



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθ/ντής: Χατζηχριστοδούλου Χρήστος Καθηγητής

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ
ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΣΕ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΘΑΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΔΗΜΟΥΣ ΤΗΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ
ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΜΑΝΕΚΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθ/ντής: Χατζηχριστοδούλου Χρήστος Καθηγητής

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

***ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ
ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΣΕ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΘΑΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΔΗΜΟΥΣ ΤΗΣ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ
ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ***

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΜΑΝΕΚΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Δημήτριος Ι. Παπαγιάννης (Επίκουρος Καθηγητής Δημόσιας Υγείας, επιβλέπων)
2. Γεώργιος Σ. Ραχιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής Επιδημιολογίας και Επαγγελματικής Υγιεινής)
3. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου (Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας Διευθυντής Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας)

Τη διπλωματική εργασία αφιερώνω,

στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Οροεπιδημιολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα σε Δήμους της Κεντρικής Μακεδονίας.

Εισαγωγή: Η λεπτοσπείρωση θεωρείται μία από τις πιο διαδεδομένες ζωνόσους παγκοσμίως που επηρεάζει τόσο τα ζώα όσο και τους ανθρώπους. Η κλινική εκδήλωση ποικίλει και μπορεί να εμφανίζεται από υποκλινική έως σοβαρής μορφής κλινική που μπορεί να οδηγήσει έως τον θάνατο. Εμφανίζεται συχνά σε τροπικές ή ημιτροπικές χώρες αλλά και σε χώρες με εύκρατο κλίμα ιδιαίτερα σε θερμές και υγρές συνθήκες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Εξαρτάται άμεσα από τις επικρατούσες κοινωνικές-οικονομικές συνθήκες και παρουσιάζεται σε ανθρώπους και επαγγελματικές ομάδες που έρχονται σε επαφή τόσο με ζώα όσο και με περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη της. Στην Ελλάδα όπως και σε άλλες χώρες υποδιαγιγνώσκεται και συνήθως περιορίζεται συνήθως στην καταγραφή μόνο σοβαρών μεμονωμένων κρουσμάτων και σε περιορισμένες δημοσιεύσεις και αναφορές σε επιστημονικά περιοδικά.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η οροεπιδημιολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα στο δήμο Βέροιας. Επιλέχθηκε ως ομάδα μελέτης οι εργαζόμενοι στη καθαριότητα στο Δήμο Βέροιας διότι το αντικείμενο της εργασίας τους φέρνει αντιμέτωπους σε συνθήκες που ευνοούν την άμεση ή έμμεση έκθεση με το παθογόνο βακτήριο, ενώ ως ομάδα ελέγχου επιλέχθηκε μια ομάδα διοικητικών υπαλλήλων του Δήμου Βέροιας με πιθανότητα μικρότερης έκθεσης στη νόσο. Παράλληλα ο δήμος αποτελεί πυρήνα της αγροτικής και κτηνοτροφικής παραγωγής που συνδέονται συχνά με την επιδημιολογία της λεπτοσπείρωσης. Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα έχει σκοπό να συμβάλει στην καταγραφή και ανάδειξη της παρουσίας της ζωνόσου.

Μέθοδος-Υλικό: Δύο ομάδες εργαζόμενων του Δήμου Βέροιας κλήθηκαν να συμμετάσχουν, η μια ομάδα περιλάμβανε διοικητικούς υπαλλήλους του Δήμου Βέροιας και η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε εργαζόμενους στην καθαριότητα του ίδιου Δήμου. Διενεργήθηκαν στο σύνολο 80 φλεβοπαρακεντήσεις συλλογής ολικού αίματος με παράλληλη συμπλήρωση ερωτηματολογίου. Η εργαστηριακή μέθοδος ELISA χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση IgG αντισωμάτων στον ορό του αίματος.

Αποτελέσματα: Ο ορό επιπολασμός της λεπτοσπείρωσης που παρατηρήθηκε μεταξύ των εργαζόμενων στη συγκομιδή απορριμμάτων ήταν σε ποσοστό 8%

Συμπεράσματα: Οι 4 οροθετικοί (8%) μεταξύ των 50 εργαζόμενων στην συγκομιδή απορριμμάτων φανερώνει τόσο την παρουσία της λεπτοσπείρωσης όσο και την πιθανή συσχέτιση η εργασία να αποτελεί την πηγή μετάδοσης της νόσου και μπορεί να αποτελέσει την αρχή για περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα.

Περιορισμοί της μελέτης: Υπάρχουν κάποιοι σοβαροί περιορισμοί στη μελέτη μας όπως η ποσότητα του δείγματος (μικρή) αλλά και ο εστιασμός της ομάδας μελέτης σε ένα Δήμο της ευρύτερης περιοχής της Μακεδονίας, ενώ το ποσοστό απόκρισης των συμμετεχόντων στη μελέτη 63% δεν θα πρέπει να αγνοηθεί.

Λέξεις Κλειδιά: Λεπτοσπείρωση, λεπτόσπειρα, ELISA, εργαζόμενοι στην συγκομιδή απορριμμάτων, επαγγελματική έκθεση

ABSTRACT

Title: Seroepidemiological investigation of leptospirosis in solid waste workers in the municipalities of Central Macedonia.

Introduction: Leptospirosis considered one of the most widespread zoonosis in world that affects both animals and humans. Clinical manifestation varies and may range from a subclinical to a severe clinical setting that can lead to death. It occurs often in tropical or semi-tropical countries but also in temperate countries particularly in hot and humid conditions during the summer months. It depends directly on the prevailing social and economic conditions and presented to people and professional groups that exposed to both animals and an environment that favors its development. In Greece, as in other countries, it is under-diagnosed and usually limited to the recording of only serious single cases and to limited publications and references to scientific journals

Purpose: This diploma thesis conducted with the purpose of seroepidemiological investigation of leptospirosis in solid waste workers in the municipality of Veria. The research has focused on individuals whose subject matter confronted with conditions that imply direct or indirect exposure to the pathogenic bacterium. At the same time, the municipality is the core of agricultural and livestock production that is often associated with leptospirosis epidemiology. In conclusion, this research aims to contribute to the recording and highlighting of the presence of the zoonosis

Methods: The seroprevalence cohort study of the disease investigated between two groups of participants, one group comprising administrative staff of the Municipality of Veria (control group) and the other group comprising solid waste workers of the same municipality (study group). 80 venue inquiries were carried out with the completion of a questionnaire. The ELISA assay used to detect blood serum IgG antibodies.

Results: The prevalence of leptospirosis, which observed among solid waste workers, was 8%.

Conclusion: The 4 (8%) seropositive among the 50 solid waste workers in a municipality reveal both the presence of leptospirosis and the likelihood that work is the potential source of disease transmission and may be the basis for further investigation into a larger sample

Limitations: There are some several limitations to our study, such as the size of sample (small) and the group of participants also only of one municipality of the wider region of Macedonia, while the response rate of the participants in the study 63% should not be ignored.

Keywords: Leptospirosis, leptospira, ELISA, solid waste workers, occupational exposure

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----------|
| <u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u> | Σελ. i |
| <u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ</u> | Σελ. iii |
| <u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</u> | Σελ. iv |

| | |
|------------------------------|--------|
| <u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> | Σελ. 1 |
|------------------------------|--------|

Α.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|---|---------|
| 1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 2 |
| <i>1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑ</i> | Σελ. 2 |
| <i>1.1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑΣ</i> | Σελ. 3 |
| <i>1.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑΣ</i> | Σελ. 5 |
| 2. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ | Σελ. 7 |
| 3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 9 |
| 4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 22 |
| 5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 25 |
| 6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 32 |
| <i>6.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ</i> | Σελ. 33 |
| <i>6.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ</i> | Σελ. 34 |
| <i>6.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ</i> | Σελ. 35 |
| <i>6.4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ</i> | Σελ. 38 |
| 7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 44 |
| 8. ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ | Σελ. 45 |

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. ΣΚΟΠΟΣ.....Σελ. 49

10. ΜΕΘΟΔΟΣ.....Σελ. 49

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....Σελ. 56

12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....Σελ. 63

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....Σελ. 66

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....Σελ. 77

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας: «Οροεπιδημιολογική διερεύνηση της Λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα σε Δήμους της Κεντρικής Μακεδονίας» στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στην περάτωση της που σημαίνει την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτριο Παπαγιάννη για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, την πολύτιμη υποστήριξη και επιστημονική καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία και συμπαράσταση, που συνέβαλαν τα μέγιστα στην ολοκλήρωσή της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Ραχιώτη, για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου την εξαιρετική συνεργασία, την επιστημονική καθοδήγηση, τόσο για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας όσο καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δήμο Βέροιας και ιδιαίτερα τον αντιδήμαρχο καθαριότητας κ. Βασίλη Παπαδόπουλο, τον προϊστάμενο καθαριότητας κ. Ιορδάνη Κηρικηρίδη για την παραχώρηση της άδειας, την άψογη συνεργασία και την διευκόλυνση του εγχειρήματος αλλά και τους συμμετέχοντες που έλαβαν μέρος.

Τέλος θα ήθελα το λιγότερο να ευχαριστήσω θερμά τους οικείους μου, φίλους, συμφοιτητές και ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κατηγορίες των ειδών του γένους
Leptospira.....Σελ.5

Πίνακας 2. Υλικά που εμπεριέχονται στο kit SIRION ELISA classic Leptospira
IgG.....Σελ.53

Πίνακας 3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των εργαζόμενων στο Δήμο
Βέροιας.....Σελ.57

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά και επιπολασμός Anti-Leptospira IgG στο υπό μελέτη
δείγμα.....Σελ.63

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Κατανομή των μέτρων προστασίας κατά τη διάρκεια της εργασίας.....Σελ.58

Γράφημα 2. Κατανομή του αριθμού των συνηθειών που ακολουθούν κατά τη διάρκεια της εργασίας.....Σελ.59

Γράφημα 3. Απεικόνιση της ύπαρξης κατοικίδιου ζώου μεταξύ των εργαζόμενων...Σελ.60

Γράφημα 4. Κατανομή της ενασχόλησης των ερωτηθέντων με αγροτικές δουλειές..Σελ.60

Γράφημα 5 . Γραφική απεικόνιση της κατανομής των αποτελεσμάτων.....Σελ.61

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λεπτοσπείρωση είναι μια μολυσματική ασθένεια που προκαλείται από το παθογόνο βακτηρίδιο σπειροχαίτες του γένους λεπτόσπειρα (*Leptospira* spp) και θεωρείται μία από τις πιο διαδεδομένες ζωνόσους στο κόσμο(Vijayachari et al., 2008).

Εμφανίζεται πιο συχνά σε τροπικές περιοχές κατά τη διάρκεια όλου του έτους, καθώς επίσης και σε εύκρατες ζώνες κατά τη διάρκεια ζεστών και υγρών περιόδων και καταγράφονται κρούσματα τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες.

Οι άνθρωποι μολύνονται συνήθως μέσω από τη λύση της συνέχειας του δέρματος και των βλεννογόνων ή την άμεση επαφή με το έδαφος ή το νερό που είναι μολυσμένα με τα ούρα και με μολυσμένο ζωικό ιστό που περιέχουν τον παθογόνο μικροοργανισμό.

Παραδοσιακά έχουν αναφερθεί ότι μεγαλύτερο κίνδυνο για λοίμωξη από λεπτόσπειρα διατρέχουν κατηγορίες ανθρώπων που είτε εργάζονται είτε έρχονται σε καθημερινή έκθεση στον παθογόνο παράγοντα. Τέτοιες αφορούν επαγγέλματα όπως οι εργαζόμενοι στον τομέα του κρέατος, οι αγρότες, οι εργάτες αποχέτευσης, οι ανθρακωρύχοι, οι εργάτες στην καθαριότητα και οι αλιείς αλλά επίσης υπάρχουν αναφορές για ανθρώπους που ασχολούνται με θαλάσσια αθλήματα, δραστηριότητες και έχουν προσβληθεί από λεπτόσπειρα. Τα πιο γνωστά υπόδοχα είναι τα τρωκτικά αλλά και είδη θηλαστικών όπως σκύλοι, πρόβατα, βοοειδή που συχνά χωρίς να έχουν εκδηλώσει κάποια συμπτώματα.

Τα συμπτώματα της λεπτοσπείρωσης μπορεί αρχικά να εκδηλωθούν με ήπια μορφή την ανικτερική όπως κεφαλαλγία, ρίγη, πυρετό, κακοδιαθεσία και μυαλγία και με βαριά μορφή την ικτερική όπως ίκτερο και υψηλό πυρετό που στη περίπτωση αυτή η μη έγκαιρη και αποτελεσματική περίθαλψη μπορεί η λοίμωξη να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο για τον ασθενή.

Συχνά η λεπτοσπείρωση έχει υποδιαγνωστεί λόγω ότι τα συμπτώματά της ειδικά στην ήπια μορφή μιμούνται τα συμπτώματα άλλων μη σχετιζόμενων λοιμώξεων, επομένως είναι δύσκολη η άμεση ταυτοποίηση και καταγραφή της. Πάραυτα έχει εκτιμηθεί ότι η

συνολική εμφάνιση των περιπτώσεων που προσβλήθηκαν από λεπτοσπείρωση παγκοσμίως είναι περίπου 1 εκατομμύριο με περίπου 60.000 θανάτους ετησίως(Costa et al., 2015).

Για την οροεπιδημιολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης στους εργαζόμενους στην καθαριότητα του Δήμου Βέροιας θα χρησιμοποιηθεί η ορολογική μέθοδος ELISA για τον προσδιορισμό ανθρωπίνων αντισωμάτων IgG στον ορό του αίματος.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑ

Η λεπτοσπείρωση πρώτη φορά αναφέρθηκε και μελετήθηκε συστηματικά από τον Adolf Weil το 1886 ως μια νόσος αιμορραγική και εμπύρετη που συνήθως συνοδεύεται από νεφρική ανεπάρκεια. Προς τιμήν του ονομάζεται επίσης ως η νόσος του Weil(Faine et al., 1999). Το 1907 ο Stimson παρατήρησε την παρουσία σπειρωχαιτών στα νεφρά ενός ασθενούς που πέθανε λόγω κίτρινου πυρετού, ονομάζοντας τα Spirochaeta interrogans λόγω της μορφολογίας τους καθώς ήταν όμοια με ερωτηματικό(Stimson 1907).

Περίπου μια δεκαετία μετά ο Inada και οι συνεργάτες του αναφέρονται στον αιτιολογικό παράγοντα, τον τρόπο μόλυνσης αλλά και θεραπείας της νόσου του Weil σε μια προσπάθειά τους για απομόνωση και μελέτη του παθόγονου μικροοργανισμού(Inada et al., 1916). Η δημοσίευση του Inada και των συνεργατών καταγράφηκε το 1915 στην Ιαπωνία, όπου στην έρευνά τους ανέφεραν την παρουσία λεπτοσπείρωσης στο ήπαρ ενός ινδικού χοιριδίου προερχόμενο από την προσβολή από αίμα ασθενή με νόσο του Weil. Στην Ευρώπη κατά τη διάρκεια του Α Παγκοσμίου Πολέμου παρατηρήθηκε μεγάλη έξαρση κρουσμάτων της νόσου του Weil, όπου τον Οκτώβριο του 1915 σχεδόν παράλληλα δύο ομάδες γερμανών ερευνητών ταυτοποίησαν την μετάδοση της λεπτοσπείρωσης(Levett 2001).

Από τις πρώτες αυτές παρατηρήσεις αλλά και από της σημαντικής σημασίας των συμπτωμάτων που μπορεί να προκαλέσει το παθογόνο τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, αν δεν διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί έγκαιρα, έγινε σαφές η επίπτωση και η σημαντικότητα της νόσου για τη δημόσια υγεία.

Η άμεση διάγνωση και καταγραφή της νόσου συναντάει σημαντικά εμπόδια πρώτον διότι τα πρώτα συμπτώματα της νόσου συχνά μπορούν να αποδοθούν και σε άλλα νοσήματα λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων και δεύτερον η καταγραφή και ταυτοποίηση της νόσου καθίσταται δύσκολη ή ελλιπής λόγω είτε της μη κατάλληλης οργάνωσης είτε λόγω της έλλειψης τεχνογνωσίας και σύγχρονων μεθόδων ταυτοποίησης της νόσου. Αυτό παρακίνησε τους ερευνητές για την περαιτέρω μελέτη και διερεύνηση της δομής, μορφολογίας αλλά και του γένους *Leptospira* και των διάφορων οροτύπων.

Επίσης το γεγονός ότι η λεπτοσπείρωση αποτελεί μια ζωνόσο με κρούσματα αλλά και επιδημίες(Βραζιλία, ΗΠΑ, Ινδία, Νικαράγκουα, Ασία)(Levett 2001) που έχουν καταγραφεί σε παγκόσμια κλίμακα έχει κινητοποιήσει τόσο τους φορείς υγείας κάθε χώρας για την καταγραφή και αντιμετώπιση της νόσου όσο και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας μέσω της οργάνωσης και δημιουργίας του *Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group*. Ενός φόρεα που επωμίζεται τη συγκέντρωση και καταγραφή πληροφοριών της λεπτοσπείρωσης σε παγκόσμιο επίπεδο και σε παράλληλη συνεργασία με τους φορείς και οργανισμούς κάθε χώρας, στοχεύοντας παράλληλα στον έλεγχο και την πρόληψη της νόσου της λεπτοσπείρωσης με απώτερο σκοπό την μείωση των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία(Ridder et al., 2010).

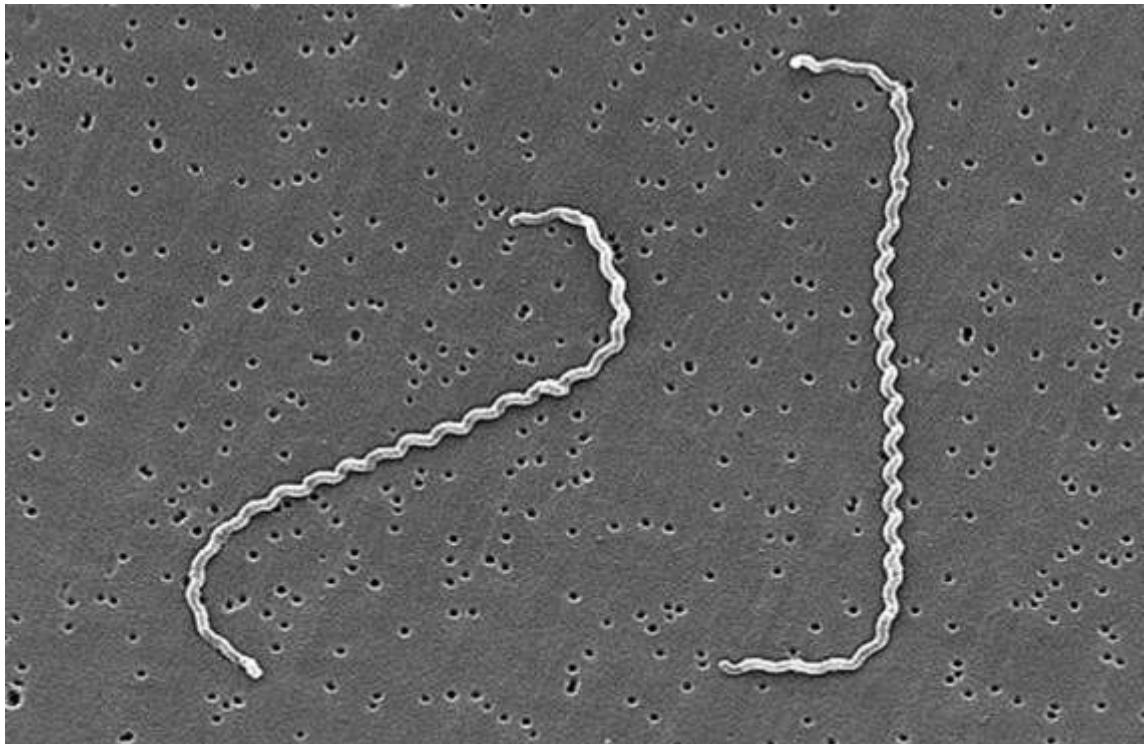
1.1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑΣ

Η λεπτόσπειρα είναι ένα Gram (-) βακτήριο με σπειροειδές σχήμα, όπου οφείλει και το όνομά της λόγω του σχήματος, «λεπτή» και «σπείρα» με περίπου διάμετρο 0,1μm και μήκος 6-20μm, του γένους *Leptospira* που ανήκει στην οικογένεια *Leptospiraceae* της τάξης των *Spirochaetales*(Εικόνα 1)(Faine et al., 1999).

