί χρόνο που φτάνει τις 26 εβδομάδες (6 μήνες), ανάλογα με τον ορότυπο, πριν θεωρηθούν αρνητικές. Η έλλειψη τέτοιας υποστήριξης ήταν αποτέλεσμα της άγνοιας των εθνικών φορέων για τις δυσκολίες απομόνωσης του βακτηρίου.
 - β) λόγω της απειρίας των εμπλεκόμενων ατόμων, αφού αυτή η προσπάθεια δεν είχε

ελληνικό προηγούμενο. Άρα δεν υπήρχαν ορθά εκπαιδευμένα άτομα να μας συμβουλευθούν κατά την εντόπιση προβλημάτων και τεχνικών δυσκολιών και γ) διότι δεν είχε η προσπάθειά μας την υποστήριξη των Ελληνικών κτηνιατρικών υπηρεσιών, ώστε να συσταθεί εργαστήριο αναφοράς της λεπτοσπείρωσης των ζώων. Η σύσταση τέτοιου εργαστηρίου θα βοηθούσε την δυνατότητα εκπαίδευσης προσωπικού στο εξωτερικό για την ορθή, συστηματική μελέτη της ζωνόσου.

5. Από την ορολογική και ιστολογική εργαστηριακή διερεύνηση υγιών ζώων κατά τη σφαγή, σε περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου συμπεραίνεται ότι,
 - α) Ο συνδυασμός των μεθόδων MAT και PCR, που συνίσταται ως ο καλύτερος τρόπος ερμηνείας αλλοιώσεων, όταν αποτυγχάνει η απομόνωση, έδειξε ότι 16 (55,2%) από τα 29 ζώα, που εμφάνιζαν ιστολογικές αλλοιώσεις, ήταν θετικά στις δύο μεθόδους διαπίστωσης της μόλυνσης.
 - β) Δηλαδή 14,5% των ζώων (110), που διερευνήθηκαν στο σφαγείο, είχαν νεφρικές αλλοιώσεις, που πιθανώς ήταν αποτέλεσμα της υποκλινικής λοίμωξης με ορότυπο ή οροτύπους του γένους *Leptospira*. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την υψηλή οροθετικότητα (25,45%), που παρατηρήθηκε με τη διερεύνηση του παθογόνου στο σφαγείο.
 - γ) Ορότυποι του γένους *Leptospira* έχουν σημαντική παρουσία στους νεφρούς μικρών μηρυκαστικών με αποτέλεσμα,
 - δ) Οι ορότυποι αυτοί να απεκκρίνονται με το ούρο στο περιβάλλον, καθιστώντας τα μικρά μηρυκαστικά σημαντικές πηγές παθογόνων οροτύπων για άλλα είδη ζώων και τον άνθρωπο.
6. Οι σημαντικότεροι ορότυποι ήταν οι Copenhageni και Tarassoni, που θεωρούνται ιδιαίτερα παθογόνοι στον άνθρωπο,. Αυτοί ίσως είναι μεταξύ αυτών που προκαλούν κλινικά περιστατικά σε κατοίκους της Δυτικής Ελλάδας, άρα
7. Απαιτείται η επιδημιολογική μελέτη σε επίπεδο οροτύπων στα κλινικά περιστατικά του ανθρώπου, ώστε να καθοριστεί ο ρόλος των κατοικίδιων ζώων, κυρίως των παραγωγικών, στη Δημόσια Υγεία και να καθοριστούν οι τρόποι προφύλαξης των ανθρώπων και ζώων στην Ελληνική επικράτεια.
8. Όλα τα παραπάνω επιβάλλουν την άμεση δημιουργία Εθνικού Φορέα συστηματικής παρακολούθησης και μελέτης της λεπτοσπείρωσης του ανθρώπου και των ζώων. Μόνο μέσω ενός τέτοιου φορέα θα συνεισφέρει η χώρα στις διεθνείς προσπάθειες

παρασκευής αποτελεσματικού/ων μοριακού εμβολίου/ων. Διότι, λόγω της έλλειψης αντιγονικής συγγένειας μεταξύ οροτύπων, η μη συμμετοχή της Ελλάδας θα καταλήξει στη μη αναγνώριση των σημαντικών για τη χώρα οροτύπων στα ζώα και τον άνθρωπο. Τα υπάρχοντα εμπορικά εμβόλια διαφαίνεται από τα εδώ ευρήματα ότι θα αποτύγχαναν στα παραγωγικά ζώα, διότι οι ορότυποι των εμβολίων διαφέρουν των σημαντικότερων οροτύπων, που αναγνωρίστηκαν στην Ελλάδα μεταξύ περιστατικών αποβολών και υγιών ζώων.

9. Οι ορότυποι των μικρών μηρυκαστικών, που αναγνωρίστηκαν ως σημαντικότεροι μεταξύ υγιών και μη ζώων, ήταν οι Tarassoni και Copenhageni, που δεν συμπεριλαμβάνονται στα εμπορικά εμβόλια και
10. Μόνο μέσω Εθνικού Φορέα είναι δυνατή η συστηματική μελέτη του γένους *Leptospira* και σε άλλα είδη ζώων, άγριων και κατοικίδιων, για να συσχετιστούν οι πιθανές δεξαμενές οροτύπων στη φύση με τα διάφορα είδη ζώων και τον άνθρωπο. Μόνο με αυτό τον τρόπο θα δημιουργηθούν οι προϋποθέσεις να προβλέπεται και προλαμβάνεται η κλινική εκδήλωση της μόλυνσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Abdollahpour G, 2013 . A review on Leptospirosis.
<http://leptolab.ut.ac.ir/Review-En.htm>, June 2014
2. Abela-Ridder B., Bertherat E and Durski K, 2013. Global Burden of Human Leptospirosis and Cross-Sectoral Interventions for its Prevention and Control, Leptospirosis Epidemiology Reference Group (LERG) & The Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN)
<http://www.pmaconference.mahidol.ac.th/dmdocuments/2013-PMAC-Poster-P9-Bernadette%20Abela-Ridder.pdf>
3. Adler B and Faine S, 1983. A Pomona Serogroup-Specific Agglutinating Antigen in Leptospira Identified by Monoclonal Antibodies. Pahtology 15:247-250.
4. Adler B and Moctezuma A, 2010. Leptospira and Leptospirosis. Veterinary Microbiology. 140: 287-296.
5. Adler B., Faine S., Christopher W.L., Chappel R.J, 1986. Development of an Improved Selective Medium for Isolation of Leptospire from Clinical Material. Vet. Microbiol., 12:377–381.
6. Agampodi S.B, Thevanesam V.H, Wimalarathna V, Senarathna T, Wijedasa M.H, 2008. A preliminary study on prevalent serovars of leptospirosis among patients admitted to teaching hospital, Kandy, Sri Lanka Indian Journal of Medical Microbiology 26 (4) : 405-406
7. Agudelo-Flórez P, Murillo V.E, Londoño A.F, Rodas J.D, 2013. Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with Leptospira. Biomedica ;33 Suppl 1:82-8.
8. Ahmed A, van der Linden H, Hartskeerl R.A, 2014. Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic Leptospira. Int J Environ Res Public Health, 8;11(5):4953-64.
9. Ahmed A, Klaasen H.L.B.M, van der Veen M, van der Linden H, Goris M.G. A, Hartskeerl R.A, 2012. Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of Leptospire in Canine Samples. Advances in Microbiology, 2: 162-170.
10. Alston J.M and Brown H.C, 1937. The Epidemiology of Weil's disease. Proc R Soc Med. 30(6):741–756.