Η λεπτόσπειρα παρουσιάζει την τυπική δομή διπλής μεμβράνης όπου συναντάται από κοινού σε άλλους σπειροχαίτες. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη συνδέεται και

επικοινωνεί με την στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης όπου περιβάλλονται από την εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και από λιποπρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο για την λειτουργία του βακτηρίου. Μια τέτοια κατηγορία πρωτεΐνων είναι οι λιποπολυζακχαρίτες (LPS), οι οποίοι αποτελούν το κύριο αντιγόνο για την λεπτόσπειρα και θεωρούνται δομικά και ανοσολογικά παρόμοιοι με τους LPS από τους άλλους Gram αρνητικούς οργανισμούς αλλά έχουν χαμηλότερη ενδοτοξική δραστηριότητα.(Shimizu et al., 1987, Palaniappan et al., 2007, Adler & Moctezuma 2010).

Κατά την παρατήρηση της λεπτόσπειρας από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαφαίνονται τα αιχμηρά άκρα της τα οποία είτε το ένα είτε και τα δύο κάμπτονται σε σχήμα άγκιστρου (ερωτηματικού). Υπεύθυνες για την κινητικότητα της λεπτόσπειρας θεωρούνται δύο περιπλασματικές βλεφαρίδες που εκτείνονται στον περιπλασματικό χώρο. Η εμφάνιση και η κινητικότητα της λεπτόσπειρας ποικίλλουν ανάλογα με την φύση του μέσου στο οποίο καλλιεργούνται(Bharti et al., 2003). Για την άμεση παρατήρησή τους απαιτείται η χρήση μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου ή αντίθεσης φάσης όπου το βακτήριο απεικονίζεται πιο ευδιάκριτα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λόγω της λεπτής μορφολογίας και έντονης κινητικότητας του βακτηρίου κατά την παρατήρησή του.



Εικόνα 1. Απεικόνιση Leptospira interrogans που ξεχωρίζουν χαρακτηριστικά το σπεροειδές σχήμα και τα άκρα σε σχήμα άγκιστρου.(πηγή CDC/NCID/Rob Weyant)

Οι λεπτόσπειρες είναι υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί που παράγουν τόσο καταλάση όσο και οξυδάση και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους ορίζεται από 28 έως 30°C. Μπορούν να επιβιώσουν σε υγρό περιβάλλον, όπως στα έλη, στα ρέματα, στα ποτάμια, στη λάσπη και στο έδαφος, αλλά εντοπίζονται και σε διάφορους ιστούς και όργανα ζωντανών ή νεκρών οργανισμών. Αναπτύσσεται σε θρεπτικά υποστρώματα εμπλουτισμένα με βιταμίνες B1 και B12, λιπαρά οξέα μακράς αλύσου και άλατα αμμωνίου. Τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου χρησιμοποιούνται ως μοναδική πηγή άνθρακα και μεταβολίζονται από την β-οξειδωση(Levett 2001, Haraji et al., 2011).

1.1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑΣ

Οι σπειροχαίτες αποτελούν ένα είδος βακτηρίων που διαιρούνται σε δύο κατηγορίες οικογενειών τις Spirochaetaceae και Leptospiraceae. Το γένος *Leptospira* ανήκει στην οικογένεια Leptospiraceae και αποτελεί τον παθογόνο παράγοντα που προκαλεί την νόσο της λεπτοσπείρωσης.

Αρχικά για την ταξινόμηση και τον διαχωρισμό του γένους *Leptospira* χρησιμοποιήθηκε ο διαχωρισμός με βάση την παθογένεια που προκαλούσαν στον άνθρωπο και τα ζώα. Με βάση αυτό το κριτήριο το γένος *Leptospira* διαχωρίζεται σε δύο είδη:το παθογόνο είδος *Leptospira interrogans* και το μη παθογόνο είδος *Leptospira biflexa*(Levett 2001). Οι παθογόνοι ορότυποι που έχουν απομονωθεί αποτέλεσαν το κριτήριο για το διαχωρισμό και την ταξινόμηση σε παθογόνο είδος.

Με την ραγδαία εισαγωγή νέων και σύγχρονων μοριακών μεθόδων ανάλυσης και μελέτης του γονιδιώματος του βακτηρίου πλέον εισάγονται συνεχώς νέα δεδομένα και γνώσεις στην ταξινόμηση και στην ονοματολογία του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με τις νέες μοριακές τεχνικές και δεδομένα πάνω στο γενετικό προσδιορισμό του γένους *Leptospira* πλέον αναγνωρίζονται και κατηγοριοποιούνται βασισμένοι στο 16S rRNA γονιδίωμα τρεις μεγάλες κατηγορίες που αποτελούνται από τα εξής 14 παθογόνα ή μέτριας παθογένειας είδη που αποτελούν την πρώτη και τη δεύτερη κατηγορία, 9 στην

πρώτη κατηγορία, 5 στη δεύτερη και 7 μη παθογόνα είδη, που αποτελούν την τρίτη κατηγορία γνωστή ως σαπρόφυτα(Lehmann et al., 2014)(Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κατηγορίες των ειδών του γένους *Leptospira*.

| Παθογόνα Είδη | Μέσης Παθογένειας Είδη | Μη Παθογόνα Είδη |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Leptospira. Kirschneri</i> | <i>Leptospira licerasiae</i> | <i>Leptospira meyeri</i> , |
| <i>Leptospira interrogans</i> | <i>Leptospira wolffii</i> | <i>Leptospira terpstrae</i> |
| <i>Leptospira noguchii</i> | <i>Leptospira broomii</i> | <i>Leptospira biflexa</i> |
| <i>Leptospira borgpetersenii</i> | <i>Leptospira inadai</i> | <i>Leptospira vanthielii</i> |
| <i>Leptospira alexandari</i> | <i>Leptospira fainei</i> | <i>Leptospira yanagawae</i> |
| <i>Leptospira weilii</i> | | <i>Leptospira wobachii</i> , |
| <i>Leptospira santarosai</i> , | | <i>Leptospira idonii</i> |
| <i>Leptospira kmetyi</i> | | |
| <i>Leptospira alstoni</i> | | |

Συνολικά στα είδη του γένους *Leptospira* που αναφέρθηκαν έχουν καταγραφεί περισσότεροι από 250 ορότυποι, όπου έχουν αναγνωριστεί από κάποιους ερευνητές 23 αντιγονικές ομάδες(Morey et al., 2006), ενώ από κάποιους άλλους ερευνητές καταγράφηκαν 24 αντιγονικές ομάδες(WHO 2003).

Ωστόσο συχνά συναντάται, κατά την μοριακή ταξινόμηση των παθογόνων οροτύπων στα αντίστοιχα παθογόνα είδη, η παρουσία ενός παθογόνου ορότυπου που μπορεί να ανήκουν σε περισσότερα από ένα είδη και δεν είναι αναγκαστικά μόνο παθογόνα, μέσης παθογένειας ή μη παθογόνα(Cerqueira & Picardeau 2009).

Μέσω της μοριακής ταξινόμησης των οροτύπων του γένους *Leptospira* αναγνωρίστηκαν τα λεγόμενα «genomospecies» τα οποία δεν αντιστοιχούν στα προηγούμενα είδη. Η συνύπαρξη των δύο ταξινομήσεων δεν προκαλεί σύγχυση στους ερευνητές καθώς και τα

δύο είδη όπως το *L. Interrogans* και το *L. biflexa* που αποτελούν παθογόνα είδη στην φαινοτυπική ταξινόμηση, επίσης αποτελούν γένομοςpecies κατά την μοριακή ταξινόμηση. Τελικά όπως διαφαίνεται λόγω των νέων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του γένους *Leptospira*, η μοριακή ταξινόμηση θα αντικαταστήσει την φαινοτυπική ταξινόμηση (Levett 2001, Haraji et al., 2011).

2. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ

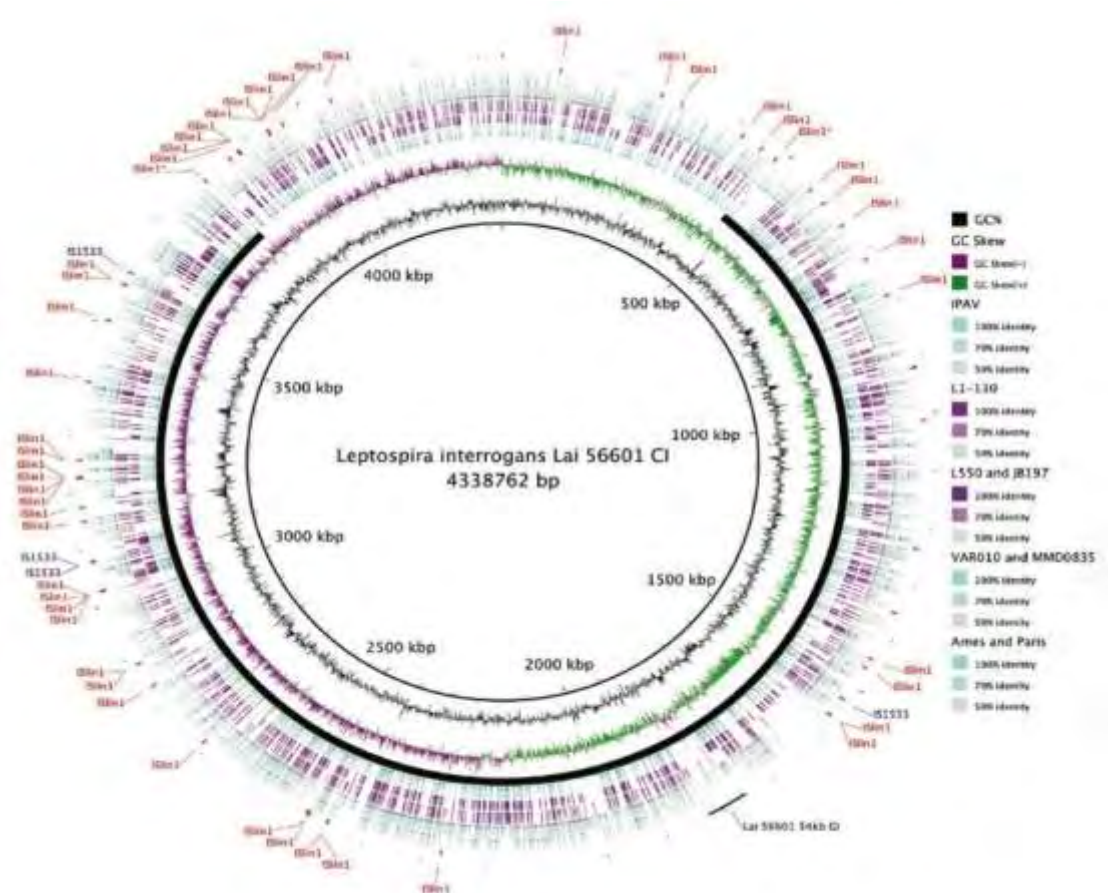
Το γονιδίωμα της λεπτόσπειρας σχετίζεται φυλλογενετικά με τις άλλες σπειροχαίτες, με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 3,9 και 4,6 Mbp και χαρακτηρίζεται από περιεκτικότητα σε G + C περίπου 35-42 mol% ανάλογα με το είδος της λεπτόσπειρας (Paster et al., 1991, Adler & Moctezuma 2010) (Εικόνα 2).

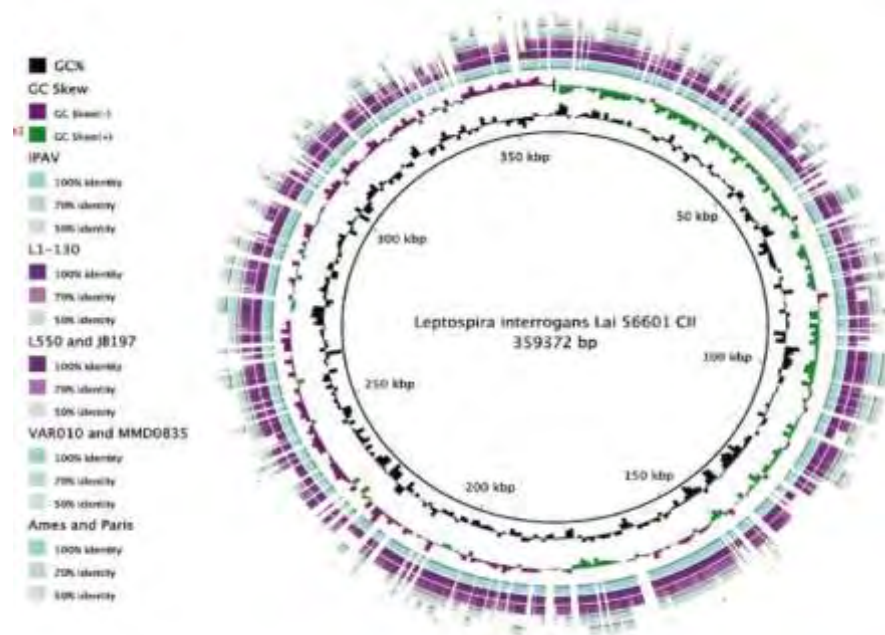
Το γονιδίωμα του γένους λεπτόσπειρα αποτελείται από δύο κυκλικά τμήματα, το μεγάλο χρωμόσωμα με μέγεθος 4.400 kb και το μικρότερο χρωμόσωμα με μέγεθος 350 kb (Εικόνα 2). Επίσης ένα ακόμα μικρότερο κυκλικό τμήμα έχει ταυτοποιηθεί, που συναντάται μόνο στην *L. biflexa* με αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος και ονομάζεται p74 (με μέγεθος 74 kb και περιεκτικότητα σε GC 36 mol%). Η λεπτόσπειρα αποτελείται από δύο ομάδες rRNA τα γονίδια 16S, 23S rRNA και ένα ή δύο 5S rRNA γονίδια, που σε σύγκριση με άλλα βακτήρια δεν συναντώνται στενά συνδεδεμένα, αλλά είναι ευρέως διάσπαρτα στο μεγάλο χρωμόσωμα (Girons et al., 1992, Cerqueira & Picardeau 2009).

Οι ακολουθίες του γονιδιώματος της λεπτόσπειρας που έχουν καταγραφεί αποτελούνται από δύο στελέχη του ορότυπου *L. borgpetersenii* και Hardjo, δύο ορότυπους Lai και Copenhageni του *L. interrogans* και δύο στελέχη του ορότυπου *L. biflexa* Patoc. (Nascimento et al., 2004, Lehmann et al., 2014)

Οι σύντομες αλληλουχίες εισαγωγής (IS) αποτελούν μικρές αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν τις τρανσποζάσες. Έχουν μήκος 700 έως 2500 bp και κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναγκαίες για μεταφορά. Μεγαλύτερος αριθμός των IS έχουν καταγραφεί στο παθογόνο είδος της λεπτόσπειρας, χαρακτηριστικό παράδειγμα τα IS1500, IS1501,

IS153 και ISLin1 (Zuerner 1994, Boursaux-Eude et al., 1995, Zuerner & Trueba 2005, Lehmann et al., 2014) (Εικόνα 2). Αντίθετα ελάχιστα έχουν καταγραφεί στα μέσης παθογένειας είδη ή στα σαπρόφυτα. Οι αλληλουχίες IS είναι υπεύθυνες και παίζουν ρόλο στην αδρανοποίηση, διαγραφή, και αναδιάταξη του γενετικού υλικού μέσω της μεταφοράς ή με ομόλογο ανασυνδυασμό.





Εικόνα 2. Απεικόνιση και σύγκριση ολόκληρου του γονιδιώματος των *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. licerasiae* και *L. biflexa*. (πηγή (Lehmann 2014))

Στη λεπτόσπειρα δεν έχει ανιχνευθεί η παρουσία φυσικών πλασμιδίων και οι μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των λεπτόσπειρων δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, καθιστώντας το γενετικό χειρισμό της λεπτόσπειρας αρκετά δύσκολο. Ωστόσο ένας φορέας μεταφοράς έχει περιγραφεί προερχόμενος από τον βακτηριοφάγο LE1 από τη *L. biflexa* δίνοντας τη δυνατότητα για περαιτέρω έρευνα σε μοριακό επίπεδο πάνω στο γονιδίωμα της λεπτόσπειρας (Girons et al., 2000).

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί και χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι για τον προσδιορισμό του γονότυπου όπως η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE), οι αλληλουχίες με ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR) και η πολυτοπική τυποποίηση αλληλουχίας (MLST) που καθίστανται χρήσιμες για την περαιτέρω διάκριση μεταξύ των ορότυπων *L. interrogans Copenhageni* και *Icterohaemorrhagiae* (Galloway & Levvet 2010, Moreno et al., 2016). Η μέθοδος MLST θεωρείται μια μοντέρνα μέθοδος για την ταυτοποίηση του ορότυπου της *L. interrogans* οροομάδας *Icterohaemorrhagiae* (Zilber et al., 2014).

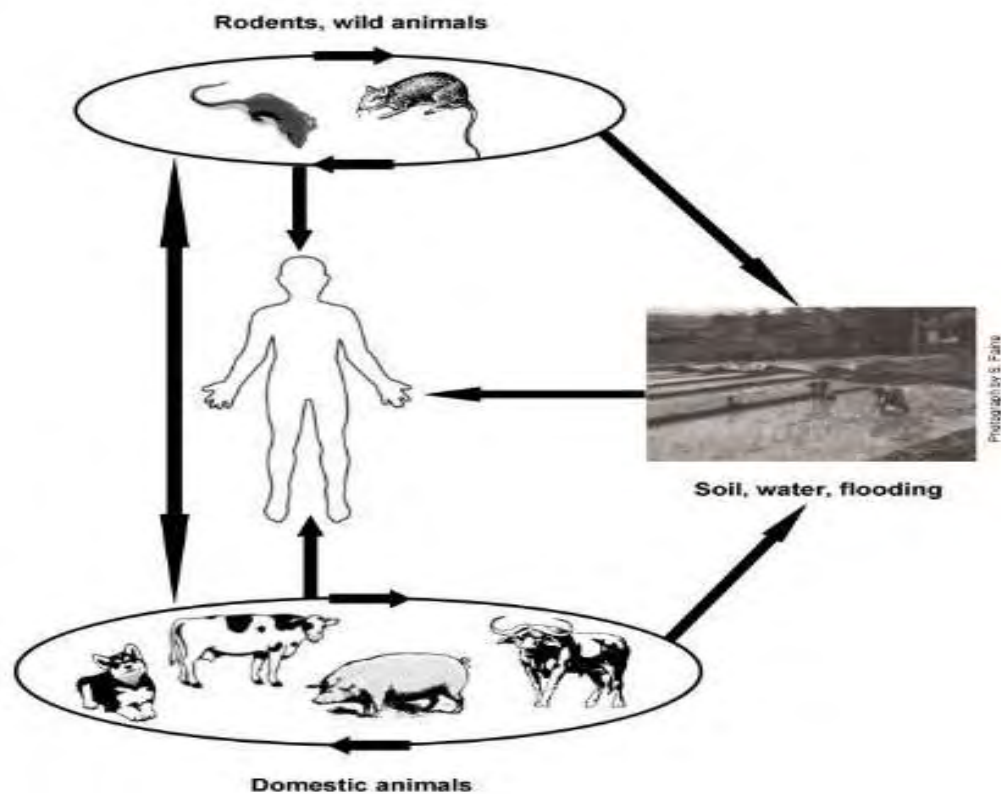
Αυτή η σύγκριση των γονιδιωμάτων και η κατανόηση των διαφορών μεταξύ των ορότυπων μπορεί να ενισχύσει την προσπάθεια για περαιτέρω ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών (Moreno et al., 2016, Santos et al., 2018).

Η *Leptospira* spp. λόγω ότι απαιτείται αερόβιο ή μικροαερόφιλο περιβάλλον για την ανάπτυξή της διαθέτει στο γονιδίωμά της ένα πλήρες σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούν τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος και συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. δημιουργώντας ATP με οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η *L. interrogans* χρησιμοποιεί το O₂ ως τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων αλλά έχει καταγραφεί ότι το H₂O₂ μπορεί να δράσει ως ένας εναλλακτικός τελικός δέκτης ηλεκτρονίων (Nascimento et al., 2004).

3.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η λεπτοσπείρωση αποτελεί την πιο διαδεδομένη ζωνόσο στον κόσμο, όπου καταγράφει παγκόσμια κατανομή τόσο στις τροπικές περιοχές και υποτροπικές όσο και σε εύκρατα κλίματα λόγω ότι αυξάνονται οι πιθανότητες επιβίωσης στο περιβάλλον της λεπτόσπειρας σε θερμές και υγρές συνθήκες (Levett 2001). Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου καθίσταται σαφές πιο μεγάλη στις αναπτυσσόμενες χώρες ωστόσο υπάρχουν καταγραφές και σε ανεπτυγμένες χώρες (Thiermann & Frank 1980, Dupouey et al., 2014).

Η έκθεση του ανθρώπου στον παθογόνο μικροοργανισμό μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση έπαφη με το μολυσμένο ζώο από λεπτόσπειρα είτε έμμεσα μέσω της επαφής του ανθρώπου με το περιβάλλον, νερό ή έδαφος που έχουν επιμολυνθεί από ούρα ή ζωικό ιστό, ζώων που περιέχουν τον παθόγονο μικροοργανισμό. (Εικόνα 3.)



Εικόνα 3. Τρόποι μετάδοσης της λεπτοσπείρωσης που περιλαμβάνει τρωκτικά ,άγρια ζώα ή οικόσιτα ζώα με άμεση μετάδοση στον άνθρωπο ή με έμμεση μετάδοση μέσω της αποβολής των ούρων στο περιβάλλον.

Πύλες εισόδου μέσω των οποίων μπορεί η λεπτόσπειρα να εισέλθει στον άνθρωπο περιλαμβάνονται μέσω της λύσης της συνέχειας του δέρματος και μέσω των βλεννογόνων του επιπεφυκότος ή της στοματικής κοιλότητας (Levett 2001).

Η κατάποση μολυσμένου νερού από τον μικροοργανισμό θεωρείται ότι αποτελεί σοβαρό παράγοντα μόλυνσης όπως επίσης η ακούσια κατάποση νερού κατά την βύθιση σε περιπτώσεις κολύμβησης αυξάνει την πιθανότητα μόλυνσης, ωστόσο η κατάποση μολυσμένων τροφών δεν θεωρείται ότι συμβάλει στην μετάδοση του παθογόνου μικροοργανισμού (Faine et al., 1999, Morgan et al., 2002, Hadad et al., 2006).

Έχει καταγραφεί ότι παραδοσιακά μεγαλύτερο κίνδυνο για λοίμωξη από λεπτόσπειρα διατρέχουν κατηγορίες ανθρώπων που είτε εργάζονται είτε έρχονται σε καθημερινή

έκθεση στον παθογόνο παράγοντα. Το περιβάλλον μολύνεται από την έκκριση του παθογόνου παράγοντα από τα ζώα φορείς. Η έμμεση επαφή του ανθρώπου με τον παθογόνο παράγοντα είναι σύνηθες φαινόμενο όπου σχετίζεται με επαγγελματικές και ψυχαγωγικές δραστηριότητες. Η άμεση επαφή του ανθρώπου με το μολυσμένο ζώο συνήθως συναντάται σε άτομα που έρχονται σε καθημερινή επαφή λόγω της φύσης του επαγγέλματός τους. Οπότε μεγαλύτερο κίνδυνο σε άμεση είτε σε έμμεση έκθεση στον παθογόνο παράγοντα συναντάμε σε επαγγέλματα που αφορούν τους εργαζόμενους στον τομέα του κρέατος, κτηνίατρους, ερευνητές που έρχονται σε άμεση επαφή με ζώα στα εργαστήρια, οι αγρότες, οι εργάτες αποχέτευσης, οι ανθρακωρύχοι, οι εργάτες στην καθαριότητα, οι αλιείς, στρατιώτες κατά τη διάρκεια στρατιωτικών επιχειρήσεων αλλά επίσης υπάρχουν αναφορές για ανθρώπους που ασχολούνται με θαλάσσια αθλήματα, δραστηριότητες και κυνηγοί που έχουν προσβληθεί από λεπτόσπειρα.(Chan et al., 1987, Padre et al., 1988, Levett 2001, Morgan et al., 2002, Bharti et al., 2003, Russell et al., 2003, Hadad et al., 2006, Lupi et al., 2013, Bertherat et al., 2014, Dierks et al., 2018). Σε ορισμένες περιπτώσεις συναντάμε την μετάδοση λεπτοσπείρωσης σε νεογνά και την εμφάνιση ενεργού λοίμωξης(Koe et al., 2014).

Μάλιστα οι ανθρακωρύχοι αποτελούν μία από τις πρώτες επαγγελματικές ομάδες που αναγνωρίστηκαν πως διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για λεπτοσπείρωση(Levett 2001). Επίσης, από την πρώτη αναφορά και για τις επόμενες δεκαετίες έως σήμερα συναντάμε πολλές αναφορές που συνδέουν τη νόσο της λεπτοσπείρωσης με το επάγγελμα των ανθρακωρύχων(Adan & Edmunds 1955, Kemenes et al., 1966, Waitkins et al., 1986, Tandir et al., 2006, Bertherat et al., 2014, Parveen et al., 2016).

Ο κίνδυνος λοίμωξης από λεπτόσπειρα εμφανίζεται υπαρκτός στους εργάτες καθαριότητας λόγω της φύσης της επαγγελματικής δραστηριότητάς τους. Η αποθήκευση μέχρι τη συλλογή και την τελική διάθεση των απορριμμάτων ενέχει έξι φορές μεγαλύτερο σχετικό κίνδυνο για κάποια μολυσματική ασθένεια σε σύγκριση με τους πληθυσμούς αναφοράς(Shafei et al., 2017, Azfar et al., 2018).

Στην Μαλαισία ανάμεσα σε εργάτες καθαριότητας έχουν καταγραφεί οροθετικοί στη νόσο της λεπτοσπείρωσης σε ποσοστό 17,9% όπως και έτος 2008 καταγράφηκε το ποσοστό οροθετικότητας στο 24,7% μεταξύ των εργαζόμενων στη συλλογή απορριμμάτων(Sulong et al., 2012). Στην πόλη Kelantan της Μαλαισίας σε μία

μεταγενέστερη μελέτη καταγράφηκε το ποσοστό του 25,5% μεταξύ των εργαζόμενων στη συλλογή απορριμμάτων, που εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με τις άλλες αναφορές που προϋπήρχαν (Azfar et al., 2017, Azfar et al., 2018).

Αυξημένο κίνδυνο για λεπτοσπείρωση έχει καταγραφεί ότι μπορεί να διατρέχουν ταξιδιώτες που εισέρχονται σε περιβάλλον και συνθήκες που ευνοεί την μετάδοση του παθογόνου μικροοργανισμού, όπως στάσιμα νερά, θερμό κλίμα και επαφή με το έδαφος ή το γλυκό νερό (Creel et al., 1994, Kager et al., 2001, Hadad et al., 2006, Ricaldi & Vinetz 2006). Η λεπτόσπειρα έχει την ικανότητα να επιβιώσει σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες τόσο στο νερό όσο και στο έδαφος

Η επιβίωση και η ανάπτυξη του παθογόνου παράγοντα εξαρτάται άμεσα από τις κλιματολογικές συνθήκες. Η ραγδαία παγκόσμια αλλαγή του κλίματος καθίσταται ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει στην αύξηση της θερμοκρασίας, την συχνότητα εμφάνισης των ακραίων καιρικών φαινομένων, όπως οι κυκλώνες και οι πλημμύρες που μπορεί να συμβάλλουν στην έκταση των εστιών της λεπτόσπειρας αλλά και να οδηγήσουν σε αύξηση της επιβίωσης της λεπτόσπειρας σε γεωγραφικές περιοχές που δεν συναντούσαμε μεγάλη συχνότητα εμφάνισης της λεπτοσπείρωσης. Επομένως, η κλιματική αλλαγή μπορεί να επηρεάσει σύνθετους οικολογικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και καθίσταται ορατό το φαινόμενο αύξησης της συνολικής επίπτωσης όπως και της συχνότητας εμφάνισης κρουσμάτων λεπτοσπείρωσης σε παγκόσμια κλίμακα (Pappas et al., 2008, Lau et al., 2010).

Επίσης, οι επικρατούσες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες, όπως η αλλαγή της οικονομικής κατάστασης, η διαβίωση σε υποβαθμισμένες συνθήκες (φαβέλες) και η έντονη μετανάστευση των ανθρώπων παράλληλα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και ακραία καιρικά φαινόμενα ειδικά σε τροπικές χώρες συμβάλουν στην εμφάνιση επιδημιών λεπτοσπείρωσης. Τέτοιο παράδειγμα συναντάμε στη Βραζιλία όπου εμφανίζονται κάθε χρόνο επιδημικές εξάρσεις λεπτοσπείρωσης σε υποβαθμισμένες περιοχές (φαβέλες) κατά τη διάρκεια των έντονων εποχικών βροχοπτώσεων (Ko et al., 1999, Romero et al., 2003, Blanco & Romero 2016).

Η μετάδοση της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα ζώων που αναπτύσσουν μια μακροχρόνια συμβιωτική σχέση. Οπότε πηγές μόλυνσης μπορεί να

είναι πολλά είδη θηλαστικών άγρια, κατοικίδια και οικόσιτα όπως: τρωκτικά, άγρια θηλαστικά του δάσους(αλεπούδες, πίθηκοι), γάτες, σκύλια, άλογα, αιγοπρόβατα, βοοειδή και διάφορα πτηνά(Faine et al., 1999).

Μέσω της μακροχρόνιας συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσουν ο παθογόνος μικροοργανισμός με τα ζώα καθίστανται μία συνεχής πηγής μόλυνσης του περιβάλλοντος και κατά επέκταση τόσο του ανθρώπου όσο και άλλων ζώων. Τα ζώα φορείς της λεπτόσπειρας μπορούν να φέρουν χρόνια τον εγκαταστημένο μικροοργανισμό που παραμένει στα εσπειραμένα σωληνάρια χωρίς εμφανή κλινικά συμπτώματα, όπου μετέπειτα μπορούν να το αποβάλλουν με τα ούρα τους στο περιβάλλον(Monahan et al., 2008, d'Andon et al., 2014).

Αρχικά τα τρωκτικά είχαν αναγνωριστεί και καταγραφεί για πρώτη φορά το 1917 ως κύρια δεξαμενή της λεπτόσπειρας και θεωρούνταν ότι αποτελούν την σημαντικότερη πηγή μετάδοσης όσο αφορά την ανθρώπινη μόλυνση σε αστικές περιοχές(Vinetz et al., 1996).

Επίσης, έχουν αναφερθεί σαν πηγές μόλυνσης για την μετάδοση της λεπτόσπειρας οι νυχτερίδες και τα λιοντάρια της θάλασσας αποδεικνύοντας την μεγάλη ποικιλομορφία των θηλαστικών ειδών που μπορεί να επικρατεί και έχουν την δυνατότητα να διευκολύνουν τη μετάδοση της λεπτοσπειρώσεως(Matthias et al., 2005, Lloyd-Smith et al., 2007).

Ωστόσο, ο τρόπος μετάδοσης και η προέλευση της μόλυνσης αυτών των θαλάσσιων λιονταριών είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, καθώς το αλμυρό νερό δεν αποτελεί ιδανική συνθήκη για την επιβίωση της λεπτόσπειρας(Trueba et al., 2004). Καθώς έχει καταγραφεί ότι το ιξώδες και η συμπύκνωση του άλατος θεωρούνται κρίσιμα για την επιβίωση της λεπτόσπειρας σε γλυκό νερό.

Κατά την μελέτη της *Leptospira interrogans* ορότυπου Canicola για την διερεύνηση της επιβιώσής της καταγράφηκε ότι σε απεσταγμένο νερό με pH 7,2 οι λεπτόσπειρες ήταν ικανές να παραμείνουν κινητικές για 110 ημέρες ενώ όταν επωάστηκαν σε ένα ημιστερέο μέσο αποτελούμενο από αποσταγμένο νερό και 0,5% καθαρισμένη αγαρόζη σε pH 7,2, η επιβίωση τους αυξήθηκε στις 347 ημέρες(Trueba et al., 2004).

Η επιδημιολογική διερεύνηση του μικροοργανισμού εξαρτάται άμεσα από τη διασπορά των παθογόνων ορότυπων στη φύση, τα ζώα και τον άνθρωπο όπου μεταβάλλεται συνεχώς επηρεάζοντας τον βαθμό και τον τρόπο της μόλυνσης τόσο στα ζώα που αποτελούν τους ξενιστές όσο και τον άνθρωπο. Η διασπορά των ορότυπων μπορεί να συναντάται τόσο όταν υπάρχει σύγκριση από χώρα σε χώρα όσο ακόμα και από περιοχή σε περιοχή εντός της ίδιας χώρας(Bisias et al., 2010, Picardeau 2013).

Επομένως, υφίσταται μια ποικιλία στους ορότυπους που συναντάμε στα ζώα όπου έχει καταγραφεί μια συχνότητα σε συγκεκριμένα είδη ζώων που έχουν συνδεθεί με επιδημίες σε παγκόσμια κλίμακα.

Με πιο διακριτά παραδείγματα να περιλαμβάνουν τους ορότυπους Icterohaemorrhagiae, Ballum όπου απαντάται στα τρωκτικά (*Rattus norvegicus*), στα βοοειδή συναντάμε συνήθως τους ορότυπους Castellonis, Hardjo, Bratislava, Pomona, Grippytyphosa, στους χοίρους Hadjo bovis, Bratislava, Pomona και Shermani, στα πρόβατα Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Autumnalis, Castellonis, Grippytyphosa, Pomona, στα γουρούνια Bratislava, Pomona, Tarassovi και στα ζώα συντροφιάς όπως η γάτα και ο σκύλος απαντώνται συνήθως οι ορότυποι Icterohemorrhagiae, Autumnalis και Canicola(Alston &Broom 1958, Anderson et al., 1978, Ellis et al., 2000, Levett 2001, Prescott et al., 2002).

Παρόλο, που η νόσος συχνά υποδιαγιγνώσκεται λόγω της ομοιότητας των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου λανθασμένα μπορούν να αποδοθούν και σε άλλα νοσήματα όπως λόγω ότι σε ορισμένες περιπτώσεις μόλυνσης των ανθρώπων από τον παθογόνο παράγοντα της λεπτόσπειρας μπορεί να μην εμφανίσουν κανένα σύμπτωμα.

Έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για την ενημέρωση και καταγραφή των κρουσμάτων της λεπτοσπείρωσης όσο και των θανάτων που έχουν προέλθει από την συγκεκριμένη ζωνόσο. Μία σημαντική κίνηση για την καταγραφή και εκτίμηση του παγκόσμιου αντίκτυπου της λεπτοσπείρωσης έχει υλοποιηθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) με τη σύσταση της Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)(Costa et al., 2015). Μέσω της ανάπτυξης μια στρατηγικής μοντελοποίησης, που σκοπό είχε να υπερκεράσει την ελλιπή και μερικές φορές περιορισμένη διαθεσιμότητα

των καταγεγραμμένων δεδομένων, η LERG διεξήγαγε μια συστηματική ανασκόπηση της παγκόσμιας βιβλιογραφίας.

Κατά την διεξαγωγή της συστηματικής ανασκόπησης χρησιμοποιήθηκαν κυρίως μελέτες επιτήρησης που βασίζονται σε νοσοκομεία, οι οποίες περιλαμβάναν πιο σοβαρές μορφές περιστατικών που οδηγούν σε νοσηλεία, όπου προέκυπταν επιβεβαίωση της λεπτοσπείρωσης μέσω εργαστηριακών εξετάσεων αλλά και περιπτώσεις όπου υπάρχουν υπόνοιες για εργαστηριακά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις και θανάτους(Costa et al., 2015).

Βάση των αποτελεσμάτων αυτής της ανασκόπησης που προέκυψε μπορεί να εκτιμηθεί ότι η συνολική εμφάνιση των περιπτώσεων που προσβλήθηκαν από την ζωνόσο της λεπτοσπείρωσης παγκοσμίως ανέρχονται περίπου σε 1.03 εκατομμύριο περιπτώσεις εκ των οποίων έχουν καταγραφεί 58.000 θάνατοι ετησίως(Costa et al., 2015). Επίσης, σημαντικό καθίσταται το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων που αποτελεί το 48% αλλά και των θανάτων που αποτελεί το 42% εμφανίζονται σε ενήλικες άντρες ηλικίας 20-49 ετών.

Βάση των καταγεγραμμένων δεδομένων η πλειοψηφία των κρουσμάτων και των θανάτων λόγω λεπτοσπείρωσης συναντάται στις τροπικές περιοχές όπου ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 73% περιλαμβάνει τις χώρες που βρίσκονται μεταξύ των τροπικών του Καρκίνου και του Αιγόκερω(Costa et al., 2015).

Μέσω της καταγραφής και επιβεβαίωσης των κρουσμάτων παγκοσμίως διακρίνεται ότι οι αναφορές για κρούσματα λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο προέρχονται σε μεγάλο βαθμό από τροπικές και υποτροπικές περιοχές όπου καθοριστικός παράγοντας αφενός είναι οι κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν και αφετέρου οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες που επηρεάζουν τόσο την διαβίωση όσο και την πρωτοβάθμια κρατική περίθαλψη καταλήγοντας στην καταγραφή περισσότερων επιβεβαιωμένων κρουσμάτων λεπτοσπείρωσης στα νοσοκομεία. Ωστόσο παρατηρείται τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες μια δυσκολία να καταγράψουν επαρκώς τα περιστατικά(Asante et al., 2019).