11. Alt D.P, Zuerner R.L, Bolin C.A, 2001. Evaluation of Antibiotics for Treatment of Cattle Infected with *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. J. Am Vet. Med. Ass 219(5):636-639.
12. Anderson M.L, 2007. Infectious Causes of Bovine Abortion During Mid- to Late-Gestation. Theriogenology 68:474–486.
13. Antoniou M, Tselentis Y., Babalis T., Gikas A., Stratigakis N., Vlachonikolis I., Kafatos A. and Fioretos M, 1995. The seroprevalence of ten zoonoses in two villages of Crete, Greece European Journal of Epidemiology 11:415-423.
14. Antoniou M, Economou I, Xiaoying Wang, Psaroulaki A, Spyridaki I, Papadopoulos B, Christidou A, Tsafantakis E, and Tselentis Y, 2002. Fourteen-year seroepidemiological study of zoonoses in a greek village Am. J. Trop. Med. Hyg., 66(1): 80–85
15. Antoniadis A. Alexiou S, Fidani D.L and Bautz E.E.K, 1995. Comparison of the clinical and serologic diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis European Journal of Epidemiology 11: 91-92
16. Assimakopoulos S, Fligou F, Marangos M, Zotou A, Psilopanagioti A, Filos K, 2012 Anicteric Leptospirosis-Associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome: A Case Series Study American Journal of the Medical Sciences:Volume 344 - Issue 4 - p 326–329
17. Athanazio D.A, Silva E.F, Santos C.S, Rocha G.M, Vannier-Santos M.A, McBride A.J, Ko A.I, Reis M.G, (2008). *Rattus norvegicus* as a Model For Persistent Renal Colonization by Pathogenic *Leptospira* Interrogans. Acta Trop 105:176–180.
18. Azizi S, Tajbakhsh E, Hajimirzaei M.R, Gholami Varnamkhist M, Sadeghian H, Oryan A, 2012. Evaluation of 'white-spotted kidneys' associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based LipL32 gene in slaughtered cows. J S Afr Vet Assoc. Nov 5;83(1):69.
19. Baker T.F, McEwen S.A, Prescott J.F, 1989. The prevalence of Leptospirosis and its Association with Multifocal Interstitial Nephritis in Swine at Slaughter. Can J Vet Res 53:290-294.
20. Balamurugan V, Gangadhar N.L, Mohandoss N, Thirumalesh S.R.A, Dhar M, Shome R, Krishnamoorthy P, Prabhudas K and Rahman H, 2013. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. SpringerPlus 2:362. <http://www.springerplus.com/content/2/1/362>

21. Ballard S.A, Williamson M, Adler T, Vinh T. And Faine S, 1986 . Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary culture of renal epithelial cells. J. Med. Vol 21: 59-67.
22. Barbante P, Shimabukuro F, Langoni H, Richini V.B. and Lucheis S.B, 2014. *Leptospira* spp. Infection in sheep herds in southeast Brazil Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases <http://www.ivat.org/content/20/1/20>
23. Barbosa A.S, Abreu P.A.E, Vasconcellos S.A, Morais Z.M, Goncales A.P, Silva A.S, Dahi M.R and Isaac L, 2009. Immune Evasion of *Leptospira* Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. Infection and Immunity, vol 77 (3): 1137-1143
24. Barocchi M.A, Ko A.I, Reis M.G, McDonald K.L and Riley L.W, 2002 Rapid Tranlation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans* , an Invasivebut Nonintracellular Pathogen Infection and Immunity vol 70 (12): p.6926-6952
25. Bercovich Z, Taaijke R and Bokhout B.A, 1990. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. Veterinary Microbiology, vol 21 (3) 255-262
26. Berlioz-Arthaud A, Kiedrzyński T, Singh N, Yvon J.F, Roulaen G, Coudert C, Uliviti V, 2007. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine 101, 714-721
27. Bertherat E., Renaut A., Nabias R., Dubreuil G., Georges-Courbot M. C, 1999. Leptospirosis and Ebola Virus Infection in Five Gold-Panning Villages in Northeastern Gabon am. J. Trop. Med. Hyg., 60(4), pp. 610–615
28. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Lovett P, Gilman R., Willing M, Gotuzzo E, Vinetz J, 2003. Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance Lancet Infectious Diseases 3: 757-771; Levett PN 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14: 296-326
29. Bioportal, 2014. *Leptospira* species and serovars <http://bioportal.bioontology.org/ontologies/LOINC?p=classes&conceptid=http%3A%2F%2Fpurl.bioontology.org%2Fontology%2FLNC%2FLP17129-5>
30. Biosecurity Australia, 2003. A scientific review of Leptospirosis and implications for quarantine policy. <http://www.agriculture.gov.au/biosecurity/about/clients/report-to-clients/report-to-clients-02-03>, June 2014
31. Bisias G, Kritas S.K, Burriel A and Kontos V, 2010α. Leptospirosis: An important re-emerging infection of animals and man. Journal Hellenic Veterinary Medical Society, 61(1) :76-84

32. Bisias G, Burriel A.R., Boutsini S, Kritas S.K, Leontides L.S, 2010β. A Serological Investigation of Some Abortion Causes among Small Ruminant Flocks In Greece. The Internet Journal of Veterinary Medicine, 8(2). DOI: 10.5580/28f4
33. Bolin C.A, Cassells J.A, Hill H.T, Frantz J.C, Nielsen J.N, 1991. Reproductive Failure Associated With *Leptospira Interrogans* Serovar Bratislava Infection of Swine J Vet Diagn Invest 3:152-154
34. Bomfim M.R.Q and Koury M.C, 2006. Evaluation of LSSP-PCR for Identification of *Leptospira* spp. in Urine Samples of Cattle with Clinical Suspicion of Leptospirosis. Veterinary Microbiology 118: 278-288
35. Bomfim M.R.Q, Albert Kob, Cota Kourya M, 2005. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis Veterinary Microbiology 109 (1–2): 89–94
36. Bunnell J.E, Hice C.L, Watts D.M, Montrueil V, Tesh R.B and Vinetz J.M, 2000. Detection of Pathogenic *Leptospira* spp Infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. Am. J. Trop. Med. Hyg 63: 255-258
37. Burriel A.R, Dalley C, Woodward M.J, 2003. Prevalence of *Leptospira* Species Among Farmed and Domestic Animals in Greece. Vet Rec, 153: 146-148
38. Burriel A.R, Magana-Vougiouka O, Butsini S, Nomikou K, Patakakis M, 2002. A Serologic Investigation of Some Causes of Reproductive Failure Among Small Ruminats in Greece. OJVR, 1:57-63
39. Cai C.S, Zhu Y.Z, Xin X.F, Jiang X.G, Lou X.L, He.P, Qin J.X, Zhao G.P, Wang S.Y, Guo X.K, 2010 Development of O-antigen cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China BMC microbiology 10:67 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/67>
40. Caimano M.J, Sivasankaran S.K, Allard A, Hurley D, Hokamp K, Grassmann A.A, Hinton J.C.D and Nally J.E, 2014. A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalin Host-Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. PLOS Pathogens 10 (3): e1004004
41. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini Ch, Montecchini S, Buttrini M, Rossi S, Piergianni M, De Conto F, Arcangeletti C.M, Chezzi C and Medici M.C, 2014. *Leptospira* species and Serovars Identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry after Database Implementation BMC. Research Notes , 7:330 doi:10.1186/1756-0500-7-330

42. Campagnolo E.R, Warwick M.C, Marx H.L Jr, Cowart R.P, Donnell H.D Jr, Bajani M.D, Bragg S.L, Esteban J.E, Alt D.P, Tappero J.W, Bolin C.A, Ashford D.A, 2000. Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol. 216 (5): 676-682
43. Cerqueira G.M, McBride A.J, Queiroz A, Pinto L.S, Silva E.F, Hartskeerl R.A, Reis M.G, Ko A, Dellagostin O.A, 2010. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *Am J Trop Med Hyg.* ;82(1):83-7
44. Cerqueria G. M and Picardeau M, 2009. A Century of *Leptospira* Strain Typing. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 760 – 768
45. Cesar K.R, Romero E.C, de Bragança A.C, Blanco R.M, Abreu P.A, Magaldi A.J, 2012. Renal involvement in leptospirosis: the effect of glycolipoprotein on renal water absorption. *PLoS One.* 7(6):e37625.
46. Chadsuthi S, Modchang C, Lenbury Y, Iamsirithaworn S, Triampo W, 2012. Modeling Seasonal Leptospirosis Transmission and its Association with Rainfall and Temperature in Thailand Using Time-Series and ARIMAX Analyses. *Asian Pac J Trop Med* ; 5(7):539-546
47. Chappel R.J, Goris M, Palmer M.F and Hartskeerl R.A, 2004. Impact of Proficiency Testing on Results of the Microscopic Agglutination Test for Diagnosis of Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* December 2004 vol. 42 no. 12 5484-5488
48. Chernukcha Y.G, Ananyina Y.V, Zenkovitch N.S, 1974. Pathogenicity of *Leptospira* of Various Serological Types for Some Species of Wild Rodents. *Zentralbl Bacteriol (OrgA)* 228: 388-395
49. Cheville N.F, Huhn R, Cutlip R.C, 1980. Ultrastructure of Renal Lesions in Pigs with Acute Leptospirosis Caused by *Leptospira Pomona*. *Vet Pathol* 17:338–351
50. Choy H.A, 2012. Multiple Activities of LigB Potentiate Virulence of *Leptospira interrogans*: Inhibition of Alternative and Classical Pathways of Complement. *Plos ONE* 7(7) e41566
51. 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
52. Cinco M, 2010. New insights into the pathogenicity of *Leptospira*: evasion of host defences. *New Microbiologica*, 33:283-292

53. Cook G.C, 2007. In: Tropical Medicine: An Illustrated History of The Pioneers. Adolf Weil. Academic Press, UK, pp 236-238
54. Cook D.N, Pisetsky D.S, Schwartz D.A, 2004. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Human Disease. *Nat Immunol* 5:975–979
55. Cox T.E, Smythe L.D, Leung L.K, 2005. Flying Foxes as Carriers of Pathogenic *Leptospira* species. *J. Wildlife Diseases* 41: 753-757
56. Cruz- Romero A, Romero –Salas D, Aguirre Ahugia C, ,Aguilar-Dominguez M and Bautista – Pina C, 2013 *African journal of Microbiology Research* vol 7 (6) pp. 1518-1521
57. Cullen P.A, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake D.A, Adler B, 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.*, 73:4853–4863
58. Cumberland P., Everard C.O.R., Wheeler J.G. and Levett P.N, 2001. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989 *European Journal of Epidemiology* 17: 601–608,
59. d’Andon M. F, Quellard N, Fernandez B, Ratet G, Lacroix – Lamande S, Vandewalle A and Boneca I. G, 2014. *Leptospira* Interrogans Induces Fibrosis in the Mouse Kidney Through Inos-Dependent, TLR – and NLR-Independent Signaling Pathways. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1): e2664. Doi:10.1371/journal.pntd.0002664
60. da Silva R.C, da Costa V.M, Shimabukuro F.H, Richini-Pereira V. B, Menozzi B. D, Langoni H, 2012. Frequency of *Leptospira* spp. in Sheep from Brazilian Slaughterhouses and its Association with Epidemiological Variables *Pesq. Vet. Bras.* 32(3): 194-198
61. de Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas V.L, Caló Romero E, Spinosa C, Arroyo Sanches M.C, da Silva M.V, Shikanai-Yasuda M.A, 2006. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Int Health.* 11(11):1699-707.
62. De Azevedo S.S, Soto F.R.M, de Moraes Z.M, Pinheiro S.R, Batista C. de S.A., Vuaden E. and Vasconellos S.A, 2008. The effects of the leptospiral infection on reproductive performance in sows *Veterinarski Arhiv* (1) :13-21.
63. de Bristo T, Brado M.J, Negreiros V.A, Nicastrì A.L, Sakata E.E, Yasuda P.H, Santos R.T, Alves V.A, 1992. Detection of *Leptospiral* Antigen (*L. interrogans* serovar *compenhageni* serogroup *icterohemorrhagiae*) by Immunoelectron Microscopy in the Liver and Kidney of Experimentally Infected Guinea Pigs. *Internatinal Journal of Experimental Pathology*, 73:633-642

64. de Daher E, de Abreu K.L.S and da Silva Junior G..B, 2010. Leptospirosis-associated acute kidney injury. *Journal Brasileiro de Nefrologia*, vol 32 (4): 400-407
65. de Faria M.T, Athanazio D.A, Ramos E.A.G, Silva E.F, Reis M.G, Ko A.I 2007. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection. *J Comp Path* 137 :231-238
66. Delbem A.C.B, de Freitas J.C, Bracarense A.P.F.R.L, Muller E.E, de Oliveira R.C, 2002. Leptospirosis in slaughtered sows: Serological and histopathological investigation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:174-177.
67. Dorjee S, Heuer C, Jackson R, West D.M, Collins-Emerson J.M, Midwinter A.C, Ridler A.L, 2009. Are white-spot lesions in kidneys in sheep associated with leptospirosis? *N Z Vet J*. 2009 Feb;57(1):28-33.
68. Dounghawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inwisai T, Sagarasaeranee P and Haake D. A, 2008. Early Diagnosis of Leptospirosis by Immunoglobulin M Immunoblot Testing. *Clinical and Vaccine Immunology*15(3): 492-498
69. Dutta T.K, Christopher M, 2005. Leptospirosis – An Overview. *J Assoc Physitians India*, Vol. 53;545-551
70. Effler P.V, Bogard A.K, Domen H.Y, Katz A.R, Higa H.Y and Sasaki D.M, . Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii,. *Journal of Clinical Microbiology* vol.40 no 4 1464-1469.
71. Ellis W.A, 1994. Leptospirosis as a Cause of Reproductive Failure Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 10(3):463-78.
72. Ellis W.A, 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
73. Escamilla P.H, Juan Martinez J, Medina M and Morales E, 2007. Frequency and causes of infectious abortion in dairy herd in Queretaro ,Mexico .*CanJ Vet Res*. 71(4) :314-317
74. Eslabao M.R, Dellagostin O.A., Cerqueira G.M.. 2010. LepBank: A *Leptospira* sequence repository and portal for phylogenetic studies .*Infection , Genetics and Evolution* 10:586-590.
75. Espi A., Prieto J.M., Fernandez M and Alvarez M, 2000. Serological Prevalence to Six Leptospiral Serovars in Cattle in Asturias (Northern Spain) *Epidemiol. Infect.* 124: 599 – 602

76. Everard C.O.R, Edwards C.N, Everard J.D, Carrington D.G, 1995. A twelve-year study of leptospirosis on Barbados European Journal of Epidemiology 11: 311-320, 1995.
77. Faber N.A, Crawford M, LeFebvre R.B, Buyukmihci N.C, Madigan J.E and Willits N.H, 2000. Detection of *Leptospira* spp in the Aqueous Humor of Horses With Naturally Acquired Recurrent Uveitis. J. Clin. Microb. 38(7): 2731-2733
78. Faine S, Adler B, Bolin C and Perolat P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd ed MediSci, Melbourne, Australia.
79. Fearnley C, Wakeley P.R, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C and Woodward M.J, 2008. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in Kidney tissue. Research in Veterinary Science 85: 8-16
80. Felt S.A, Wasfy M.O, El-Tras W.F, Samir A, Rahaman B.A, Boshra M, Parker T.M, Hatem M.E, El-Bassiouny A.A, Murray C.K and Pimentel G, 2011. Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla City, Gharbeiya Governorate, Egypt. Am J Trop Med Hyg, 84(3): 420-425
81. Flannery B, Costa D, Carvalho F.P, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva E.D, Ferreira A.G, Riley L.W, Reis M.G, Haake D.A and Ko A.I, 2001. Evaluation of Recombinant *Leptospira* Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of Leptospirosis J. Clin. Microbiol. 39(9): 3303-3310
82. Fornazari F, da Silva R.C, Richini-Pereira V.B, Beserra H.E.O, Luvizotto M.C.R and Langoni H, 2012. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp in Kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. Journal of Microbiological Methods, 90 321-326
83. Freitas J.C, da Silva F.G, de Oliveira R.C, Delbem A.C.B, Muller EE, Alves L.A and Teles P.S, 2004. Isolation of *Leptospira* spp from Dogs, Bovine and Swine Naturally Infected. Cienca Rural 34, 853-856
84. Gaumont R, Trap D, 1986. Leptospirosis in Domestic Animals in France: Current Situation. In: Ellis, W.A., Little, T.W.A. (Eds.), Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 179–184
85. Gebriel A.M, Subramaniam G, Sekaran S.D, 2006. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogenes. Trop Biomed.; 23(2):194-207