Μπορούμε να αναφέρουμε χαρακτηριστικά παραδείγματα επιδημιών λεπτοσπείρωσης που έχουν καταγραφεί όπως στην Νικαράγουα το χρονικό διάστημα μεταξύ Οκτωβρίου και Νοεμβρίου του 1995 αναφέρθηκαν περισσότερα από 2000 περιστατικά λεπτοσπείρωσης που εκδήλωσαν οξεία εμπύρετη ασθένεια, όπου καταγράφηκαν τουλάχιστον 40 θάνατοι από οξεία πνευμονική αιμορραγία και αναπνευστική ανεπάρκεια(Zaki & Sheih 1996). Σε έρευνα που διεξάχθει στην πόλη El Sauce κατέδειξε ότι από την διερεύνηση σε 566 άτομα, τα 85 (15%) ήταν θετικά για αντισώματα IgM κατά της λεπτόσπειρας φανερώνοντας πρόσφατη λοίμωξη με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να μην παρουσιάζουν συμπτώματα καθώς μόνο 25 από τα 85 άτομα, δηλαδή το (29,4%), εκδήλωσαν εμπύρετο ασθένεια κατά τους 2 μήνες πριν από την έρευνα(Ashford et al., 2000).

Στην Ινδία επίσης έχουν καταγραφεί επιδημίες λεπτοσπείρωσης όπου άξια αναφοράς είναι η επιδημία στο νησί Βόρειο Ανταμάν κατά τη διάρκεια του Οκτωβρίου-Νοεμβρίου το 1993 όπου εκδήλωσαν οξεία φλεγμονώδη ασθένεια με αιμορραγικές εκδηλώσεις και πνευμονική εμπλοκή. Ωστόσο η καταγραφή εποχικών κρουσμάτων οξείας φλεγμονώδους νόσου με αιμορραγικές εκδηλώσεις που εμφανίστηκαν κατά τις προηγούμενες δεκαετίες στα νησιά Ανταμάν μπορεί να οφείλονται από εστίες λεπτοσπείρωσης που δεν ταυτοποιήθηκαν(Sehgal et al., 1995, Vijayachari et al., 2008).

Στη Βραζιλία στην πόλη του Σαλβαδόρ το 1996 μέσω της επιτήρησης καταγράφηκε επιδημία λεπτοσπείρωσης όπου νοσηλεύτηκαν 326 άτομα με σοβαρής μορφής συμπτώματα που αντιπροσώπευε το 5-15% όλων των κλινικών λοιμώξεων και 50 θανάτους. Με βάση το ποσοστό που αποτελούσαν τα κρούσματα λεπτοσπείρωσης σοβαρής μορφής εκτιμάται ότι ο πραγματικός αριθμός περιπτώσεων που σχετίζονται με την επιδημία μπορεί να ήταν πάνω από 2000 άτομα(Ko et al., 1999).

Επίσης στην πόλη Ρίο ντε Τζανέιρο της Βραζιλίας την ίδια χρονιά καταγράφηκαν εκατοντάδες περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης έπειτα από έντονες βροχοπτώσεις, όπου σημειώθηκαν πλημμύρες σε διάφορες περιοχές της πόλης, συντελώντας σε μία από τις μεγαλύτερες επιδημίες στην ιστορία της πόλης(Barcellos & Sabroza 2001).

Η Σρι Λάνκα συγκαταλέγεται ανάμεσα στις χώρες που έχουν καταγράψει τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης της λεπτοσπείρωσης και θεωρείται ως μία χώρα με υψηλή

ενδημικότητα λεπτοσπείρωσης. Διαχρονικά έχει αναφερθεί ο αριθμός των περιπτώσεων μέχρι το 2007 παρέμεινε περίπου 1000-2000 περιπτώσεις, με το 2007 να καταγράφεται επίπτωση 11 ανά 100.000 κατοίκους. Το 2008 σημειώθηκε μια σημαντική αύξηση της επίπτωσης 35,7 ανά 100.000 κατοίκους. Καθίσταται σημαντικό ότι το έτος 2008 σημειώθηκαν περισσότερες από 7.000 αναφερόμενες περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης (Agampodi et al., 2009).

Επίσης, κατά τα έτη 2008 έως 2014 η συνολική ετήσια επίπτωση της λεπτοσπείρωσης που αναφέρθηκε στη Σρι Λάνκα ήταν μεγαλύτερη από 25 ανά 100.000 κατοίκους και ο μέσος όρος των κρουσμάτων που αναφέρθηκαν ετησίως να υπερβαίνει τα 5.000, αναδεικνύοντας την σοβαρότητα της επίπτωσης στη χώρα (Naotunna et al., 2016).

Παρατηρώντας την ετήσια επίπτωση της ανθρώπινης λεπτοσπείρωσης σε μία προσπάθεια βιβλιογραφικής ανασκόπησης διαφαίνεται ότι η ενδημικότητα της νόσου παρουσιάζεται κυρίως στην Κεντρική και Νότια Αμερική, στην Καραϊβική, καθώς και στην Νοτιοανατολική Ασία και την Ωκεανία. Κατά την καταγραφή της επίπτωσης παρουσιάστηκαν ορισμένα προβλήματα τόσο από την απουσία δεδομένων σε αναπτυσσόμενες χώρες, όσο και από την διακύμανση των περιπτώσεων από σημαντικό αριθμό έως και μηδενικό αριθμό κρουσμάτων αλλά και σε ορισμένες χώρες η απουσία των κατεγραμμένων περιπτώσεων μπορεί να μην οφείλεται στην απουσία της νόσου από αυτή την χώρα όταν σε γειτονικές χώρες παρουσιάζονται να έχουν καταγραφεί ως υπερενδημικές. Αυτή η περίπτωση καταγράφεται από ασιατικές χώρες όπως η Ινδία, η Μαλαισία όπου η νόσος είναι παρούσα με γνωστά κρούσματα αλλά και το μεγαλύτερο μέρος της Αφρικής όπου έχουν καταγραφεί τυχαίες επιδημίες (Pappas 2008).

Ωστόσο, σε μια σημαντική προσπάθεια ανασκόπησης της εμφάνισης των ζωνοσόων στην Αφρική και κατ' επέκταση της λεπτοσπείρωσης την τελευταία δεκαετία καταγράφηκε η εμφάνιση της νόσου και τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της (Εικόνα 4).



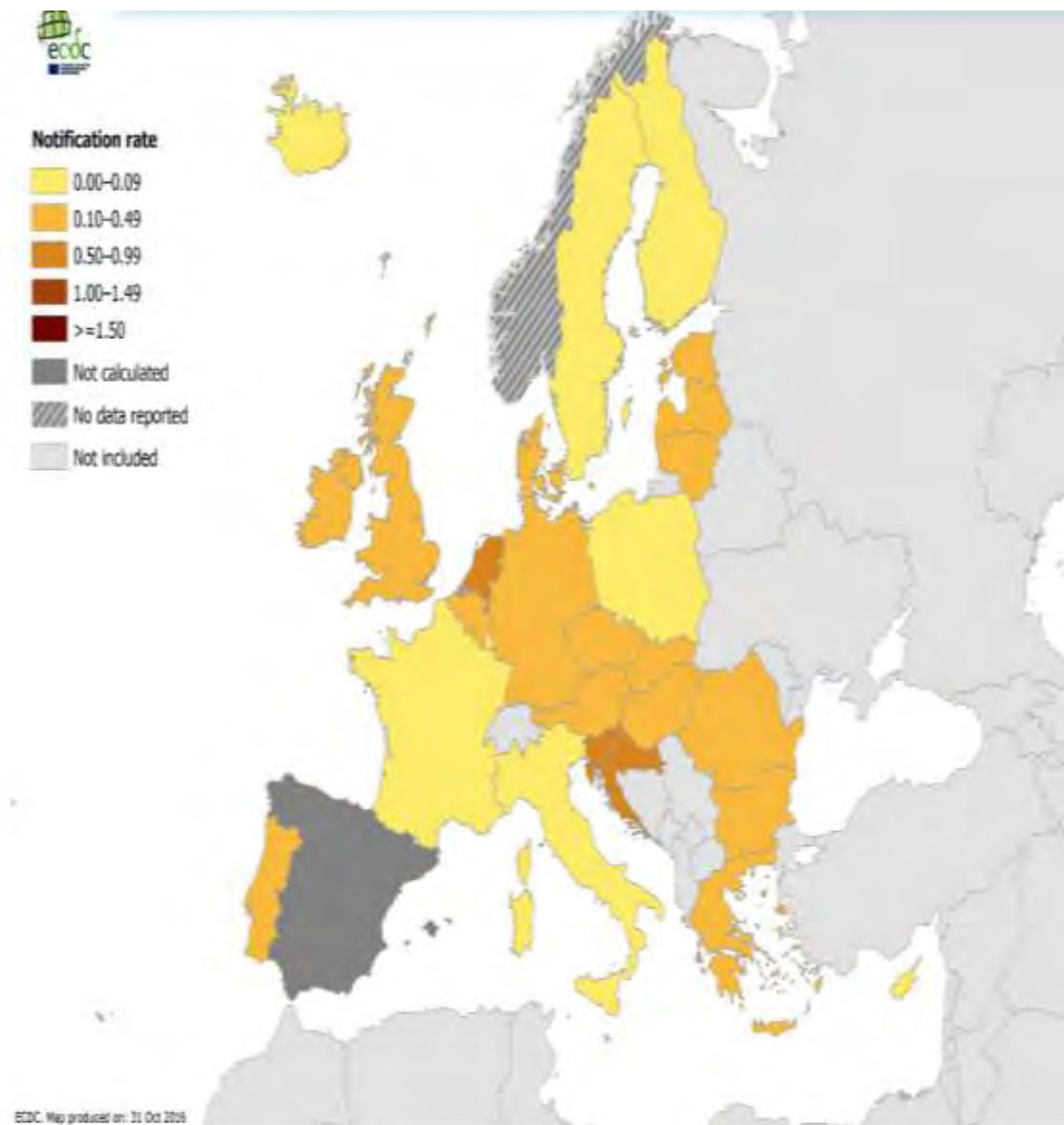
Εικόνα 4. Στον χάρτη απεικονίζεται η γεωγραφική κατανομή των σημαντικότερων βακτηριακών ζωνοσώων, μεταξύ των οποίων και η λεπτοσπείρωση, για το χρονικό διάστημα από το 2008 έως το 2018 στην Αφρική(πηγή (Asante et al., 2019)).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη βόρεια Τανζανία καταγράφηκε ότι οι ορότυποι Mini and Australis εμφάνισαν την μεγαλύτερη συχνότητα και παρουσιάστηκε συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης από *Leptospira* και της αγροτικής κατοικίας (OR 3.4, $p < 0.001$). Επίσης, στην Αίγυπτο τα ποσοστά απομόνωσης της λεπτόσπειρας ήταν 1,1%, 6,9% και 11,3% για τις αγελάδες, τους αρουραίους και τους σκύλους αντίστοιχα, χαρακτηρίζοντας ως σημαντικούς φορείς της λεπτοσπείρωσης για την χώρα, όπου απομονώθηκαν έξι ορότυποι *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Celledoni*, *Pyrogenes* και *Romona*. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Μαρόκο επιβεβαιωμένα κρούσματα λεπτοσπείρωσης εμφανίστηκαν σε πληθυσμούς υπο-αστικών περιοχών σε

ποσοστό 20,9%. Η λεπτοσπείρωση στην Αφρική συνδέεται άμεσα με κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες όπως συνθήκες διαβίωσης, ανεπαρκή αποχέτευση, κακή υγιεινή, κακή διάθεση στερεών αποβλήτων με παράλληλη αύξηση του πληθυσμού των τροπικών αλλά και η αυξανόμενη τάση μετανάστευσης πληθυσμών σε αστικές περιοχές σε συνδυασμό με ακραία καιρικά φαινόμενα όπως πλημμύρες και η παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας συμβάλουν στην πρόβλεψη ότι η λεπτοσπείρωση μπορεί να αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία στο άμεσο μέλλον(Asante et al., 2019).

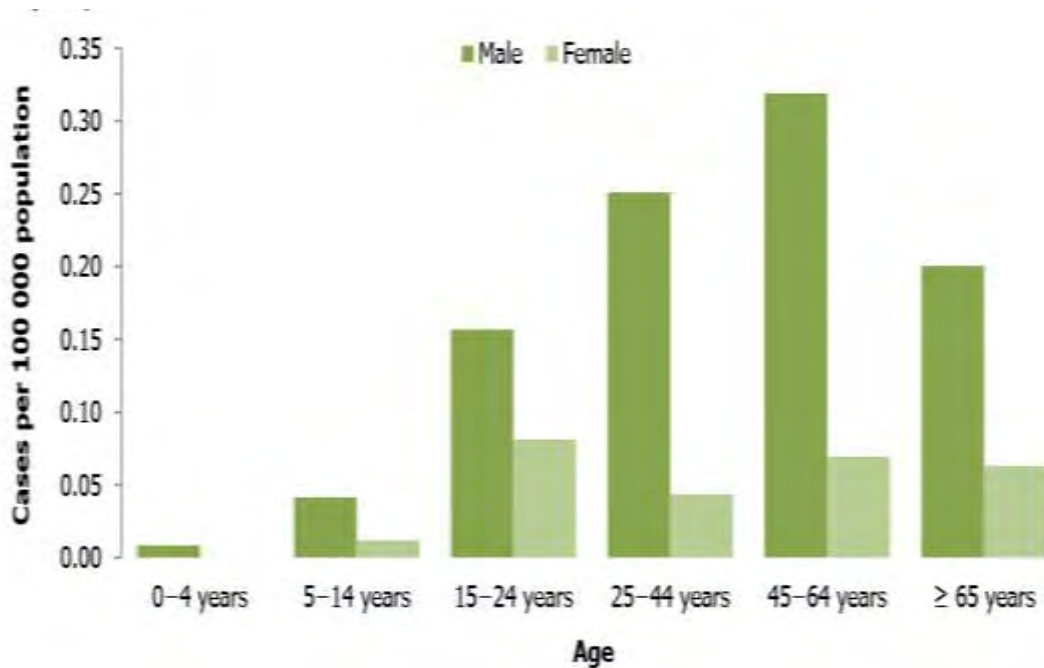
Χαρακτηριστικό γνώρισμα της επιδημίας λεπτοσπείρωσης στις τροπικές περιοχές καθίσταται ότι η ετήσια επίπτωση ανέρχεται τουλάχιστον πάνω από 10 ανά 100.000 ανθρώπους στις ακόλουθες γεωγραφικές περιοχές και χώρες όπως οι Σεϋχέλλες, Σρι Λάνκα, Ταϊλάνδη και η Ινδία που ανήκουν σε περιοχές της Ασίας και του Ειρηνικού όπως επίσης η Ουρουγουάη, Τζαμάικα, Κούβα, Νικαράγουα, Κόστα Ρίκα, Τρινιντάντ Τομπάγκο, Μπαρμπάντος, Ελ Σαλβαδόρ που ανήκουν στην Λατινική Αμερική και στην Καραϊβική(Pappas 2008, Victoriano et al., 2009).

Στην Ευρώπη για το έτος 2014 παρατηρήθηκε διπλάσια αύξηση κρουσμάτων λεπτοσπείρωσης σε σχέση με τα έτη από το 2011 και μετά. Ωστόσο, το 2015 ο αριθμός των επιβεβαιωμένων περιπτώσεων μειώθηκε κατά 35% σε σύγκριση με το 2014 αλλά παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με τον μέσο αριθμό επιβεβαιωμένων περιπτώσεων μεταξύ 2011 και 2013 (Πίνακας 5.)(ECDC 2018).



Εικόνα 5. Η κατανομή των επιβεβαιωμένων περιπτώσεων λεπτοσπείρωσης ανά 100.000 πληθυσμού, σε χώρες της ΕΕ / ΕΟΧ, για το έτος 2015. (πηγή (ECDC 2018))

Το 2015 μεταξύ 29 χωρών της ΕΕ / ΕΟΧ αναφέρθηκε ο αριθμός των 1222 περιπτώσεων για λεπτοσπείρωση, εκ των οποίων συμπεριλαμβάνονται 626 (51%) επιβεβαιωμένες περιπτώσεις, όπου 425 περιπτώσεις δηλαδή το 70% αφορούσε ηλικίες μεταξύ 25 έως 64 ετών. Ειδικότερα, οι άντρες ηλικίας μεταξύ 45 έως 64 ετών παρουσίασαν την μεγαλύτερη μέση ετήσια επίπτωση 0,32 ανά 100 000 πληθυσμού. Με την μέση ετήσια επίπτωση να ανέρχεται στο 0,1 ανά 100 000 πληθυσμού (Πίνακας 6.)(ECDC 2018).



Εικόνα 6. Η κατανομή των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων λεπτοσπείρωσης ανά 100.000 πληθυσμού, ανά ηλικία και φύλο, σε χώρες της ΕΕ / ΕΟΧ, για το έτος 2015. (πηγή (ECDC 2018))

Η αύξηση που παρατηρήθηκε το 2014 μπορεί να αποδοθεί και σε διάφορα κρούσματα λεπτοσπείρωσης που καταγράφηκαν όπως σε εποχικούς Πολωνούς εργάτες από διάφορες περιοχές της χώρας που είχαν εργαστεί σε καλλιέργεια φράουλας στην Γερμανία το καλοκαίρι εκείνου του έτους (Fiecek et al., 2017), με παρόμοιους παράγοντες κινδύνου σε κρούσματα που είχαν καταγραφεί σε εποχικούς εργάτες φράουλας το 2007 στην Γερμανία (Desai et al., 2009), στην Γαλλία καταγράφηκε αύξηση των περιπτώσεων που οφείλεται στην καθιέρωση της επιτήρησης στη γαλλική επικράτεια, στην Κροατία και στην Ολλανδία καταγράφηκε αύξηση των περιπτώσεων λεπτοσπείρωσης που συμπίπτει με την παράλληλη αύξηση του σκύλου ως δεξαμενή λεπτόσπειρας (Stritof et al., 2014, Rijnacker et al., 2016, ECDC 2018).

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων που παρατηρήθηκαν στην Ευρώπη αφορά κυρίως τους μήνες μεταξύ Αυγούστου και Οκτωβρίου προσδίδοντας ένα εποχικό χαρακτηριστικό στην νόσο. Αυτή η εποχικότητα μπορεί να οφείλεται λόγω της επικράτησης υψηλότερων θερμοκρασιών, αυξημένων περιόδων βροχόπτωσης αλλά και σε συνδυασμό με την αύξηση των υπαίθριων δραστηριοτήτων κατά την συγκεκριμένη χρονική περίοδο (ECDC 2018).

Η λεπτοσπείρωση στην Ελλάδα περιλαμβάνεται στα λοιμώδη νοσήματα όπου τα κρούσματα της δηλώνονται υποχρεωτικά στον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ.). Η ετήσια επίπτωση των καταγεγραμμένων κρουσμάτων της λεπτοσπείρωσης κατά τα έτη 2004-2013 κυμάνθηκε από 0,13 έως 0,31 ανά 100.000 πληθυσμού (Para & Kotrotsiou 2015).