86. Goldstein R.E, 2010. Canine Leptospirosis, *Vet Clin Small Anim*, 40: 1091 - 1101
87. Goldstein R.E , Lin R.C, Langston C.E, Scrivani P., Erb H.N, Barr S.C, 2006. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J.Vet.Intern Med.* :20(3) 489-494
88. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone G.J, Van Eys G.J, Everard C.O, Hartskeerl R.A, Terpstra W.J, 1993. Detection of Seven Species of Pathogenic Leptospire by PCR Using Two Sets of Primers. *J Gen. Microbiol.* 139, 1691-1700
89. Grooms D.L, 2006. Reproductive Losses Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus and Leptospirosis. *Theriogenology* 66 624–628
90. Guitian F.J, Garcia-Pena F.J, Oliveira J, Sanjuan M.L, 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
91. Gupta A, Gulmar P.D, Srinivasan R, Kaliaperumar S, 2007. Bilateral Acute Keratouveitis in Leptospirosis: A new Entity. *Indian J Ophthalmol* 55:399
92. Haake D.A, 2006. Molecular Epidemiology of Leptospirosis in the Amazon. *PLoS* 3(8): e302. doi: 10.1371/journal.pmed.0030302
93. Hadjichristodoulou Ch, Papatheodorou Ch, Soteriades E., Panagakos G, Kastiris I, Goutziana G, Charvalos E, Tselentis Y, 1999. Epidemiological study of brucellosis in eight Greek villages using a Computerised Mapping Programme. *European Journal of Epidemiology* 15: 671-680
94. Hamir A.N, Hanlon C. A, Niezgoda M and Rupprecht C. E, 2001. The Relevance of Interstitial Nephritis and Leptospirosis in 283 Raccoons (*Procyon lotor*) from 5 Different Sites in the United States of America. *Can Vet J.* 42(11): 869-871
95. Hartskeerl R.A, Collares-Pereira M and Ellis W.A, 2011. Emergence, Control and Re-emerging Leptospirosis: Dynamics of Infection in the Changing World. *CI Microb and Inf.* 17: 494-501
96. Hartskeerl R.A and Terpstra G, 1996. Leptospirosis in wild animals. *The Veterinary Quarterly*, vol 18 (3): 149-150
97. Hathaway S.C, 1981. Leptospirosis in New Zealand: An Ecological View. *New Zealand Veterinary Journal*, 29(7): 109-112
98. Hauk P, Macedo F, Romero E.C, Vasconcellos S.A, de Moraes Z.M, Barbosa A.S, Ho P.L, 2008. In LipL32, The Major Leptospiral Immunogenic Domain

Mediates Interaction With Collagen IV and Plasma Fibronectin. *Infection and Immunity*. 76:2642-2650

99. He P, Sheng Y.-Y, Shi Y.-Z, Jiang X.-G, Qin J.- H, Zhang Z.-M, Zhao G.-P and Guo X-K, 2007 Genetic diversity among major endemic strains of *Leptospira interrogans* in China. *BMC Genomics* 8:204 : p1-13
100. Herath N.J, Kularatne S.A, Weerakoon K.G, Wazil A, Subasinghe N, Ratnatunga N.V, 2014. Long term outcome of acute kidney injury due to leptospirosis? A longitudinal study in Sri Lanka. *BMC Res Notes*. 25;7:398
101. Hernández-Rodríguez P , Díaz C.A, Dalmau E.A, Quintero G.M, 2011. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines *J Microbiol Methods*. 2011 Jan;84(1):1-7. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.021. Epub 2010 Oct 31.
102. Higgins R.J, Harbourne J.F, Little T.W, Stevens A.E, 1980. Mastitis and Abortion in Dairy Cattle Associated with *Leptospira* of the Serotype Hardjo. *Vet Rec.*, 107(13): 307 310
103. Hookey J.V, 1992. Detection of *Leptospiraceae* by Amplification of 16S Ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 90:267–274.
104. ILS (International Leptospirosis Society), 2001.
http://www.health.qld.gov.au/qhcss/lep_rep.asp, April 2013
105. (International Leptospirosis Society), 2003.
http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf, May, 2014
106. ILS (International Leptospirosis Society), 2014.
<http://cph.upm.edu.ph/node/288>, October 2014 ILS
107. Jansen A, Schoneberg I, Frank Ch. Alpers K, Schneider T and Stark Kalus 2005. Leptospirosis in Germany, 1962 – 2003. *Emerging Infectious Diseases*. 1:1048 - 1054
108. Jelastopulu E, Merikoulias G, Alexopoulos E.C, 2010. Underreporting of communicable diseases in the prefecture of Achaia, western Greece, 1999-2004 – missed opportunities for early intervention. *Euro Surveill*. 2010;15(21).
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle>.
109. Jimenez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo M.F, Rodríguez-Buenfil J.C, Ortega-Pacheco A, 2008. Serological Survey of Canine Leptospirosis in the Tropics of Yucatan Mexico Using Two Different Tests. *Acta Trop*. 2008 106(1): 22-26.
110. Johnson R.C, 1996. Chapter 35 *Leptospira*. *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston (TX); University of Texas Medical Branch at Galveston.

111. Johnson R.C, Faine S, 1984. Leptospiraceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 62–67.
112. Johnson R.C, Harris V.G, 1967. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire. I. Growth at Low Temperatures. J. Bacteriol., 94:27–31.
113. Jouglard S.D, Simionatto S, Seixas F.K, Nassi F.L, Dellagostin O.A, 2006. Nested polymerase chain reaction for the detection of pathogenic leptospire. Can J Microbiol 52(8):747-752
114. Karakasevic B, 1955. Leptospirosis Epidemic in Strumica (Greece & Yugoslavia). Z Hyg Infectioskr, 142:27-37
115. Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, Watanabe H, Aoyama A, 2008. Seroprevalence of Leptospirosis and Risk Factor Analysis in Flood-Prone Rural areas in Lao PDR. Am J Trop Med Hyg 78(6): 957-961
116. Kazuyo Y, Takamoto Y, Mayumi Okada, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R. 1993. Chemotaxis of Leptospire to Hemoglobin in Relation to Virulence. Infection and Immunity, p. 2270-2272 Vol. 61, No.
117. Kingscote B, 1985. Leptospirosis in Sheep in Western Canada Can Vet J. May 1985; 26(5): 164, 165-168.
118. Kirkbride C.A, Johnson M.W, 1989. Serologic Examination of Aborted Ovine and Bovine Fetal Fluids for the Diagnosis of Border Disease, Bluetongue, Bovine Viral Diarrhea and Leptospiral Infections J Vet Diagn Invest 1:132-138
119. Ko A.I, Goarant C, Picardeau M, 2009. Leptospira: the Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen Nature Reviews Microbiology 7: 736-747
120. Koizumi n., Watanabe H. 2005 Leptospirosis vaccines :Past, Present and future. Journal of Postgraduate Medicine Vol 51 ,No 3, : p 210-214.
121. Koteeswaran A, 2006. Seroprevalence of leptospirosis in man and animals in Tamilnadu. Indian J Med Microbiol, 24(4):329-331
122. Kruse H, Kirkemo A.M, Handeland K, 2004. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. Emerging Infectious Diseases Vol 10, 2067-72
123. Kwok, S, Higuchi, R, 1989. Avoiding False Positives With PCR. Nature 339, 237-238
124. Langoni H, De Souza L, C, Da Silva A.V, Cunha E. L.P, da Silva R. C, 2008. Epidemiological Aspects in 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.* 4(3): 190-199