Στην Ελλάδα κατά τα έτη 2011 έως 2013 η μέση ετήσια επίπτωση κυμάνθηκε από 0,1 έως 0,2 ανά 100.000 πληθυσμού, ενώ κατά τα έτη 2014-2015 καταγράφηκε αύξηση της μέσης ετήσιας επίπτωσης σε 0,3 ανά 100.000 πληθυσμού με τις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν ετησίως να αναλογούν σε 36 και 35 αντίστοιχα (ECDC 2018).

Η ετήσια επίπτωση παρουσιάζει αύξηση κατά τους μήνες μεταξύ Αυγούστου και Οκτωβρίου προσδίδοντας εποχικό χαρακτήρισμό στη νόσο που συναντάται επίσης σε όλη την Ευρώπη και καθίσταται ένα κοινό γνώρισμα σε αυτές τις χώρες (ECDC 2018).

Στην Ελλάδα δεν έχει παρατηρηθεί η έξαρση επιδημίας λεπτοσπείρωσης παρουσιάζοντας ως επί το πλείστον ολιγοάριθμα μεμονομένα περιστατικά. Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι η Ελλάδα ανήκει και αυτή στις χώρες στις οποίες η νόσος υποδιαγιγνώσκεται και καταγράφονται σε μεγάλο βαθμό τα κρούσματα λεπτοσπείρωσης με σοβαρά συμπτώματα που καταλήγουν σε νοσοκομειακή περίθαλψη και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης (Michalopoulos et al., 2010, Assimakopoulos et al., 2012, Panagopoulou et al., 2016).

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Στον άνθρωπο η νόσος της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνει διάφορους τρόπους που μπορεί να εκδηλωθεί με ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων είτε υποκλινικών είτε κλινικών με σοβαρές επιπλοκές που μπορούν να οδηγήσουν δυνητικά ακόμα και στο θάνατο. Η σοβαρότητα της λοίμωξης στον άνθρωπο ποικίλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από το είδος του ορότυπου και τους μηχανισμούς παθογένειας του παθογόνου μικροοργανισμού αλλά και από την ηλικία και την κατάσταση της υγείας και ανοσολογικής απόκρισης του ασθενή (Marinho & Cardoso 2014).

Η είσοδος του παθογόνου μικροοργανισμού στον ανθρώπινο οργανισμό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως μέσω της λύσης της συνέχειας του δέρματος και μέσω των βλεννογόνων του επιπεφυκότος ή της στοματικής κοιλότητας(Adler 2010). Η σημασία της στοματικής βλεννογόνου στην παθογένεια της λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο αποδεικνύεται από διάφορες αναφορές ότι η κατάποση μολυσμένου νερού κατά την διάρκεια της κολύμβησης αποτελεί παράγοντα κινδύνου(Levett 2001).

Μετά την είσοδο στον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζεται η ταχεία και ευρεία διάδοση της λεπτόσπειρας μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλο τον οργανισμό. Χαρακτηριστικό της κινητικότητας αλλά και της ταχείας διάδοσης καθίσταται η απομόνωση της λεπτόσπειρας από την κυκλοφορία του αίματος μέσα σε λίγα λεπτά μετά την είσοδό της στον οργανισμό αλλά και το γεγονός ότι ανιχνεύονται σε πολλαπλά όργανα μέχρι την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση(Ko et al., 2009).

Κατά το στάδιο της λεπτοσπειραιμίας οι παθογόνοι μικροοργανισμοί άμεσα εξαπλώνονται στο αίμα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό(ENY), στους περισσότερους ιστούς μέχρι και του υαλοειδούς σώματος του οφθαλμού(Planka 2000). Η περίοδος επώασης της λεπτόσπειρας στον άνθρωπο κυμαίνεται συνήθως από 7 έως 14 ημέρες αλλά μπορεί να κυμαίνεται και από 2 έως 30 ημέρες(Vijayachari et al., 2008).

Επακόλουθο της μεγάλης συγκέντρωσης έως ένα κρίσιμο σημείο των παθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί ένα σύνολο συμπτωμάτων, βλαβών σε ιστούς και όργανα που προκαλούνται από παθογόνους μηχανισμούς που πιστεύεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια που προκαλεί η λεπτόσπειρα στο ανθρώπινο οργανισμό(Adler & Moctezuma 2010).

Μέχρι σήμερα οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι λεπτόσπειρες προκαλούν την παθογένεια στον άνθρωπο δεν είναι πλήρως κατανοητοί από τους ερευνητές. Ωστόσο, βάση ερευνών έχει γίνει μια σημαντική προσπάθεια να προσδιοριστούν μερικοί παράγοντες που έχουν επικρατήσει ότι μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου περιλαμβάνοντας τους λιποπολυσακχαριτές (LPS) που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη, τις πρωτεΐνες της εξωτερικής επιφάνειας (OMP) όπως οι

λιποπρωτεΐνες, οι αιμολυσίνες, η OmpA-like επιφανειακή πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Loa22, οι Lig πρωτεΐνες, την παραγωγή τοξίνης και τις προσκολλητίνες(Chin et al., 2018, Ghazaei 2018).

Η επιφανειακή πρωτεΐνη Loa22 έχει χαρακτηριστεί ως απαραίτητη για την λοιμογόνο δράση του *L. interrogans* και αντιπροσωπεύει βάση έρευνας που πραγματοποιήθηκε σε πειραματόζωα τον πρώτο γενετικώς καθορισμένο παράγοντα λοιμογόνου δράσης στα είδη *Leptospira*(Ristow et al., 2007).

Η δομή των LPS που βρίσκονται σε εξωτερική μεμβράνη της λεπτόσπειρας εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία ανάμεσα στους ορότυπους που συναντάται και θεωρούνται παράγοντας που συμβάλλει στην παθογένεια του ανθρώπου μέσω της ικανότητά τους να προσκολλώνται στην εξωκυτταρική μήτρα του ξενιστή που προσβάλλουν(Chin et al., 2018, Ghazaei 2018)

Κατά την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού έναντι στον παθογόνο μικροοργανισμό σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζουν οι toll-like υποδοχείς TLR4 και TLR2 και τα μακροφάγα. Το ανθρώπινο TLR4 δεν είναι ικανό να ανιχνεύει τους LPS της λεπτόσπειρας σε αντίθεση με το TLR4 του ποντικού που αναγνωρίζει τους LPS που βρίσκονται στην λεπτόσπειρα καθιστώντας δυνατή την ανοσολογική απόκριση στην λοίμωξη από λεπτόσπειρα(Nahori 2005). Αντίθετα έχει αποδειχθεί ότι η ανοσολογική απόκριση στις LPS της λεπτόσπειρας ενεργοποιεί τον υποδοχέα TLR2, που σηματοδοτεί την κινητοποίηση των μακροφάγων συντελώντας στην άμυνα του οργανισμού και όχι τον υποδοχέα TLR4 (Ko et al., 2009).

Κατά το στάδιο της ανοσολογικής απόκρισης παρατηρείται η εμφάνιση των αντισωμάτων και αύξηση στα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων ,με την παράλληλη εξαφάνιση του παθογόνου μικροοργανισμού από το αίμα. Η παρατηρούμενη αύξηση των ανοσοσυμπλεγμάτων έχουν ως αποτέλεσμα να οδηγήσουν στην δημιουργία φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έχει καταγραφεί ότι η συγκέντρωση και τα επίπεδα των παραγόμενων ανοσοσυμπλεγμάτων συσχετίζονται με την σοβαρότητα της λοίμωξης, ασθενείς με σοβαρή κλινική εικόνα εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ανοσοσυμπλεγμάτων ενώ, αντίθετα έχει παρατηρηθεί η μείωση των

ανοσοσυμπλεγμάτων ταυτόχρονα με την βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων σε ασθενείς κατά την εξέλιξη της νόσου έως την ίασή τους(Levett 2001).

Η άμυνα του οργανισμού μέσω των έμφυτων ανοσολογικών μηχανισμών, λόγω των υψηλών επιπέδων λεπτοσπαιμίας κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, ενεργοποιούν σαν απάντηση στην λοίμωξη την κατάλληλη με ανοσολογικές αποκρίσεις που τελικά θα οδηγήσουν σε σοβαρές εκδηλώσεις για την πορεία της νόσου όπως ανεπάρκεια οργάνου ή ένα είδος σηψαιμικού συνδρόμου(Haake & Levett 2015).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η κλινική εικόνα της λεπτοσπείρωσης παρουσιάζεται ως διφασική και αποτελείται από την οξεία ή σηψαιμική φάση ακολουθούμενη από την ανοσολογική φάση, οι οποίες συχνά αλληλεπικαλύπτονται.

Η λεπτοσπείρωση μπορεί να εκδηλωθεί με ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων που μπορεί να είναι από ελαφριάς υποκλινικής μορφής έως και σοβαρής θανατηφόρας κλινικής μορφής. Έχει επικρατήσει ο διαχωρισμός της λεπτοσπείρωσης σε δύο διακριτά κλινικά σύνδρομα την ανικτερική και την ικτερική λεπτοσπείρωση.

Ανικτερική λεπτοσπείρωση

Κατά την ανικτερική λεπτοσπείρωση ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων που προκαλούν λοίμωξη από λεπτόσπειρα εμφανίζουν υποκλινικά συμπτώματα με ήπια σοβαρότητα και οι ασθενείς πιθανώς δεν θα αναζητήσουν ιατρική φροντίδα.

Μικρό ποσοστό των συνολικών περιπτώσεων που αφορούν την ανικτερική λεπτοσπείρωση αλλά σχεδόν η πλειονότητα των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων που πασχούν από λοίμωξη θα αναπτύξουν έντονο εμπύρετο σύνδρομο με την θερμοκρασία να κυμαίνεται περίπου από 38 έως 40°C που συνοδεύεται από έντονη κεφαλαλγία συνήθως μετωπιαία και παρουσία φωτοφοβίας που μπορεί να σχετίζεται με πλειοκυττάρωση εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν

αποτελούν μη ειδικά και θα μπορούσαν να προκληθούν από τη γρίπη, τον πυρετό του δαγκείου ή την ελονοσία(Levett 2001, Vijayachari et al., 2008, Haake & Levett 2015). Επίσης, εμφανίζονται μυαλγίες που είναι πιο έντονες στα κάτω άκρα. Η ανορεξία, ναυτία και ο έμετος είναι συχνά φαινόμενα και συνοδεύονται από κοιλιακό άλγος και διάρροια. Σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο της λεπτοσπείρωσης έχει καταγραφεί μη παραγωγικός βήχας σε ποσοστό από 20% έως 57%, που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει τους κλινικούς γιατρούς να διαγνώσουν εσφαλμένα τον ασθενή με γρίπη ή άλλη αναπνευστική ασθένεια. Τα γαστρεντερικά συμπτώματα μπορεί να συμβάλλουν στην καταπόνηση και αφυδάτωση του ασθενή. Λιγότερο συχνό σε σχέση με τα άλλα συμπτώματα που παρουσιάζονται είναι η εμφάνιση δερματικού εξανθήματος που εντοπίζεται κυρίως στον κορμό αλλά και στα άνω άκρα και την κνήμη και μπορεί να διαγνωστεί ως και δάγκειος ή chikungunya πυρετός. Συνήθως αυτό το εξάνθημα καταγράφει παροδική εμφάνιση με διάρκεια λιγότερο από 24 ώρες(Bharti et al., 2003, Vijayachari et al., 2008, Seguro & Andrade 2013, Haake & Levett 2015).

Η αναφερθείσα συμπτωματολογία κατά την ανικτερική λεπτοσπείρωση εμφανίζεται στο 90% των ασθενών και διαρκεί περίπου 3 έως 7 ημέρες. Μετά το πέρας της σηψαιμικής φάσης που καταγράφει περίπου μια εβδομάδα ακολουθεί η ανοσολογική φάση όπου χαρακτηριστικό της γνώρισμα αποτελεί η παραγωγή αντισωμάτων IgM και η ανίχνευσή τους στον ορό του αίματος όπως και η απέκκριση των λεπτόσπειρων στα ούρα που εμφανίζονται για εβδομάδες και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έως μήνες. Η άσηπτη μηνιγγίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σε περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης, ειδικά έχει καταγραφεί σε έρευνα ότι στις νεότερες ηλικίες έως τα 14 έτη το 62% των παιδιών παρουσίασαν άσηπτική μηνιγγίτιδα, ενώ μεταξύ των ασθενών ηλικίας 15 έως 29 ετών το 31% και μόνο 10% των ατόμων άνω των 30 ετών(Levett 2001).

Ίκτερική λεπτοσπείρωση

Η ικτερική λεπτοσπείρωση που αναφέρεται και ως σύνδρομο του Weil αποτελεί σοβαρή μορφή λεπτοσπείρωσης που χαρακτηρίζεται από την πρόκληση δυσλειτουργίας πολλών οργάνων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται το ήπαρ, οι νεφροί, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος. Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Weil το 1886 όπου παρατηρήθηκε η παράλληλη εμφάνιση ίκτερου και νεφρικής ανεπάρκειας

όπου και παραμένει μέχρι και σήμερα μια από τις πιο κλινικά αναγνωρίσιμες μορφές λεπτοσπείρωσης(Adler & Moctezuma 2010, Haake & Levett 2015).

Η ικτερική μορφή της λεπτοσπείρωσης μπορεί να διαρκεί περίπου από 4 έως 30 ημέρες και εμφανίζεται στο 5% έως 10% όλων των περιπτώσεων με λεπτοσπείρωση που έχουν καταγραφεί. Η θνησιμότητα σε αυτή τη σοβαρή μορφή λεπτοσπείρωσης κυμαίνεται σε ποσοστό μεταξύ από 5% έως 15% καθώς έχουν καταγραφεί σοβαρής μορφής συμπτώματα όπως ίκτερος, μηνιγγίτιδα, αιμοραγικές εκδηλώσεις όπως πνευμονική αιμορραγία και οξεία νεφρική βλάβη(Bharti et al., 2003, Seguro & Andrade 2013).

Οι οφθαλμικές εκδηλώσεις παρουσιάζουν συχνότητα εμφάνισης που κυμαίνεται μεταξύ 2% έως 90% καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις οι οφθαλμικές εκδηλώσεις μπορεί να είναι υποκλινικές ή πολύ ήπιας μορφής ώστε μπορούν να παραβλεφθούν. Στη διάρκεια αυτού του σταδίου μπορεί να παρατηρηθεί συμφόρηση στον επιπεφυκότα χωρίς χύμωση, έκκριση και αιμοραγία υπό τον επιπεφυκότα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα σοβαρής μορφής λεπτοσπείρωσης αποτελεί η παρουσία κίτρινου σκληρού χιτώνα και περιφερικής συμφόρησης του κερατοειδούς. Άλλες οφθαλμολογικές εκδηλώσεις αποτελούν το οίδημα οπτικού δίσκου, η αγγειίτιδα του αμφιβληστροειδούς, αιμορραγία αμφιβληστροειδούς και σκληρών εξιδρωμάτων. Η ραγοειδίτιδα αποτελεί σημαντική όψιμη επιπλοκή της λεπτοσπείρωσης και μπορεί να εκδηλωθεί από 2 ημέρες έως και 4 χρόνια συστηματικής μόλυνσης, αλλά συνήθως εκδηλώνεται περίπου σε έξι μήνες(Rathinam 2005, Rathinam & Agarwa 2014).

Στο ήπαρ η κλινική εικόνα της λεπτοσπείρωσης μπορεί να προκαλέσει από ήπια έως και σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία. Η εμφάνιση ίκτερου συσχετίζεται ισχυρά με μόλυνση που προέρχεται από την ορολογική ομάδα *Icterohaemorrhagiae* και εμφανίζεται συνήθως εντός των αρχικών πέντε ημερών έως εννέα ημερών από την κλινική έναρξη ενώ διαρκεί έως ένα μήνα μετά την εμφάνιση του(Haake & Levett 2015).

Χαρακτηριστικό εργαστηριακό γνώρισμα αποτελούν οι συγκεντρώσεις χολερυθρίνης στον ορό μπορεί να είναι υψηλές μέχρι 30-40 mg / dL, όπου ενδέχεται να αυξηθεί τόσο πολύ σε συγκέντρωση 80 mg / dL και να παραμείνουν από μέρες έως εβδομάδες μέχρι να φτάσουν στα φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης παρατηρείται ήπια έως μέτρια αύξηση των ηπατικών τρανσαμινασών με τα επίπεδα τους περίπου <200 U / L στο περίπου 40%

των ασθενών και μικρή αύξηση στα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης(Talwani et al., 2011 , Haake & Levett 2015, Jiménez et al., 2018).

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα του ήπατος περιλαμβάνουν εκφυλισμό ηπατοκυττάρων, υπερτροφία κυττάρων Kupffer, ερυθροφαγοκυττάρωση, χολόσταση, μονοπυρηνικές διεισδύσεις, αλλά δεν συνοδεύονται συνήθως με την παρουσία νεκρωτικών εστειών ηπατοκυττάρων. Ο ίκτερος που παρουσιάζεται κατά την λοίμωξη από λεπτόσπειρα δεν συσχετίζεται με την ηπατοκυτταρική νέκρωση, έπειτα μετά από την πλήρη αποκατάσταση από την νόσο η λειτουργία του ήπατος επιστρέφει στο φυσιολογικό(Talwani et al., 2011).

Οι αιμοραγικές εκδηλώσεις που προκαλούνται είναι κοινές κατά την νόσο του Weil και μπορούν να αποβούν δυνητικά θανατηφόρες για τον οργανισμό. Περιλαμβάνουν ήπιας μορφής εκδηλώσεις όπως εκχυμώσεις, επίσταξη και πετέχεια αλλά και πιο σοβαρής μορφής εκδηλώσεις όπως πνευμονική αιμορραγία, γαστρεντερική αιμορραγία και αιματουρία. Τα επίπεδα αιμοπεταλίων μπορεί να κυμανθούν σε πολύ χαμηλά επίπεδα και μπορεί να συμβάλλει εν μέρει στην αιμορραγική εκδήλωση. Η θρομβοπενία παρατηρείται σε περισσότερο από το 70% των περιπτώσεων σοβαρής λεπτοσπείρωσης(Bharti et al., 2003, Seguro & Andrade 2013, Haake & Levett 2015).

Η προσβολή του νεφρού εμφανίζεται συχνά κατά την λεπτοσπείρωση καθώς αποτελεί ένα από τα κύρια όργανα στόχους στην λεπτοσπείρωση (Εικόνα 7). Η πρόκληση οξείας νεφρικής βλάβης σε σοβαρής μορφής λεπτοσπείρωσης εμφανίζεται με συχνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 40% έως 60%. Η κύρια παθολογική αλλοίωση σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με λεπτοσπείρωση αποτελεί η οξεία διάμεση νεφρίτιδα όπου εντοπίζεται ακόμα και σε ασθενείς χωρίς να έχουν παρουσιάσει οξεία νεφρική βλάβη ή αλλοιώσεις σωληναριακής νέκρωσης(Seguro & Andrade 2013).



Εικόνα 7. Η προσβολή του νεφρού εμφανίζεται συχνά κατά την λεπτοσπείρωση.

Κατά την μη ολιγουρική οξεία νεφρική ανεπάρκεια οι λεπτόσπειρες έχουν την ικανότητα να προκαλούν άμεσα διαταραχές στους μηχανισμούς μεταφοράς ηλεκτρολυτών με αποτέλεσμα την εμφάνιση υποκαλιαιμίας και υπονατριάιμιας λόγω αυξημένων απωλειών υγρών. Η υποκαλιαιμία έχει αναφερθεί ως το πιο χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα οξείας νεφρικής ανεπάρκειας που προκαλείται από λεπτοσπείρωση (Abdulkader & Silva 2008).

Παρατηρείται υπόταση που κατά τη διάρκεια της νόσου μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια και οφείλεται, κυρίως στην επικρατούσα μειωμένη συστηματική αγγειακή αντίσταση καθώς και στην αφυδάτωση, που είναι αποτέλεσμα συμπτωμάτων όπως ο πυρετός, ο εμετός και η διάρροια (Siriwanij et al., 2005, Abdulkader & Silva 2008). Παράλληλα, η αφυδάτωση μπορεί να προκαλέσει υποογκαιμία που μπορεί να επιδεινωθεί λόγω της μειωμένης επαναπρόσληψης του εγγύς νατρίου με αποτέλεσμα την αύξηση της αλδοστερόνης και της κορτιζόλης στο αίμα. Η αιμοραγία λόγω ενδοθηλιακού τραυματισμού αποτελεί ειδικά στις πιο σοβαρές περιπτώσεις, παράγοντα που μπορεί να συμβάλει στην υποογκαιμία.

Η ανάλυση ούρων εμφανίζει συχνά πρωτεϊνουρία, πυουρία, κοκκώδεις εκμαγνήσεις και περιστασιακά ακόμα πιο σπάνια μικροσκοπική αιματοουρία. Μέσω της μικροσκόπησης σκοτεινού πεδίου μπορούμε να παρατηρήσουμε την παρουσία λεπτόσπειρων στα ούρα μεταξύ της 1 έως και την 4 εβδομάδα της μόλυνσης(Andrade et al., 2008, Seguro & Andrade 2013).

Τα πνευμονικά συμπτώματα που εμφανίζονται κατά την λοίμωξη από λεπτοσπείρωση αφορούν το 20% έως το 70% των ασθενών καταγράφοντας αυξημένη τάση τα τελευταία χρόνια και μπορούν να κυμανθούν από τα ήπιας μορφής έως σοβαρότητα μορφής και αποτελούνται από τον βήχα, τον πόνο στο στήθος, την δύσπνοια και την ήπια έως σοβαρή μορφής αιμόπτυσης σε οξύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (SPHS)(Dolhnikoff 2007 et al.,).

Τα συμπτώματα συνήθως εμφανίζονται κατά την τέταρτη έως την έκτη ημέρα εκδήλωσης της νόσου και μπορούν να οδηγήσουν στο θάνατο του ασθενή σε λιγότερο από 72 ώρες. Η εκδήλωση των πνευμονικών συμπτωμάτων αποτελεί λοίμωξη που μπορεί να συναντάται ανεξάρτητα ή ταυτόχρονα με τις νεφρικές και ηπατικές εκδηλώσεις (Dolhnikoff et al., 2007).

Η σοβαρή πνευμονική μορφή λεπτοσπείρωσης (SPFL) που συναντάμε εκδηλώνεται συνήθως ως πνευμονική μαζική αιμορραγία αποτέλεσμα της οποίας αποτελεί η αναπνευστική ανεπάρκεια και ο θάνατος από ασφυξία παρουσιάζοντας ταχεία και σοβαρή πορεία με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας περίπου από 30% έως 60%(Gulati et Gulati 2012).

Η αιμόπτυση αποτελεί κύρια και συχνή πνευμονική εκδήλωση κατά την λεπτοσπείρωση όπου μπορεί να την συναντάμε από ήπια έως σοβαρή και σχετίζεται με την θνησιμότητα ανάλογα με την σοβαρότητα της εκδήλωσης. Η αναπνευστική λειτουργία παρεμποδίζεται περαιτέρω από την ανάπτυξη πνευμονικού οιδήματος, απόθεση του ινώδους και από την αύξηση των ινοβλαστικών αντιδράσεων. Κατά την ιστολογική παρατήρηση παρουσιάζονται εστίες διάμεσης και ενδοκυψελικής αιμορραγίας με διάχυτη την κυψελιδική βλάβη λόγω βλάβης στο τριχοειδές ενδοθήλιο(Dolhnikoff et al., 2007).

Οι βλάβες που προκαλούνται στους πνεύμονες από την νόσο της λεπτοσπείρωσης μπορούν να αποτυπωθούν στην ακτινογραφία θώρακος. Τα ευρήματα μπορούν να γίνουν ορατά στις πρώτες 24 έως 72 ώρες από την έναρξη της νόσου στον άνθρωπο και αποτελεί ένα άκομα πράγοντα που διενεργείται παράλληλα με διάφορους μεθόδους διάγνωσης και μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση(Εικόνα 8.).



Εικόνα 8. Ακτινογραφία θώρακος όπου διακρίνονται οι αλλοιώσεις του πνεύμονα που προκαλούνται από την νόσο της λεπτοσπείρωσης.

Τα ευρήματα μπορούν να εμφανίζονται από τις πρώτες 24 ώρες, ωστόσο συχνά εμφανίζονται κατά την 3 έως την 9 ημέρα. Μέσω της ακτινογραφίας θώρακος αποκαλύπτονται αμφίπλευρη κυψελιδική σκίαση. Εμφανίζονται οζώδεις σκιάσεις με περιοχές ενοποίησης όπου διαγράφονται πυκνότερα στις μεσαίες και χαμηλότερες ζώνες, συρρέουσες ατελεκτασίες και σκιάσεις δίκην υάλου. Οι πνευμονικές αλλοιώσεις συνήθως μετά το πέρας των 15 ημερών εξαλείφονται και οι πνεύμονες παρουσιάζονται χωρίς μόνιμη ζημιά(Dolhnikoff et al., 2007, Gulati & Gulati 2012).

Η καρδιά αποτελεί ακόμα ένα όργανο που μπορεί να συμμετέχει παράλληλα με άλλα όργανα στην κλινική εικόνα από την λεπτοσπείρωση παρόλο που συχνά εμφανίζεται να υποτιμάται και να υποδιαγιγνώσκεται ο βαθμός της κρισιμότητας της βλάβης(Bal 2005, Chakurka et al., 2008)

Η κλινική εικόνα του ασθενή συνήθως παρουσιάζει την εμφάνιση ηλεκτροκαρδιογραφικών ανωμαλιών με την κολλική μαρμαρυγή να αποτελεί την κυριότερη μείζων αρρυθμία που καταγράφεται. Η καρδιακή αρρυθμία παρουσιάζεται πιο συχνά σε ασθενείς που η λεπτοσπείρωση επιφέρει τον θάνατο από ότι στους επιζώντες. Η καταγραφή θανατηφόρας μυοκαρδίτιδας αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1935. Η μυοκαρδίτιδα εμφανίζεται συχνά σε ποσοστό πάνω από το 50% των ασθενών. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί η κολποκοιλιακή απόφραξη, η στεφανιαία αρτηρίτιδα, η περικαρδίτιδα και η αιμορραγία του μυοκαρδίου. Σημαντική αγγειακή βλάβη που έχει αναφερθεί κατά την λοίμωξη από λεπτοσπείρωση σε ποσοστό 57,8% των περιπτώσεων αποτελεί η αορτίτιδα.(Levett 2001, Bal 2005, Salkade 2005, Chakurka et al., 2008, De Brito et al., 2018).

Κατά την παρουσία σοβαρής μορφής λεπτοσπείρωσης η εμφάνιση πτώσης του επιπέδου συνείδησης του ασθενή μπορεί να αποτελεί δείκτη της μηνιγγιοεγκεφαλίτιδας. Επίσης, μπορούν να εμφανιστούν μια σειρά από πιο σπάνιες νευρολογικές επιπλοκές όπως, το σύνδρομο Guillain-Barré, η μυελοπάθεια, η παρεγκεφαλιδική δυσλειτουργία, η εγκάρσια μυελίτιδα και η ημιπληγία(Bal 2005, Haake & Levett 2015).

Η λεπτοσπείρωση έχει καταγραφεί κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης με συμπτώματα που ποικίλουν και έχουν προαναφερθεί. Τα αποτελέσματα που μπορούν να προκύψουν κατά την πορεία της εγκυμοσύνης περιλαμβάνουν την απώλεια του εμβρύου και την αποβολή, όπου παρουσιάζεται συνήθως εντός των πρώτων μηνών της εγκυμοσύνης, την θνησιγένεια, της συγγενούς μόλυνσης και μείωση της ποσότητας του αμνιακού υγρού με εμφάνιση ολιγοϋδράμιου(Koe et al., 2014).

6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους μεθόδους που στοχεύουν είτε στην άμεση είτε στην έμμεση ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού. Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται βασίζονται στην άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού ή των συστατικών του στα σωματικά υγρά ή τους ιστούς, μέσω της απομόνωσης των λεπτόσπειρων σε καλλιέργειες, μέσω

ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή ή μέσω ανίχνευσης του γενετικού υλικού του παθογόνου. Η έμμεση ταυτοποίηση του μικροοργανισμού μπορεί να επιτευχθεί με μεθόδους που βασίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό του αίματος που παράγονται λόγω της έκθεσης του στον παθογόνο μικροοργανισμό (Haake & Levett 2015).

6.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου

Η μικροσκόπηση της λεπτόσπειρας απαιτεί την εφαρμογή σκοτεινού πεδίου για την παρατήρησή της λόγω του μεγέθους της, με περίπου διάμετρο 0,1μm και μήκος 6-20μm, αλλά και λόγω της κινητικότητάς της (Levett 2001, Picardeau 2013).

Το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου αποτελεί μία άμεση μέθοδο για την ταυτοποίηση της παρουσίας της λεπτόσπειρας σε σωματικά υγρά όπως του αίματος, των ούρων και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Η εξέταση του αίματος ή του ΕΝΥ για ανίχνευση λεπτόσπειρας πρέπει να διενεργηθεί κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της ασθένειας ενώ η εξέταση των ούρων μπορεί να διενεργηθεί στο διάστημα από το τέλος της δεύτερης εβδομάδας μέχρι περίπου για 40 ημέρες (Picardeau 2013 , Mythri 2015).

Η ανίχνευση των λεπτόσπειρων είναι τεχνικά αρκετά απαιτητική με χαμηλή ευαισθησία, με το κατώτατο όριο που μπορεί να διακριθεί είναι περίπου 10^4 λεπτόσπειρες / mL, και απαιτείται σημαντική εμπειρία για την διάκριση των λεπτόσπειρων από άλλα στοιχεία όπως νημάτια ινώδους στο αίμα. Επομένως, η ψευδώς θετική και η ψευδώς αρνητική διάγνωση εμφανίζεται αρκετά πιθανή, για αυτό τον λόγο η μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνεπικουρικά με άλλες μεθόδους διάγνωσης για την λεπτοσπείρωση (Picardeau 2013 , Picardeau et al., 2014, Mythri 2015).

Για την άμεση εξέταση και την ανίχνευση των λεπτόσπειρων υπάρχουν διάφορες τεχνικές χρώσεων οι οποίες σκοπό έχουν να αυξήσουν την ευαισθησία της εξέτασης και αποτελούνται από την χρώση αργύρου (Warthin-Starry), την χρώση ανοσοφθορισμού, την χρώση ανοσοϊστοχημείας. Η κάθε εφαρμογή παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά

αλλά παρουσιάζουν το ίδιο μειονεκτήμα με τη μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου δηλαδή υψηλό κίνδυνο ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων(Musso & Scola 2013, Mythri 2015).

Η χρώση του ανοσοφθορισμού περιλαμβάνει την εξέταση των ούρων, των σωματικών υγρών και των ιστών. Ως αντιδραστήριο ανίχνευσης χρησιμοποιούνται αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική. Προτιμάται από την χρώση αργύρου διότι είναι ευκολότερη η διάκριση των λεπτόσπειρων, ακόμα και όταν ο αριθμός των λεπτόσπειρων είναι μικρός. Ωστόσο χρίζεται απαραίτητος ο ειδικός εξοπλισμός, μικροσκόπιο φθορισμού και απαιτείται η προετοιμασία ειδικών επισημασμένων αντιορών(Picardeau et al., 2014, Mythri 2015).

Μέσω των χρώσεων ανοσοϊστοχημείας επιτρέπεται η διάκριση των λεπτόσπειρων σε κλινικά δείγματα, ιστούς που έχουν υποστεί μονιμοποίηση με φορμόλη, ανιχνεύοντας αντιγόνα λεπτόσπειρων μέσω της μέθοδου ανοσοϊστοχημείας και αποθηκευόντάς τα για σημαντικό χρονικό διάστημα, καθιστώντας ιδιαίτερα χρήσιμη για τις αναδρομικές μελέτες(Levett 2001, Mythri 2015).

6.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΑΣ ΜΕΣΩ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η απομόνωση της λεπτόσπειρας μέσω καλλιέργειας περιλαμβάνει δείγματα βιολογικών υγρών όπως το αίμα, το ENY, το περιτοναϊκό υγρό και τα ούρα. Σημαντική παράμετρος παρουσιάζεται η κατάλληλη χρονική περίοδος για την συλλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια θα πρέπει να συλλέγονται πριν από την χορήγηση αντιβιοτικών καθώς μετά την χορήγηση των αντιβιοτικών θα εμφανίζεται ελάχιστος έως μηδενικός αριθμός λεπτόσπειρων(Musso & Scola 2013, Jiménez et al., 2018).

Όσο αφορά το αίμα, το ENY και το περιτοναϊκό υγρό η καλλιέργεια θα πρέπει να διενεργηθεί ειδικά όσο αφορά το αίμα το συντομότερο δυνατό από την υποψία λοίμωξης, από την πρώτη έως και την δέκατη ημέρα της έναρξης των συμπτωμάτων. Ενώ για τις καλλιέργειες των ούρων θα πρέπει να διενεργούνται από την αρχή της δεύτερης εβδομάδας έναρξης των συμπτωμάτων. Η καλλιέργεια των ούρων πρέπει να διενεργείται άμεσα, εντός περίπου 2 ωρών, καθώς το όξινο pH των ούρων αποτελεί

ανασταλτικό παράγοντα για την επιβίωση των λεπτόσπειρων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η έκκριση των λεπτόσπειρων στα ούρα μπορεί να διαρκέσει έως και αρκετές εβδομάδες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων (Musso & Scola 2013, Haake & Levett 2015, Mythri 2015).

Τα ειδικά θεραπευτικά υποστρώματα, όπως το Fletcher ή το Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) χρησιμοποιούνται ευρέως για την καλλιέργεια των λεπτόσπειρων. Η επώαση των καλλιεργειών διενεργείται στους 28 °C έως 30 °C, με την απομόνωση του οργανισμού να επιτυγχάνεται από 5% έως 50% των περιπτώσεων, όπου εξετάζονται εβδομαδιαίως για ταυτοποίηση του παθογόνου μέσω μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου για διάστημα έως και 13 εβδομάδες (Levett 2001, Musso & Scola 2013, Haake & Levett 2015, Jiménez et al., 2018).

6.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μοριακή μέθοδο για την ανίχνευση ακόμα και μικρών τμημάτων DNA όπου τα τελευταία χρόνια τείνει να χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης. Η ευρύτερη χρησιμοποίησή της οφείλεται εν μέρει λόγω της υψηλής ευαισθησίας όσο και της δυνατότητας που δίνεται για έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Οι παράμετροι που αναφέρθηκαν οδήγησαν τις τελευταίες τρεις δεκαετίες στην ανάπτυξη διάφορων δοκιμασιών τόσο στην συμβατική PCR όσο και στην Real-Time PCR με σκοπό την βελτίωση της υψηλής ευαισθησίας και της άμεσης διάγνωσης (Ahmed et al., 2009, Picardeau 2013, Picardeau et al., 2014, Mythri 2015, Mullan & Panwala 2016).

Οι εφαρμογές της PCR καλύπτουν ένα μεγάλο φάσμα δειγμάτων που μπορούν να διαγνωστούν για λεπτοσπείρωση όπως δείγματα αίματος, ούρων, ENY και ιστών. Η μέθοδος λόγω της υψηλής ευαισθησίας έχει την ικανότητα να ανιχνεύει από 10 έως 100

λεπτόσπειρες / ml αίματος ή ούρων. (Stoddard 2009, Bourhy 2011, Picardeau 2013 , Mythri 2015).

Η αρχή της PCR βασίζεται στη δυνατότητα ανίχνευσης των γονιδίων που εμφανίζονται γενικά σε όλα τα βακτήρια όπως το *gyrB*, το *irs* (γονίδιο 16S rRNA), *secY* ή γονίδια που εμφανίζονται μόνο στο παθογόνο γένος *Leptospira spp*, όπως το *lipL32*, το *lfb1*, *ligA* και το *ligB2*(Smythe et al., 2002, Ahmed et al., 2009, Boonsilp et al., 2011, Musso & Scola 2013).

Η δυνατότητα της PCR να ανιχνεύει το DNA της λεπτόσπειρας από τις πρώτες 5 έως 10 ημέρες μετά την εμφάνιση της νόσου μέχρι και την 15^η ημέρα αλλά και η δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης DNA τόσο στο ENY όσο και στο υδατοειδές υγρό του οφθαλμού όπου παρουσιάζουν χαμηλότερους τίτλους αντισωμάτων και μπορεί να εμφανίζονται αργότερα σε σχέση με τον ορό, αποτελούν σημαντικό πλεονέκτημα για την έγκαιρη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης(Planka & Dean 2000, Mythri 2015, Mullan & Panwala 2016).

Οι διάφορες παραλλαγές της PCR αναπτύχθηκαν με στόχο να βελτιώσουν περαιτέρω την ευαισθησία της μεθόδου και την άμεση διάγνωση της λεπτοσπείρωσης από τα διάφορα κλινικά δείγματα. Αυτό έχει επιτευχθεί με την εξέλιξη της συμβατικής PCR με την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time qPCR).

Η Real Time PCR παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα με χαμηλό κίνδυνο επιμόλυνσης μειώνοντας τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στην Real Time PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση είτε η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I που μπορεί να δεσμευτεί μη ειδικά με το δίκλωνο DNA στοχεύοντας στα γονίδια *secY* ή *lipL32*, όπου δίνεται η δυνατότητα διάκρισης μεταξύ παθογόνου ή μη παθογόνου λεπτόσπειρας χωρίς την δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των διαφορετικών ειδών ή ο ανιχνευτής TaqMan (TaqMan probes) σημασμένος με φθορίζον χρωστική που επιτρέπει την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του *irs* (16S rRNA) ή του *lipL32* γονιδίου του γένους *Leptospira spp*(Smythe et al., 2002, Ferreira et al., 2014).

Η χρωστική SYTO9 αποτελεί μία εναλλακτική επιλογή της χρωστικής SYBR Green I για την χρήση σε Real Time PCR και θεωρήθηκε ότι αποτελεί μέθοδο ευκολότερη στη

χρήση, λιγότερο ανασταλτική για την PCR από ότι η SYBR Green I και δεν ανιχνεύει επιλεκτικά συγκεκριμένα αμπλικόνια (Monis et al., 2005).