125. Lantier. F, Stockhofe N, Blanco E, Simmons H, Williams J, Wisselink H, Balkema-Bushmann A, Partners NADIR, 2013. N A D I R, the European Network for Animal Diseases Infectiology Research Facilities One Health Summit 2013, One Health - One Planet - One Future, Risks and Opportunities GRF Davos 17 – 20 November 2013 in Davos, Switzerland
126. Lapointe C.,Plamondon I.,Dann M.2013 Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital *Can Vet J.*Vol 54: 497-499
127. Lau C.L, Smythe L.D, Craig S.B, Weinstein P, 2010. Climate Change, Flooding, Urbanisation and Leptospirosis: Fuelling the Fire? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 104(10). doi: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002. Epub 2010 Sep 1
128. Leal-Castellanos CB, Carcia-Suarez R, Gonzalez-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
129. Lehmann J.S, Matthias M.A, Vinetz J.M, Fouts D.E, 2014 . Leptospiral Pathogenesis *Pathogens* 3 :280-308
130. 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
131. LERG (The Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group) WHO 2009. http://www.who.int/zoonoses/diseases/Lerg_brochure.pdf, October 2009
132. 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
133. Levett P, Haake D.A, 2010. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Chapter 240. ed. Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin.—7th ed. Elsevier, USA
134. Levett P. N, 2004. Leptospirosis: A forgotten Zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews.* 4: 435-448

135. Levett N.P, 2003 Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 36 (4): 447-452.
136. Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza S.O, Rictzenhain L.J, Vasconcellos S.A, 2009. Identification of *Leptospira* spp. Carriers Among Seroactive Goats and Sheep by Polymerase Chain Reaction. *Research in Veterinary Science*, 87: 16-19
137. Lilenbaum W, Varges R, Brandao F.Z Cortez A, Souza S.O, Brandao P.E, Richtzenhain L.J Vansconcellos S.A, 2008. Detection of *Leptospira* spp in Semen and Vaginal Fluids of Goats and Sheep by Polymerase Chain Reaction. *Theriogenology* 69:837-842
138. Lilenbaum W. and Souza G.N, 2003 Factors associated with bovine Leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science* 75 : 249-251
139. Lilenbaum W, Ristow P, Fraguas S.A, da Silva E.D, 2002. Evaluation of a Rapid Slide Agglutination Test For the Diagnosis of Acute Canine Leptospirosis. *Rev Latinoam Microbiol* 44:124-128
140. Lucheis S. B and Ferreira Jr R. S, 2011. Ovine Leptospirosis in Brazil. *The Journ of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* &(4): 394-405
141. Magajevski F.S Scarcelli E.P, 2005. Detection of *Leptospira* spp in the Semen and Urine of Bulls Serologically Reactive to *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo, *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 43-47
142. Mahajan S, Chabra D, 2008. Leptospirosis: A Re-emerging Disease. *Veterinary World*, 1:182-185
143. Manoz F, Jarquin C, Gonzales A, Amador J, de los Reye's J, Jimenez R, Lamy F, Jiron N, Pinheiro F, 1995. Outbreak of Acute Febrile Illness and Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua *MMWR Morb Mortal wkly Rep* 44:841-843
144. Mariya R, Pallab Chaudhary A.A, Kumar E, Thangapandian R, Amutha S.K, Srivastava, 2006. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 29:269-277
145. Martinez R, Perez A, del Quinones M, Cruz R, Alvarez A, Armesto M, Fernandez C, Menendez J, Rodriguez N, 2004. Efficacy and Safety of a Vaccine Against Human Leptospirosis in Cuba. *Revista Panama de Salud Publica* 15:249-255;

146. Martins G and Lilenbaum W, 2014. Leptospirosis in Sheep and Goats under Tropical Conditions. *Trop Anim Health Prod.*, 46(1):11-17
147. Martins G, Penna B., Hamond C., Leite R. C.K, Silva A, Ferreira A, Brandao F, Oliveira F and Lilenbau W, 2012. Leptospirosis as the Most Frequent Infectious Disease Impairing Productivity in Small Ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 773 – 777
148. McIntyre W.I, Montgomery G.L, 1952. Renal Lesions in *Leptospira canicola* Infection in Dogs. *J Pathol Bacteriol* 64:145–160
149. Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G, 2002. Epidemiology of Leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop*, 54:7-10
150. Minas M, Gourgoulisanis C, Stournara A, 2007. Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in Greece. *Jpn J Infect Diseases*, 60:362-266
151. Mitchell D, Boulanger P, 1959. Leptospirosis in Canada: IV An Atypical Mastitis in Cattle Due to *Leptospira Pomona*. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 09/1959; 23(8):250-5.
152. Hajikolaie M. R. H, Ghorbanpour M, Abdollahpour G, 2006 Seroprevalence of Leptospiral Infection in Buffalo (*Bubalus Bubalis*) *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 341-344
153. Monahan A. M, Callanan J. J and Nally J. E, 2009. Host-Pathogen Interactions in the Kidney During Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol* 46: 792-799
154. Monahan A.M, Callanan J.J and Nally J.E, 2008. Proteomic Analysis of *Leptospira Interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. *Infect Immun* 76: 4952-4958
155. Monsuez J.J, Kidouche R, Le Gueno B, Postic D, 1997. Leptospirosis Presenting as Haemorrhagic Fever in Visitor to Africa, *Lancet* 349: 254-255
156. Moore G. E, Guptill L. F, Glickman N. W, Caldanaro R. J, Aucoin D and Glickman L. T, 2006. Canine Leptospirosis, United States, 2002–2004. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3): 501-503
157. Morey E.R, Galloway L. R, Bragg L. S, Steigerwalt G. A, Mayer W. L and Levett N. P, 2006. Species-Specific Identification of *Leptospiraceae* by 16s rRNA Gene sequencing. *Jour of Clinical Microbiology*, 3510-3516
158. Murray G.L, Srikan A, Hoke D.E, Wunder Jr E.A, Henry R.L.M, Zhang K, Sermswan R, Ko A, Adler B, 2009. The Major Surface Protein LipL32 is Not Required for Either Acute or Chronic Infection With *Leptospira Interrogans*. *Infection and Immunity* 77:952-958

159. Mylonakis M. E., Bourtzihatzopoulou E., Koutinas A. F., Petridou E., Saridomichelakis M. N, Leontides L, Siochu A, 2005. Leptospiral Seroepidemiology in a Feline Hospital Population in Greece Veterinary Record Vol. 156 Issue 19, p615
160. Naiman B.M, Alt D, Bolin C.A, Zuermer R, Baldwin C.L, 2001. Protective Killed *Leptospira Borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and Gamma Delta T lymphocytes. Infection and Immunity, 69:7550-7558
161. Nally J.E., Whitelegge J.P., Bassiliss S. Blanco D.R. and Lovett M.A, 2007. . Characterization of the Outer Membrane Proteome of *Leptospira interrogans* Expressed during Acute lethal Infection . Infection and Immunity vol 75, No 2: p. 766-773
162. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA 2005. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute Versus Chronic *Leptospira Interrogans* Infections. Infect Immun 73: 3251-3260
163. Narita M, Fujitani S, Haake D. A and Paterson D. L, 2005 Leptospirosis After Recreational Exposure To Water In The Yaeyama Islands, Japan Am J Trop Med Hyg 73(4): 652-656
164. Nascimento A.L, Ko A.I, Martins E.A, Monteiro-Vitorello C.B, Ho P.L, Haake D.A, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl R.A, Marques M.V, Oliveira M.C, Menck C.F, Leite LC, Carrer H, Coutinho L.L, Degraeve W.M, Dellagostin O.A, El-Dorry H, Ferro E.S, Ferro M.I, Furlan L.R, Gamberini M, Gigliotti E.A, Goes-Neto A, Goldman G.H, Goldman M.H, Harakava R, Jeronimo S.M, Junqueira-de-Azevedo I.L, Kimura E.T, Kuramae E.E, Lemos E.G, Lemos M.V, Marino C.L, Nunes L.R, de Oliveira R.C, Pereira G.G, Reis M.S, Schrieffer A, Siqueira W.J, Sommer P, Tsai S.M, Simpson A.J, Ferro J.A, Camargo L.E, Kitajima J.P, Setubal J.C, Van Sluys M.A, 2004. Comparative Genomics of two *Leptospira Interrogans* Serovars Reveals Novel Insights Into Physiology and Pathogenesis. J Bacteriol 186:2164–2172
165. 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
166. Natarajaseenivasan K, Boopalan M, Selvanayagi K, Suresh S.R, Ratnam S 2002. Leptospirosis Among Rice Mill Workers of Salem, South India. Jpn J Infect Dis 55:170-173
167. National Veterinary Services Laboratories 1987. Microtitre Technique for Detection of *Leptospira* Antibodies. Proc. U.S. Anim. Health Assoc., 91:65–73

168. Neves F. O. · Patricia A. E. Abreu S.A. Vasconcellos Z. de Moraes M, 2007. Identification of a novel potential antigen for early-phase serodiagnosis of leptospirosis. Nascimento Arch Microbiol 188:523–532
169. Ngbede E. O, Raji M. A, Kwanashie C. N, Okolocha E. C, 2013. Serosurvey of *Leptospira* spp Serovar Hardjo in Cattle from Zaria, Nigeria Revue Méd. Vét., 2013, 164, 2, 85-89
170. OIE, Terrestrial Manual 2014
171. OIE Terrestrial Manual 2008. Leptospirosis. Chapter 2.1.9, pp 251-264
172. Ooteman M.C, Vago A.R, Koury M.C, 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. Journal of Microbiological Methods, Vol. 65 (2) 247-257.
173. Ortega-Pacheco A, Colin-Flores R.F, 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
174. Palaniappan R, Ramanujam U, Subbupoongothai M., Chang, Y.F, 2007 . Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis. Current Opinion in Infectious Diseases Vol. 20-Issue 3 – p. 284-292
175. Palaniappan. B.U.M, Chang Y.F, Chang C.F, Pan M.J, Yang C.W, Harpending P, McDonough S.P, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B, 2005. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires . Molecular and Cellular Probes 19 : 111-117.
176. Pan American Health Organisation, 2014. Leptospirosis Fact sheet <file:///C:/Users/user/Downloads/Leptospirosis-Notas-Descriptivas-sem-fotos-eng.pdf>
177. Papa A, Theoharidou D, Antoniadis A, 2009. Pulmonary involvement and leptospirosis, Greece [letter]. Emerg Infect Dis. 15(5) May/12 /2009 <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/5/08-0270>
178. 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
179. Patarakul K, Lo M and Adler B, 2010. Global Transcriptomic Response of *Leptospira Interrogans* Serovar *Copenhageni* Upon Exposure to Serum *BMC Microbiology*, 10(31): 2-16
180. Peregrine A.S, Wayne Martin S, Douglas A, Hopwood, Duffield T.F.,, WcEwen B, Hobson J.C, Hetaia S.K, 2006. *Neospora caninum* and *Leptospira* serovar serostatus in dairy cattle in Ontario. Can Vet J Vol 47:p. 467-470

181. Petzetakis M, 1932. A Propos d'une Epidémie de Spirochétose Ictérohémorragique à l'île de Syra: Origine Hydrique del' Epidemic Presence des Spirochetes Chez les Rats d' Egout, en Grèce. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique 1932; 25:411-416
182. Plank R. and Dean D, 2000. Overview of the Epidemiology, Microbiology and Pathogenesis of *Leptospira* spp in Humans. Microbes and Infection 2:1265-1276
183. Pritchard D.G, 1986. National Situation of Leptospirosis in the United Kingdom. In: Ellis, W.A., Little, T.W.A. (Eds.), Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 221–233
184. Ratnam S, Sundararaj T and Subramanian S, 1983. Serological evidence of leptospirosis in a human population following an outbreak of the disease in cattle Trans R Soc Trop Med Hyg (1983)77 (1): 94-98.
185. Reis R.B, Ribeiro G.S, Felzemburgh R.D, Santana F.S, Mohr S, Melendez A.X, Queiroz A, Santos A.C, Ravines R.R, Tassinari W.S, Carvalho M.S, Reis M.G, Ko A.I, 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Apr 23;2(4):e228.
186. Revich B, Tokarevich N and Parkinson A. J, 2012. Climate Change and Zoonotic Infections in the Russian Arctic. Int J Circumpolar Health, 71: 18792
187. Ricaldi J.N and Vinetz J.M, 2006. Leptospirosis in the Tropics and in Travelers Cur infect. Dis.Rep. 8(1): 51-56.
188. Richardson D. Jand Gauthier J. L, 2003. A Serosurvey of Leptospirosis in Connecticut Peridomestic Wildlife. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 3(4): 187 193
189. Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost M.C, Lilenbaum W, Picardeau M, 2007. Biofilm Formation by Saprophytic and Pathogenic Leptospire. Microbiology 154:1309–1317
190. Ristow P, Bourhy P, McBride F.W.C, Figueira C.P, Huerre M, 2007. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. PLoS Pathog 3(7): e97. doi:10.1371/journal.ppat.0030097
191. Ruiz V.M, Vega L.E, Velazquez R.M, 2005. Use of polymerase chain reaction for the identification of *Leptospira* sp in urine of carriers. Rev Cubana Med Trop, 57(1):47-48
192. Saglam Y. S, Yener Z, Temur A and Yalcin E, 2008. Immunohistochemical Detection of Leptospiral Antigens in Case of Naturally Occurring Abortions in Sheep. Small Ruminant Research. 74: 119-122

193. Sakhaee E, Abdollahpour Gh. Bolourchi R, Hasani M, Tabatabayi A. M and Sattari T. S, 2007. Serologic and Bacteriologic Diagnosis of Bovine Leptospirosis in Tehran Suburb Dairy Farms Iranian. *Journal of Veterinary Research*, 8(4), Ser. 21:325-330
194. Sakolvaree Y, Maneewatch S, Jiemsup S, Klaysing B, Tongtawe P, Srimanote P, Saengjaruk P, Banyen S, Tapchaisri P, Chonsa-nguan M, Chaicumpa W. 2007. Proteome and immunome of pathogenic *Leptospira* spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 25(1):53-73
195. Salinas-Melendez J.A, Narvaez A.C, Riojas-Valdes V, Cantu-Covarrubas A, Avalos-Ramirez R and Segura-Correa J.C, 2007. Seroprevalence of Leptospirosis in Beef Cattle or Nuevo Leon, Mexico. *J. Animal and Veterinary Advances* 6: 1265 1268
196. Sambasiva R. R, Naveen G, Bhalla P and Agarwal S. k, 2003; Leptospirosis in India and the Rest of the World *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7(3):178-193
197. Sanders E.J, Rigau-Perez J.G, Smits H.L, Deseda C.C, Vorndam V.A, Aye T, Spiegel R.A, Weyant R.S, Bragg S.L, 1999. Increase of Leptospirosis in Dengue-Negative Patients After a Hurricane in Puerto Rico in 1966. *Am J. Trop Med Hyg*, 61:399-404
198. 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
199. Schreier S, Triampo W, Dounghawee G, Triampo D, Chadsutji S, 2009. Leptospirosis Research: Fast, Easy and Reliable Enumeration of Mobile Leptospire. *Biol Res* 42:5 12
200. Science.gov 2013 U.S. Federal Science.
<http://www.science.gov/topicpages/h/human+leptospirosis+caused.html>, June 2014
201. Scott B.C, Smythe L.D, Glenn C. G, Burns M.A, McMahon J. L, Dohnt M. F, Tulsiani S.M, McKay D.B, 2013 Haemoglobin and red cell counts in leptospirosis patients infected with different serovars *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 46(2)
202. Segawa T, Nomura K.H, Angelina S.Y, Villanueva M, Saito M, Gloriani K. N.N. G and Yoshida S, 2014. Identification of Leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Released in the Urine of Infected Hamsters, *BMC Microbiology*, 14:1321