Σημαντικός περιορισμός στην ανίχνευση της λεπτόσπειρας μέσω της PCR αποτελεί η αδυναμία της μεθόδου να προσδιορίσει τον ορότυπο που προκαλεί την μόλυνση. Αυτός ο περιορισμός δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στον προσδιορισμό μεμονομένα της κλινικής εικόνας του ασθενή αντίθετα αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την καταγραφή ευρύτερα επιδημιολογικών δεδομένων της νόσου (Picardeau 2013, Ferreira et al., 2014, Picardeau et al., 2014). Ωστόσο, καταγράφονται σημαντικές προσπάθειες σε ορισμένες περιπτώσεις άμεσης αναγνώρισης του ορότυπου καθιστώντας στο μέλλον οράτη την ταυτοποίηση του ορότυπου (Picardeau et al., 2014, Haake & Levett 2015).

Η μέθοδος εμφανίζει επίσης δυσκολία στην εφαρμογή της, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες καθώς για την ανίχνευση της λεπτόσπειρας τόσο της συμβατικής αλλά και των διάφορων παραλλαγών της PCR κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη ειδικού εξοπλισμού, αντιδραστηρίων με σχετικά υψηλό κόστος και εξειδικευμένου προσωπικού αλλά και η απουσία μη αυτοματοποιημένων και τυποποιημένων διαδικασιών αποτρέπουν την ανάλυση πολυάριθμων δειγμάτων (Mythri 2015).

Τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων

Οι τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων αποτελούν εναλλακτική λύση για την μέθοδο της PCR. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αύξηση των τεχνικών ισοθερμικών αντιδράσεων όπου συμπεριλαμβάνονται η ενίσχυση εξαρτώμενη από ελικάση (HDA), η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP), η ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου (RCA), η αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA), η ενίσχυση μετά από εκτόπιση αλυσίδας (SDA) μερικές από τις οποίες εφαρμόστηκαν για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης (Sonthayanon et al., 2011, Koizumi et al., 2012, Picardeau et al., 2014).

Βασική διαφορά της τεχνικής σε σχέση με την μέθοδο της PCR αποτελεί ότι η χρήση διακριτών ενζύμων απαιτεί μια συσκευή θέρμανσης να διατηρεί μία σταθερή θερμοκρασία 60-65 °C σε αντίθεση με την μέθοδο της PCR που κρίνεται απαραίτητος ο θερμικός κυκλοποιητής καθιστώντας την θεωρητικά κατάλληλη για δοκιμασίες

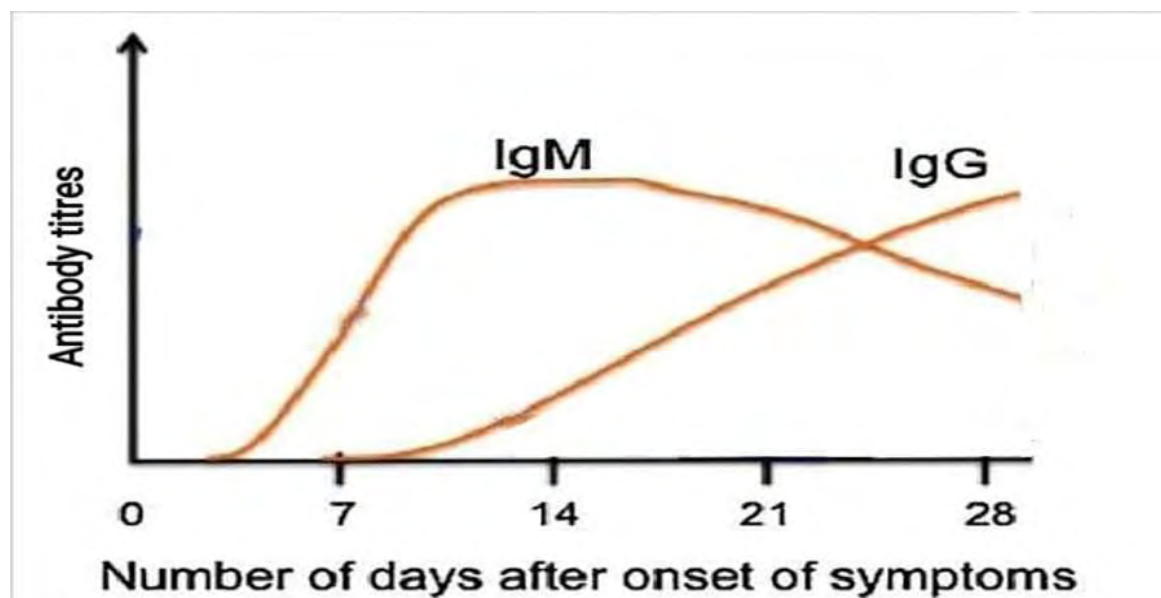
περιορισμένων πόρων όσο αναφορά τις αναπτυσσόμενες χώρες(Mori & Notomi 2009, Picardeau 2013 , Picardeau et al., 2014).

Ωστόσο, σε δοκιμασίες που διενεργήθηκαν με στόχο τα γονίδια *lipL41* ή *rrs* για την ταχεία ανίχνευση παθογόνων *Leptospira spp* μέσω της ισοθερμικής ενίσχυσης βρόγχου (LAMP) παρατηρήθηκε ότι η ειδικότητα αυτών των μεθόδων καταγράφηκε ασθενές και το όριο ανίχνευσης να κυμαίνεται μεταξύ 2 και 100 λεπτόσπειρες ανά μείγμα αντίδρασης(Lin et al., 2009, Sonthayanon et al., 2011, Koizumi et al., 2012).

Επομένως, ο βαθμός χρησιμότητας της LAMP ως μέθοδος ανίχνευσης της λεπτοσπείρωσης θα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω ειδικά σε ενδημικές περιοχές με περιορισμένους πόρους(Picardeau 2013 , Picardeau et al., 2014).

6.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Οι ορολογικές μέθοδοι έχει καταγραφεί ότι χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση της λεπτοσπείρωσης. Οι ορολογικές μέθοδοι βασίζονται στην ανίχνευση των αντισωμάτων IgM και IgG που παράγονται ως ανοσολογική απόκριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού που προσβλήθηκε από τον παθογόνο μικροοργανισμό(Goris et al., 2011).



Εικόνα 9. Γραφική παράσταση όπου απεικονίζεται η εμφάνιση των IgM αντισωμάτων κατά τις πρώτες μέρες της έκθεσης στον λοιμογόνο παράγοντα όπου στην συνέχεια ακολουθεί η εμφάνιση των IgG αντισωμάτων.(adapted from Picardeau M)

Χαρακτηριστικό της ανοσολογικής απόκρισης αποτελεί το γεγονός ότι τα αντισώματα IgM εμφανίζονται πρώτα σε σχέση με τα αντισώματα IgG. Τα αντισώματα IgM εμφανίζονται ήδη από τις πρώτες ημέρες(περίπου από την 4-5 ημέρα) εμφάνισης των συμπτωμάτων της νόσου όπου στη συνέχεια ακολουθεί η εμφάνιση των IgG αντισωμάτων(Εικόνα 9)(Silva et al., 1995, Picardeau 2013).

Η παραμονή των αντισωμάτων γίνεται συνήθως εμφανής και μετά από την μόλυνση για μεγάλο χρονικό διάστημα, τουλάχιστον για 5 μήνες, με την παραμονή των IgG αντισωμάτων να χαρακτηρίζεται βραχύτερη σε σχέση με τα IgM αντισώματα. Επομένως, η ανίχνευση των αντισωμάτων IgM χρησιμοποιείται από μεθόδους για την εντόπιση της νόσου στο αρχικό στάδιο έναντι των IgG αντισωμάτων που χαρακτηρίζονται κατάλληλα για μεθόδους που ανιχνεύουν αντισώματα σε προχωρημένο στάδιο της λοιμώξεως(Silva et al., 1995, Picardeau 2013).

Δοκιμή Μικροσκοπικής Συγκόλλησης (Microscopic Agglutination Test - MAT)

Η δοκιμή μικροσκοπικής συγκόλλησης (MAT) αποτελεί ορολογική μέθοδο που αναπτύχθηκε το 1918 από τους Martin και Pettit όπου παραμένει μέχρι σήμερα η δοκιμή αναφοράς για την ορολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης που εφαρμόζεται σε όλα τα είδη θηλαστικών τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα(Goris et al., 2012 , Musso & Scola 2013, Picardeau 2013).

Κατά την διάρκεια της μεθόδου MAT τα εναιωρήματα ζωντανών αντιγόνων λεπτόσπειρων που αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς ορότυπους αντιδρούν με τα αντισώματα από ορό αίματος δειγμάτων που χρήζουν προς διερεύνηση και η μετέπειτα συγκόλληση εξετάζεται σε μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου(Musso & Scola 2013).

Οπότε για την εφαρμογή της μεθόδου κρίνεται απαραίτητη η διατήρηση στο εργαστήριο καλλιιεργιών ζωντανών λεπτόσπειρων που ανήκουν σε διαφορετικούς ορότυπους και

μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα. Επίσης, κρίνεται αναγκαία η ποικιλία των αντιγόνων που θα χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνοντας ορότυπους που αποτελούν αντιπροσωπευτικοί όλων των οροομάδων

Για την ορολογική επιβεβαίωση κρουσμάτων λοίμωξης λεπτοσπείρωσης αποτελεί κριτήριο η ορομετατροπή ή τετραπλάσια αύξηση του τίτλου που μπορεί να παρουσιαστεί σε δύο ζεύγη δειγμάτων ορού ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα μεταξύ των δειγμάτων των ορών. Όσον αφορά για την επιλογή του κατάλληλου χρονικού διαστήματος μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου δείγματος σε περιπτώσεις που εμφανίζονται τυπικά συμπτώματα της λεπτοσπείρωσης, τότε ένα διάστημα μεταξύ 3 έως 5 ημερών μπορεί να αποτελεί επαρκές για την ανίχνευση των αυξανόμενων τίτλων. Αντίθετα, σε περιπτώσεις που η έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων δεν μπορεί να διευκρινιστεί με μεγάλη ακρίβεια προτιμάται ένα χρονικό διάστημα περίπου δύο έως τριών εβδομάδων μεταξύ των δύο δειγμάτων για την ανίχνευση των αυξανόμενων τίτλων (Wuthiekanun et al., 2007, Haake & Levett 2015).

Για την ερμηνεία των διαγνωστικών αποτελεσμάτων της MAT σημαντικό ρόλο παίζει αν η νόσος εκδηλώνεται σε ενδημική ή μη περιοχή όπως και ο προσδιορισμός με σχετική ακρίβεια του χρονικού διαστήματος της έναρξης εκδήλωσης των συμπτωμάτων. Σε χώρες μη ενδημικές που η παρουσία της νόσου της λεπτοσπείρωσης είναι σπάνια δεν απαιτείται μεγάλος τίτλος αντισωμάτων, αντίθετα σε ενδημικές χώρες όπου η έκθεση συναντάται συχνά κρίνεται απαραίτητος ο αυξημένος τίτλος. Συνήθως, σε περιπτώσεις που συναντάμε σε μη ενδημική περιοχή, οποιοδήποτε επίπεδο αντισωμάτων, όσο χαμηλό, μπορεί να σημαίνει λεπτοσπείρωση την 1^η εβδομάδα εκδήλωσης με παράλληλη εμφάνιση κλινικής εικόνας συμβατής με την νόσο (Musso & Scola 2013).

Το CDC θεωρεί ότι ένας τίτλος με τιμή ≥ 200 με παράλληλη εμφάνιση κλινικής εικόνας συμβατής με την νόσο μπορεί να θεωρηθεί πιθανό κρούσμα λεπτοσπείρωσης. Σε περιπτώσεις που εμφανίζονται σε μη ενδημική περιοχή. Η LERG αναφέρει ότι μία δοκιμασία MAT με τίτλο ≥ 400 , όσο αφορά τις ενδημικές περιοχές και μία δοκιμασία MAT με τίτλο ≥ 100 όσο αφορά τις μη ενδημικές περιοχές, μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό για την ταυτοποίηση της λεπτοσπείρωσης στο δείγμα. Στις περιπτώσεις όπου συναντάται κρούσματα σε πολύ υψηλές ενδημικές περιοχές κρίνεται αποδεκτός ο τίτλος με τιμή ≥ 800 με παράλληλη εμφάνιση κλινικής εικόνας συμβατής με την νόσο αλλά συνιστάται ο

τίτλος με τιμή ≥ 1600 (Wuthiekanun et al., 2007, Goris et al., 2012 , Musso & Scola 2013).

Η δοκιμασία έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει την παρουσία τόσο IgM αντισωμάτων όσο IgG αντισωμάτων όπου συνήθως εμφανίζονται στο αίμα περίπου από την 5^η έως την 10^η ημέρα μετά την έναρξη της νόσου, ωστόσο η εμφάνιση των αντισωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί αργότερα αν έχουν χορηγηθεί αντιβιοτικά έναντι στον παθογόνο παράγοντα. Η δυνατότητα της μεθόδου να ανιχνεύσει την παρουσία αντισωμάτων που ανήκουν σε αυτές τις δύο κατηγορίες καθιστά δύσκολο σε κάποιες περιπτώσεις τον χρονικό καθορισμό της λοίμωξης, αν δηλαδή η παρουσία τους οφείλεται σε πρόσφατο ή παρελθόντα χρόνο(Levett 2001, Goris et al., 2012 , Musso & Scola 2013).

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει καταγραφεί η εμφάνιση των αντισωμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα από την πρώτη εμφάνιση των πρώιμων συμπτωμάτων ακόμα και μετά το πέρας της ασθένειας όπου έχουν γίνει αναφορές για τιμές τίτλων ≥ 800 για το χρονικό διάστημα από 3 έως 13 μήνες, με περιπτώσεις που διατηρούσαν τους τίτλους των 800 άνω των 13 μηνών ακόμα καταγράφηκαν αναφορές για τιμή τίτλου ≥ 192 για το χρονικό διάστημα των 7 ετών(Blackmore et al., 1984, Romero et al., 1998).

Η ορολογική μέθοδος MAT χαρακτηρίζεται από τον υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας στην ανίχνευση στον ορό του δείγματος. Η ικανότητα της μεθόδου να ταυτοποιεί συγκεκριμένους ορότυπους που ανήκουν σε οροομάδες την καθιστά ιδανική μέθοδο ανίχνευσης της λεπτοσπείρωσης για χρήση των δεδομένων της νόσου σε επιδημιολογικές μελέτες(Levett 2001).

Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ανάγκη για ζωντανές καλλιέργειες λεπτόσπειρων. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται ακριβή, τεχνικά ιδιαίτερα απαιτητική με απαραίτητο σημαντικό χρόνο για την διενέργεια της. Αυτό προϋποθέτει την παρουσία εξειδικευμένου και παράλληλα έμπειρου προσωπικού όπως και εξειδικευμένου εργαστηρίου για τον χειρισμό και καλλιέργεια των λεπτόσπειρων(Picardeau 2013 , Haake & Levett 2015).

Ανοσοενζυμική δοκιμασία (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay - ELISA)

Η εκτέλεση της μεθόδου MAT απαιτεί σημαντικό χρόνο, την ανάγκη για ζωντανές καλλιέργειες και την παρουσία εξειδικευμένου προσωπικού και εγκαταστάσεων. Η Ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA) αποτελεί ορολογική μέθοδο που χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση έναντι της δοκιμασίας MAT για την ανίχνευση της λεπτοσπείρωσης(Desakorn et al., 2012, Signorini et al., 2013).

Η ELISA αποτελεί σχετικά εύκολη εκτελέσιμη δοκιμασία καθώς μπορεί να εκτελεστεί με ελάχιστη εκπαίδευση, φθηνότερη, ταχύτερη καθώς μπορεί να παρέχει αποτελέσματα σε 2 έως 4 ώρες και πιο ασφαλέστερη δοκιμασία καθώς δεν χρησιμοποιεί ζωντανές παθογόνες καλλιέργειες μειώνοντας τον κίνδυνο της μόλυνσης του εργαστηριακού προσωπικού κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας(Rosa et al., 2017).

Η αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας ELISA για την διάγνωση της νόσου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το στάδιο εκδήλωσης της ασθένειας, το αντιγόνο που θα χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση της δοκιμασίας, όσο και της κατηγορίας του αντισώματος που θα ανιχνευθεί από την δοκιμασία.(Nakarim & Pradutkanchana 2004)

Η δοκιμασία έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την παρουσία τόσο των αντισωμάτων IgM όσο και των αντισωμάτων IgG. Το πλεονέκτημα της δοκιμασίας να ανιχνεύει μόνο τα αντισώματα IgM ή μόνο τα αντισώματα IgG αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην πιο άμεση διάγνωση της νόσου. Δεδομένου ότι τα αντισώματα IgM εμφανίζονται ήδη από τις πρώτες ημέρες, περίπου από την 4^η-5^η ημέρα, εμφάνισης των συμπτωμάτων της νόσου όπου στην συνέχεια ακολουθεί η εμφάνιση των IgG αντισωμάτων, δίνεται η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση οξείας λοίμωξης μέσω των IgM αντισωμάτων(Signorini et al., 2013 , Rosa et al., 2017).

Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου της λεπτοσπείρωσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αντιμετώπιση της λοίμωξης μέσω της χορήγησης των αντιβιοτικών, καθώς τα οφέλη από την επίδρασή τους κρίνονται σημαντικότερα για την εξέλιξη της νόσου όταν

χορηγούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα από την έναρξη της λοίμωξης(Desakorn et al., 2012).

Οι διάφορες παραλλαγές της ELISA που εφαρμόζονται έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τα συγκεκριμένα αντισώματα που αντιδρούν με αντιγόνα ειδικά προς αυτά χωρίς να διακρίνουν τους συγκεκριμένους ορότυπους που εμπλέκονται στην πρόκληση της λοίμωξης.

Οι δοκιμασίες IgM ELISA χρησιμοποιούν συνήθως ως αντιγόνο το μη παθογόνο στέλεχος *L. biflexa* ορότυπο Patoc, το οποίο μοιράζεται αρκετά επιφανειακά αντιγόνα με αντίστοιχα επιφανειακά αντιγόνα με παθογόνα στελέχη(Musso & Scola 2013, Haake & Levett 2015).

Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της δοκιμασίας αποτελεί η πιθανότητα να προκληθεί διασταυρούμενη αντίδραση που οφείλεται σε άλλες μεταδοτικές ασθένειες δίνοντας με αυτό τον τρόπο ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ωστόσο, ο παραπάνω περιορισμός μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της χρήσης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, που εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη πολλών παθογόνων, μεταξύ αυτών πρωτεΐνες όπως η LipL32, η LipL41, η OmpL1, η Loa22 και οι πρωτεΐνες Lig οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν ως εξαιρετικά αντιγόνα-στόχοι για την ανίχνευση της λεπτοσπείρωσης(Desakorn et al., 2012, Chen et al., 2013, Kitashoji et al., 2015).

Ο Π.Ο.Υ προτρέπει την IgM ELISA δοκιμασία ως κατάλληλη διαγνωστική μέθοδος για την οροδιάγνωση της λεπτοσπείρωσης σε χώρες όπου οι πόροι για την υγειονομική περίθαλψη κρίνονται περιορισμένοι(Desakorn et al., 2012).

Βάση ανάμεσα σε διάφορες αναφορές έχει καταγραφεί ότι η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 0.779 (95% CI 0.770-0.789) και 0.913 (95% CI 0.908-0.917), αντίστοιχα, ωστόσο παρουσιάζεται ετερογένεια στην ειδικότητα και στην ευαισθησία της μεθόδου(Signorini et al., 2013).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα παρουσιάζουν ετερογένεια με ποσοστό 76% και 82% αντίστοιχα σε έρευνα στην Ταϊλάνδη, το 35% και το 98% στη Χαβάη και το 61% και 66% στο Λάος(Picardeau 2013).