203. Segers R.P, van der Drift A, de Nijs A, Corcione P, van der Zeijst B.A, Gaastra W, 1990. Molecular Analysis of a Sphingomyelinase C Gene from *Leptospira Interrogans* Serovar Hardjo. *Infect Immun* 58:2177–2185
204. Shekatkar S, Harish B.N, and Parija S.C, 2010. Diagnosis of Leptospirosis by polymerase chain reaction. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol.1/Issue-3
205. Shekatkar S, Acharya N.S, Harish B.N, Parija S.C, 2010. Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of leptospirosis. *Indian J Med Microbiol*; 28(3): 238-40
206. Sion M. L, Hatzitolios A. I, Armenakaa M.C, Toulisb E.N, Kalampalika D, Mikoudi K.D , 2002, Acute renal failure caused by leptospirosis and *Hantavirus* infection in an urban hospital *European Journal of Internal Medicine* Volume 13, Issue 4, June Pages 264–268
207. Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, Boonpuchnavig V, Boonpucknavig S, 1980. Pathogenesis of Renal Disease in Leptospirosis: Clinical and Experimental Studies. *Kidney Internat* 17:827-836
208. Sivaraman. S, Basheer Ahamad D , Krishnakumar K, Velavan A and Venagadabady N, 2013. Haemorrhagic Mastitis in a Gir Cow Due to *Leptospira* – A Case Report Supplement to *Advanced Bio Tech*. Vol. 12 (7 1): 411 - 412
209. Skufka J and Arima Y, 2012. Sex, Gender and Emerging Infectious Disease Surveillance: A Leptospirosis Case Study. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 3(3):37-39.
210. Slack A.T, Galloway R.L, Symonds M.L, Dohnt M.F, Smythe L.D, 2009. Reclassification of *Leptospira* Meyer Serovar Perameles to *Leptospira Interrogans* Serovar Perameles 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
211. Slack T, Symonds M.L, and. Smyt L.D, 2008. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998–2004. *Epidemiology and infection* 134(6): 1217-1225
212. Smythe L, Adler B, Hartskeerl R.A, Galloway R.L, Turenne C.Y, Levett P.N, 2013. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63(Pt 5):1859-1862.

213. Smythe L.D, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt M. F, Symonds M. L, Slack A. T, Apiwattanaporn A, Chueasuwanhai S, Day N. P and Peacock S. J. The Microscopic Agglutination Test (MAT) Is an Unreliable Predictor of Infecting *Leptospira* Serovar in Thailand Am J Trop Med Hyg vol. 81 no. 4 695-697
214. Soderland P, Lovekar S, Weiner D.E, Brooks D.R, Kaufman J.S, 2010. Chronic Kidney disease associated with environmental toxins and exposures. Adv Chronic Kidney Dis 17(3): 254-64
215. Soto F.R.M, de Azevedo S.S, de Moraes Z.M, Pinheiro S.R, Delbem A.C.B, Moreno A.M, Paixao R, Vuaden E.R and Vasconcellos S.A, 2006. Detection of Leptospirosis in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar canicola. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 582-586
216. Stamm L.V and Charon N.W, 1979. Plate assay for detection of *Leptospira interrogans* serovar pomona hemolysin. J Clin Microbiol.; 10(4):590-2
217. Sterling C.R, Thiermann A.B. 1981. Urban Rats as Chronic Carriers of Leptospirosis: an Ultrastructural Investigation. Vet Pathol 18:628–637
218. Subramaniam G.A.M and Sekaran S.D, 2006. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. Tropical Biomedicine, 23 (2): 194-207
219. Suwimonteeraburt J, Chaicumpa W, Saengjaruk P, Tapchaisri P, Chongsanguan M, Kalambaheti T, Ramasoota P, Sakolvaree Y and Virakul P, 2005. Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp in bovine urine samples. Am. J Vet Res, 66 (5):762-6
220. Szeredi L and Haake D.A, 2006: Immunochemical Identification and Pathologic Findings in Natural Cases of Equine Abortion Caused by Leptospiral Infection. Vet Pathol. 43: 755-761
221. Talbada M.D, Garvey N, Sprowls R, Eugster A.K, Vinetz J.M, 2003. Prevalence of Leptospirosis Infection in Texas Cattle: Implications for Transmission to Humans Vector-born and Zoonotic Diseases, 3:141-147
222. Taylor L.H, Latham S.M, Woodhouse M.E, 2001. Risk Factors for Human disease Emergence. Philos Trans R Soc Lond B. Biol Sci, 356Q 983-989
223. Thongboonkerd V, 2008. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. Mol Biosyst. Aug;4(8):810-5
224. The Center for Food Security and Public Health, 2013. Leptospirosis. Iowa State University, College of Veterinary Medicine

225. Tooloei M, Abdollahpour 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
226. Townsend W.M, Stiles J and Krohne S.G, 2006. Leptospirosis and Panuveitis in a Dog. *Veter Ophthalmol* 9:169-173
227. Trevejo R.T, Rigau-Perez J.G, Ashford J.J, de los Reyes J.O, Gonzalez A, Zaki S.R, Shieh W.J, McLean R.G, Nasci R.S, Weyant R.S, Bolin C.A, Braggs S.L, Perkins P.A, Spiegel R.A, 1998. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage. *J. Infect Dis* 178: 1457-1463
228. Turhan V and Karagoz E, 2013. Leptospiral Immunoproteins as Potential Elements for Diagnostic Tests and Vaccine Development. *Disease and Molecular Medicine*, 1 61-67
229. 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
230. Vemulapalli R, Langohr I.M, Sanchez A, Kiupel M, Bolin CA, Wu C.C, Lin T.L, 2005. Molecular Detection of *Leptospira Kirschneri* in Tissue of a Prematurely Born Foal. *J Vet Diagn Invest* 17:67-71
231. Vijayachari P, Sugunan A.P, Shriram A.N, 2008. Leptospirosis: An Emerging Global Public Health Problem. *J. Biosci*, 33:557-569
232. Vijayachari P, Hartskeerl R.A, Sharma S, Natarajaseenivasan K, Roy S, Terpstra W.J, Sehgal S.C, 2004. A Unique Strain of *Leptospira* Isolated From a Patient With Pulmonary Haemorrhages in Andaman Islands: A Proposal of Serovar Portblairi of Serogroup Sehgal. *Epidemiol. Infect.*, 132:663–673
233. Vinh T, Faine S and Adler B, 1984. Adhesion of *Leptospira* to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. *J Med Microbiol*, vol 18: 73-85
234. Visith S and Kearkiat P, 2005. Nephropathy in Leptospirosis. *J Postgrad Med.* ; 51(3):184-8
235. Wang Z, Jin L, Wegrzyn A, 2007. Leptospirosis Vaccines. *Microbial Cell Factories* 6:39 doi:10.1186/1475-2859-6-39
236. Wangroongsarb P., Teerarut C, Gunlabun K, Long D. H, Satheanmethakul P, Jetanadee S., Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Peacock S.J, Blacksell S. D, Smythe L.D, Bulach D.M & Kalambaheti T, 2007. Molecular typing of *Leptospira* spp. based on putative O-antigen polymerase gene (*wzy*), the benefit over 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 271 170–179

237. Wasiński B, 2007. Occurrence Of *Leptospira* Sp. Antibodies In Swine In Poland Bull Vet Inst Pulawy 51, 225-228
238. Werts C, Tapping R.I, Mathison J.C, Chuang T.H, Kravchenko V, Saint G. I, Haake D.A, Godowski P.J, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill D.M, Kirschning C.J, Wagner H, Aderem A, Tobias P.S, Ulevitch R.J, 2001. Leptospiral Lipopolysaccharide Activates Cells Through a TLR2-Dependent Mechanism. Nat Immunol 2:346–352
239. Whakatutuki H, 2007. New Zealand Ministry of Business, Innovation and Employment.
http://www.dol.govt.nz/publications/research/leptospirosis2007/leptospirosis2007_05.asp
240. Woo T.H, Smythe L.D, Symonds M.L, Norris M.A, Dohnt M.F, Patel B.K, 1997. Rapid Distinction Between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR Amplification of 23S Ribosomal DNA. FEMS Microbiol. Lett. 150:9–18.
241. WHO (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
242. WHO (World Health Organization) 2003. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. WHO Library Cataloguing in – Publication Data, ISBN 92 4 154589 5
243. WHO (World Health Organization), 2009.
http://www.who.int/zoonoses/diseases/Lerg_brochure.pdf, January 2010
244. Wuthiekanum V, Amornchai P, Paris D.H, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, Smythe L.D, White N.J, Day N.P.J, Limmathurotsakul D and Peacock S.J, 2013. Rapid Isolation and Susceptibility Testing of *Leptospira* spp Using a New Solid Medium, LVW Agar. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol 57 (1) 297-302
245. Yanagiharaa Y, Sharon Y.A.M, Villanuevaa Y.S, Okamoto Y, Toshiyuki M, 2007. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 30:399–413
246. Yang C. W, 2007. Leptospirosis Renal Disease: Understanding the Initiation by Toll Like Receptors. Kidney Int 72:918–925
247. Yang C.W, Hung C.C, Wu M.S, Tian YC, Chang C.T, Pan M.J, Vandewalle A, 2006. Toll-Like Receptor 2 Mediates Early Inflammation by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Proximal Tubule Cells. Kidney Int 69:815–822

248. Yang C.W, Wu M.S, Pan M.J, Hsieh W.J, Vandewalle A, Huang C.C, 2002. The *Leptospira* Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. *J Am Soc Nephrol* 13:2037–2045
249. Yang C.W, Wu M.S, Pan M.J, 2001. Leptospirosis Renal Disease. *Nephrol Dial Transplant* 16:(Suppl 5) 73–77
250. Zhong Y, Chang X, Xing-Jun C, Zhang Y, Zheng H, Zhu Y., Cai C, Cui Z, Zhang Y, Yuan-Yuan L, Xiu-Gao Jiang, Guo-Ping Zhao, Wang S., Li Y., Zeng R, Li X, Xiao-Kui Guo, 2011. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601 *Cell Research* 21:1210-1229

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Πίνακας 3: Αποτελέσματα Εργαστηριακής Διερεύνησης Δειγμάτων Υποπτών για Λεπτοσπείρωση

ID	Bio-rad kit	Ορότυποι MAT	PCR	Ιστολογική Διερεύνηση	Silver stain
1	Συσσωματώματα στην περιφέρεια				
2					
3					
4					
5			+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
6		Tarassovi 1/100	+	Άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα καθώς και σοβαρή διάμεση ίνωση, ατροφία των σωληναρίων, περιοχές με σκληρυντικές αλλοιώσεις των σωληναρίων	+
7					
8			+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	+
9				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
10				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
11	Συσσωματώματα		+		

	στην περιφέρεια				
12	Συσσωματώματα στην περιφέρεια				
13					
14		Tarassovi 1/100	+		
15					
16			+		
17					
18					
19					
20			+		
21					
22			+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά δηθήματα	
23	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις				
24		Tarassovi 1/200	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά δηθήματα	+
25					
26	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις			Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
27			+		
28				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
29		Tarassovi 1/400	+	Άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά	

				διηθήματα καθώς και σοβαρή διάμεση ίνωση, ατροφία των σωληναρίων, περιοχές με σκληρυντικές αλλοιώσεις των σωληναρίων	
30			+		
31			+		
32	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις				
33					
34	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις				
35			+	Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
36				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
37					
39		Autumnalis 1/400	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
40		Autumnalis 1/100			
42		Tarassovi 1/200	+	σοβαρή διάμεση ίνωση και ατροφία των σωληναρίων όπως και περιοχές με σκληρυντικές αλλοιώσεις των σωληναρίων	+
43					

44		Tarassovi 1/400 Autumnalis 1/100	+	Παρουσία εστιών αγγειίτιδας , άφθονα λεμφοκυτταρικά διηθήματα με μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση	
46	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Zanoni 1/100	+		
47	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
48	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Tarassovi 1/400 Autumnalis 1/100	+	Παρουσία εστιών αγγειίτιδας , άφθονα λεμφοκυτταρικά διηθήματα με μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση	
49	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Autumnalis 1/100		σοβαρή διάμεση ίνωση και ατροφία των σωληναρίων όπως και περιοχές με σκληρυντικές αλλοιώσεις των σωληναρίων	
50	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Tarassovi 1/100 bratislava 1/100	+	Άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα καθώς και σοβαρή διάμεση ίνωση, ατροφία των σωληναρίων, περιοχές με σκληρυντικές αλλοιώσεις των σωληναρίων	+
51	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα			Ηπια ατροφία των σωληναρίων	

52	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
53	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Autumnalis 1/100	+	Παρουσία εστιών αγγειίτιδας , άφθονα λεμφοκυτταρικά διηθήματα με μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση	
54	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
55	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
56	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Zanoni 1/100	+	Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
57	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
58	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Autumnalis 1/100			
59	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα				
60	Ψιλά αραχνοειδή συσσωματώματα	Autumnalis 1/100 Hardjio prajitno 1/200	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
61		Bataviae 1/100			
62		Zanoni 1/100	+	Παρουσία εστιών αγγειίτιδας , άφθονα λεμφοκυτταρικά διηθήματα με μέτριου βαθμού διάμεση ίνωση	

64	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις	Autumnalis 1/400	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
65	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις				
66	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις		+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
67	Μικρές διάχυτες ψιλές συγκολλήσεις				
68					
69		Hebdomadis 1/100			
70				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
72					
73		tarassovi 1/100 Zanoni 1/200	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
76	Αραχνοειδή συσσωματώματα με ελάττωση του αριθμού των λεπτοσπειρών		+		
77	Αραχνοειδή συσσωματώματα με ελάττωση του αριθμού των				

	λεπτοσπειρών				
78	Αραχνοειδή συσσωματώματα με ελάττωση του αριθμού των λεπτοσπειρών	Hebdomadis 1/200	+		
79	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
80	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
81	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
82	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
83	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
84	Αραχνοειδή συσσωματώματα στην περιφέρεια				
87	Αραχνοειδή συσσωματώματα με ελάττωση του αριθμού των λεπτοσπειρών	Autumnalis 1/800	+		
88	Αραχνοειδή συσσωματώματα με ελάττωση του				

	αριθμού των λεπτοσπειρών				
89	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
90	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
91	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
92	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
93	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
94	Αραχνοειδή συσσωματώματα	Tarassovi 1/200	+		
95	Συγκολλήσεις στην περιφέρεια με αραίωση του αριθμού των λεπτοσπειρών	Javanica 1/100	+		
96	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
97	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
98	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
99	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
10	Αραχνοειδή συσσωματώματα				
101	Διάσπαρτα αραχνοειδή συσσωματώματα	Javanica 1/200	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά δηθήματα	+

102				Ηπια ατροφία των σωληναρίων	
103	Διάσπαρτα αραχνοειδή συσσωματώματα				
104	Ύποπτες συγκολλήσεις στην περιφέρεια με μείωση του αριθμού των λεπτοσπειρών		+		
105					
106	Συγκολλήσεις στην περιφέρεια με μείωση του αριθμού των λεπτοσπειρών		+		
107					
108	Συγκολλήσεις στην περιφέρεια με μείωση του αριθμού των λεπτοσπειρών	Zanoni 1/200	+		
109		Zanoni 1/100	+	άφθονες εστίες αγγειίτιδας και λεμφοκυτταρικά διηθήματα	
110	Αραχνοειδείς διάχυτες		+		
Total	54	28	38	29	6