Η παρουσία αυτής της ετερογένειας των τιμών μπορεί να οφείλεται στις διάφορες παραλλαγές που συναντάμε στις δοκιμασίες ELISA, όπως ο τύπος του αντισώματος που προσδιορίζεται με την δοκιμασία, ο τύπος του αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία (Signorini et al., 2013).

Επίσης, μπορεί να οφείλεται λόγω των χαρακτηριστικών του, υπό διερεύνηση πληθυσμού δηλαδή αν ο πληθυσμός που υποβλήθηκε σε δειγματοληψία βρίσκονταν στην οξεία φάση ή στην φάση ανάρρωσης και στον πληθυσμό που μελετήθηκε όπου η προηγούμενη έκθεση στον παθογόνο παράγοντα κρίνεται πολύ πιθανή λόγω και του ενδμικού χαρακτηρισμού των περιοχών (Musso & Scola 2013, Picardeau 2013, Signorini et al., 2013).

7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με ήπιες μορφές συμπτώματα που δεν χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής από τον ασθενή και μπορεί να μην αναζητήσει περαιτέρω νοσοκομειακή περίθαλψη. Ωστόσο σε περιπτώσεις που θα καταφύγουν σε νοσοκομειακή περίθαλψη κρίνεται σημαντική η έγκαιρη αναγνώριση και διάγνωση της λεπτοσπείρωσης στο αρχικό στάδιο εκδήλωσης της νόσου. Η άμεση συσχέτιση των πρώιμων συμπτωμάτων του ασθενή με τα συμπτώματα που εκδηλώνονται κατά την λοίμωξη από λεπτοσπείρωση συμβάλλει στην έγκαιρη λήψη κατάλληλης θεραπείας που συμβάλλει στην εξάλειψη της νόσου και την πρόληψη της σοβαρής εξέλιξης της νόσου (Kobayashi 2001, Haake & Levvet 2015).

Η υποστηρικτική θεραπεία των ασθενών περιλαμβάνει την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων σε διάφορες εκδηλώσεις σοβαρής μορφής λεπτοσπείρωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις συχνά συναντάμε την εμφάνιση υποκαλιαϊμίας και νεφρικής δυσλειτουργίας. Η αντιμετώπιση της υποκαλιαϊμίας μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενδοφλέβιας ενυδάτωσης με συμπλήρωμα καλίου, αποφεύγοντας την αφυδάτωση αλλά παράλληλα αποτρέποντας την εμφάνιση ολιγουρικής νεφρικής ανεπάρκειας. Ωστόσο, σε περίπτωση εμφάνισης ολιγουρικής νεφρικής ανεπάρκειας η αιμοκάθαρση ή η

περιτοναϊκή κάθαρση αποτελούν χρήσιμες πρακτικές για την αντιμετώπισή της(Andrade et al., 2008). Σε περιπτώσεις σοβαρού παρατεταμένου ίκτερου έχει προταθεί η πλασμαφαίρεση(Tse et al., 2002). Στην περίπτωση εμφάνισης του σύνδρομου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας κρίνεται αναγκαίος ο μηχανικός αερισμός των ασθενών(Del Sorbo et al., 2017).

Μέσω της άμεσης αντιμικροβιακής θεραπείας σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να αποφευχθεί η περαιτέρω εξέλιξη της νόσου με σοβαρές συνέπειες για την πορεία της υγείας τους επιτυγχάνοντας χαμηλή θνησιμότητα η οποία κυμαίνεται σε ποσοστό μεταξύ του 5% έως 15%(Levett 2001).

Μέσω της χορήγησης των αντιβιοτικών κατά το αρχικό στάδιο της ασθένειας περίπου μεταξύ 2 έως 4 ημερών κατέγραψαν συντομότερη διάρκεια της ασθένειας. Σε σοβαρής μορφής λεπτοσπείρωση συνήθως χορηγείται ενδοφλέβια αντιβιοτικά όπως β-λακτάμες, η πενικιλίνη που αποτελεί το αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ευρέως με δόση 1,5 εκατομμύρια μονάδες IV κάθε 6 ώρες και η αμπικιλίνη με δόση 0,5-1 g IV κάθε 6 ώρες, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς όπως η κεφτριαξόνη με δόση 1 g IV κάθε 24 ώρες και η κεφοταξίμη με δόση 1 g IV κάθε 6 ώρες. Σε ηπιότερες περιπτώσεις γίνεται η χορήγηση από το στόμα δοξυκυκλίνης, αμοξικιλίνης, αμπικιλίνης ή ερυθρομυκίνης(Haake & Levvet 2015).

Ωστόσο, κατά την έναρξη της θεραπείας μέσω αντιβιοτικών ο ασθενής μπορεί να εμφανίσει την σπάνια αντίδραση Jarisch–Herxheimer (JHR) που αποτελεί εμπύρετη φλεγμονώδη αντίδραση που περιγράφηκε αρχικά στην θεραπεία της σύφιλης μέσω χορήγησης υδράργυρου. Η JHR εμφανίζεται συχνότερα στα πρώιμα στάδια της λεπτοσπείρωσης και αποτελεί σοβαρής μορφής αντίδραση που μπορεί να οδηγήσει έως το θάνατο. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης με απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων κυτοκινών ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο αντιγόνο. Οι παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση και στην σοβαρότητα εκδήλωσης της αντίδρασης δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί και χρήζουν περαιτέρω διερεύνηση από τους ερευνητές(Guerrier et al., 2017, Schuler et al., 2017).

8. ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ

Η πρόληψη της λεπτοσπείρωσης αποτελεί παράγοντα ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της επίπτωσης της νόσου. Σημαντική θεωρείται η ύπαρξη ενός συστηματικού προγράμματος πρόληψης και ελέγχου της λεπτοσπείρωσης, που να εφαρμόζεται στα πλαίσια της εθνικής πολιτικής για την υγεία σε κάθε χώρα. Βάση της γνώσης που έχει αποκτηθεί για τη νόσο και τον τρόπο μετάδοσης όσο και τον επιδημιολογικών δεδομένων μπορούν να καθοριστούν ορισμένα προληπτικά μέτρα για τον περιορισμό της λεπτοσπείρωσης.

Η μετάδοση της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ζώων, του ανθρώπου και του περιβάλλοντος. Κρίσιμη για τον περιορισμό μετάδοσης της νόσου θεωρείται ο έλεγχος των τροφικών και η εξάλειψη των συνθηκών που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους. Η επιτήρηση των ζώων τόσο στις μονάδες παραγωγής όσο και των κατοικίδιων που έρχονται σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την μετάδοση της λεπτοσπείρωσης, παρουσιάζοντας παράλληλα σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην οικονομία όσο και στην Δημόσια Υγεία(Reid et al., 2017, Dhewantara et al., 2019).

Σημαντικός θεωρείται ο εντοπισμός των πηγών μόλυνσης όπως στάσιμα νερά, λύματα, υπονόμοι, πηγάδια, σημεία συγκέντρωσης απορριμάτων (κάδοι, χωματερές) που θεωρούνται ότι παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα μόλυνσης από την αποβολή βιολογικών υγρών ή ζωικού ιστού που περιέχουν το παθογόνο βακτήριο.

Επομένως, η εφαρμογή καλύτερης πρακτικής για την πρόληψη και τον περιορισμό της λεπτοσπείρωσης αποτελεί η ενημέρωση και παροχή γνώσεων σε ομάδες ανθρώπων και κατηγορίες επαγγελματιών που εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό επικινδυνότητας. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή διάφορων προληπτικών, προστατευτικών μέτρων και πρακτικών ορθής υγιεινής(Nozmi et al., 2018).

Οι επαγγελματίες που εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό επικινδυνότητας θα πρέπει να τηρούν αυστηρά τα κατάλληλα μέτρα προστασίας και υγιεινής κατά την διάρκεια της εργασίας τους όπου αυτά περιλαμβάνουν τόσο τον προστατευτικό ρουχισμό (γάντια, ποδιά, μπότες, γυαλιά κ.α) όσο και την αποφυγή πρόσληψης τροφής ή ροφημάτων κατά

την διάρκεια της εργασίας χωρίς να τηρούνται οι κανόνες προσωπικής υγιεινής και απολύμανση μολυσμένων επιφανειών και χώρων όπως σφαγεία, αποθήκες(Hartskeerl et al., 2011).

Η χημειοπροφύλαξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις έκθεσης του ανθρώπου σε συνθήκες ή περιβάλλον που εμπεριέχει υψηλό κίνδυνο για προσβολή από λεπτοσπείρωση. Η χορήγηση από το στόμα δοξυκυκλίνης (200 mg) μία φορά την εβδομάδα μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου και έχει εφαρμοστεί σε ενδημικές χώρες κατά τη διάρκεια στρατιωτικών ασκήσεων, κατά την διάρκεια έντονων καιρικών φαινομένων (πλημμύρες) και κατά τη διάρκεια θαλάσσιων αθλητικών εκδηλώσεων(Sejvar 2003, Agampodi 2008, Agampodi et al., 2009, Shivaraj et al., 2012, Chusri et al., 2014, Schneider et al., 2017).

Η πρακτική του εμβολιασμού αποτελεί ακόμα ένα αποτελεσματικό μέτρο που αφορά την πρόληψη και τον έλεγχο της λεπτοσπείρωσης. Εφαρμόζεται για την επίτευξη ανοσοποίησης τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Τα είδη των εμβολίων που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν εμβόλια που περιέχουν ζώντα εξασθενημένα στελέχη, εμβόλια που περιέχουν νεκρά ή αδρανοποιημένα στελέχη, εμβόλια βασισμένα σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ανασυνδυασμένα εμβόλια και DNA εμβόλια(Adler & Moctezuma 2010, Ellis 2015, Bashiru & Bahaman 2018).

Ο εμβολιασμός για την απόκτηση ανοσίας παρουσιάζει ευρύτατη εφαρμογή στα ζώα όπως βοοειδή, χοίρους και σκύλους. Τα ζωικά εμβόλια που εφαρμόζονται για την απόκτηση ανοσίας είναι κατά κύριο λόγο πολυσθενή αλλά και μονοσθενή που προέρχονται από κοινό ορότυπο για το είδος που συναντάται σε μία περιοχή και μπορούν να περιέχουν έναν έως πέντε ή περισσότερους ορότυπους. Στα βοοειδή τα εμβόλια περιέχουν αδρανοποιημένα αντιγόνα του ορότυπου Hardjo και κατά περίπτωση τον ορότυπο Pomona. Ο εμβολιασμός σε σκύλους χορηγείται το συντομότερο δυνατό μετά τη μείωση των μητρικών αντισωμάτων, περίπου σε 10 εβδομάδες. Τα εμβόλια που προορίζονται για τον εμβολιασμό των σκύλων περιέχουν αδρανοποιημένα αντιγόνα των ορότυπων Canicola, icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa και Pomona που κυκλοφορεί στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη κυκλοφορούν πολλά με τους ορότυπους Canicola, Icterohaemorrhagiae και ένα με τους ορότυπους Canicola, Icterohaemorrhagiae και Grippytyphosa. Ο εμβολιασμός που εφαρμόζεται στα ζώα παρέχει βραχυπρόθεσμη

ανοσία, προλαμβάνουν την κλινική εκδήλωση μόνο από έναν συγκεκριμένο ορότυπο όπου συχνά δεν εμποδίζουν την μόλυνση και την απέκκριση από τον οργανισμό(Klaasen et al., 2013 , Ellis 2015, Bashiru 2018).

Στους ανθρώπους εφαρμόστηκαν ευρέως σε ενδημικές χώρες όπως στην Κούβα, Ιαπωνία, Βιετνάμ και Κίνα ύστερα από πλημμύρες αλλά και στη Γαλλία στα πλαίσια έρευνας εμβολίου σε υγιείς εθελοντές. Τα εμβόλια που εφαρμόζονται στους ανθρώπους περιέχουν μονοσθενή ή πολυσθενή αδρανοποιημένο ολόκληρο κύτταρο λεπτόσπειρας. Τα αδρανοποιημένα εμβόλια λεπτοσπείρωσης προσδίδουν προστασία κυρίως μέσω της ανοσίας που προκαλείται από εκτεθειμένο στην επιφάνεια λιποπολυσακχαρίτη (LPS), όπου συνήθως διαρκεί για περιορισμένο χρονικό διάστημα περίπου 1 έτος και αφορούν συγκεκριμένους ορότυπους, ωστόσο έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζεται πιθανή η απόκτηση διασταυρούμενης προστασίας σε συγκεκριμένες οροομάδες ή ορότυπους. (Martinez et al., 2004, Laurichesse et al., 2007, Adler & Moctezuma 2010, Verma et al., 2013, Adler 2015, Xu 2018).

Αντίθετα, η κατηγορία των εμβολίων με ζώντα εξασθενημένα στελέχη έχει την δυνατότητα να ενεργοποιήσει τόσο τις κυτταρικές όσο και τις χημικές ανοσολογικές αντιδράσεις και να συμβάλλει στην ανάπτυξη μακροχρόνιας ανοσίας. Ωστόσο, η χρήση των εμβολίων με ζώντα εξασθενημένα στελέχη μπορεί να εμφανίσουν ορισμένους κινδύνους λόγω ότι παρουσιάζουν την ικανότητα δυνητικά να επιστρέψουν στη λοιμογόνο δράση, να συνεχιστεί η απόρριψη λεπτόσπειρων στα ούρα, να προκαλέσουν μόλυνση ή τυχαία μόλυνση λόγω χειρισμού ζώντων στελεχών(Adler 2015, Bashiru & Bahaman 2018).

Η δημιουργία ενός καθολικού αδρανοποιημένου εμβολίου που θα περιλαμβάνει όλο το φάσμα των ορότυπων αποτελεί δύσκολο εγχείρημα εξαιτίας της εμφάνισης μεγάλης ποικιλομορφίας από στελέχη λεπτόσπειρας που συναντάμε σε διάφορες χώρες και περιοχές. Για την παραγωγή ενός ιδανικού εμβολίου για την ανοσία κατά της λεπτοσπείρωσης θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν ορισμένοι παράμετροι όπως η γνώση των ορότυπων που κυκλοφορούν, η εξασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του εμβολίου και το κόστος παραγωγής(Verma et al., 2013, Adler 2015).

Ωστόσο, η γενετική ανοσοσποίηση μέσω εμβολίων DNA λεπτόσπειρας φαντάζει πολλά υποσχόμενη τακτική για τον έλεγχο της λεπτοσπείρωσης τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα παραδοσιακά εμβόλια όπως αυξημένη ασφάλεια, παρατεταμένη έκφραση αντιγόνου και ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης, χαμηλό κόστος παραγωγής, διέγερση τόσο κυτταρικής όσο και χημικής ανοσίας και δυνατότητα κατασκευής ενός φορέα που κωδικοποιεί αρκετά αντιγόνα με ένα μόνο εμβόλιο. Επομένως, βάση των πλεονεκτημάτων που προσδίδει η ανοσοποίηση μέσω DNA θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην εφαρμογή και αποτελεσματικότητα των εμβολίων DNA όσον αφορά την λεπτοσπείρωση στον άνθρωπο και στα ζώα (Xu et al., 2014, Silveira et al., 2017, Garba 2018).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας που διενεργήθηκε αποτελεί η οροεπιδημιολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα στο Δήμο Βέροιας.

Η έρευνα επικεντρώθηκε σε άτομα που το αντικείμενο της εργασίας τους, τους φέρνει αντιμέτωπους σε συνθήκες που ευνοούν την άμεση ή έμμεση έκθεση με το παθογόνο βακτήριο. Παράλληλα, ο Δήμος αποτελεί πυρήνα της αγροτικής και κτηνοτροφικής παραγωγής που συνδέονται συχνά με την επιδημιολογία της λεπτοσπείρωσης.

Καθώς στην Ελλάδα παρουσιάζεται έλλειψη σε σχετικές έρευνες για την λεπτοσπείρωση με περιορισμένο αριθμό δημοσιευμένων ερευνών, όπου παράλληλα εμφανίζονται δυσκολίες στη μελέτη της παθογένειας του μικροοργανισμού και απουσιάζοντας η συστηματική μελέτη ορότυπων του μικροοργανισμού.

Εν κατακλείδι, η παρούσα έρευνα έχει σκοπό να συμβάλει στην καταγραφή και ανάδειξη της παρουσίας της ζωνόσου τόσο μέσω της ανίχνευσης των ειδικών

αντισωμάτων IgG έναντι της λεπτόσπειρας στον ορό του αίματος όσο και μέσω της καταγραφής επιδημιολογικών στοιχείων που μπορούν να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση της ζωνόσπου.

10. ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την οροεπιδημιολογική διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα σε Δήμους της Κεντρικής Μακεδονίας μέσω της ορολογικής μεθόδου ELISA επιλέχθηκε ο Δήμος Βέροιας και η παρούσα διπλωματική εργασία εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας του ΜΠΣ.

Με βάση τα στοιχεία του Δήμου Βέροιας, του γραφείου προσωπικού αλλά και του προϊστάμενου καθαριότητας, στο Δήμο Βέροιας απασχολείται ο αριθμός των 77 εργαζόμενων στην συγκομιδή απορριμμάτων ενώ ως διοικητικοί υπάλληλοι απασχολείται ο αριθμός των 50 εργαζόμενων.

Για την διεξαγωγή της έρευνας κλήθηκαν όλοι οι υπάλληλοι από τις παραπάνω υπηρεσίες και προσήλθαν 80 άτομα από το σύνολο των εργαζόμενων του Δήμου Βέροιας ποσοστό απόκρισης 63%, και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα (ομάδα μελέτης) συμπεριέλαβε 50 άτομα, από τους εργαζόμενους στην συγκομιδή απορριμμάτων που είχαν αυξημένο επαγγελματικό κίνδυνο έκθεσης στην λεπτόσπειρα, ενώ η δεύτερη ομάδα 30 ατόμων (ομάδα ελέγχου) συμπεριέλαβε διοικητικούς υπάλληλους.

Στα πλαίσια της διερεύνησης για την λεπτοσπείρωση διενεργήθηκαν φλεβοπαρακεντήσεις στο σύνολο 80 ατόμων και η παράλληλη συμπλήρωση ερωτηματολογίου. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, σε χρόνο λιγότερο από δύο ώρες, στις 2500rpm για 10 λεπτά (απαραίτητη είναι η αναμονή μισής ώρας με σκοπό την ολοκλήρωση της διαδικασίας πήξης προς αποφυγή του σχηματισμού ινικής μεμβράνης), όπου στην συνέχεια προχωρήσαμε στον διαχωρισμό του ορού των δειγμάτων σε κρυοφιαλίδια και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη στους -20°C .

Η δειγματοληψία, αποστολή των δειγμάτων στο Εργαστήριο γινόταν μέσω courier, μέσα σε ισόθερμα κιβώτια με παγοκύστες. Μετά από τον έλεγχο, ακεραιότητας και διατήρησης της σωστής ψύξης κατά την αποστολή, τοποθετούνταν στους -20°C . Κατόπιν, προκειμένου να προχωρήσουμε στην ανάλυση των δειγμάτων η απόψυξη πραγματοποιούνταν ήπια χωρίς χρήση θερμικών μέσων. Μετά την απόψυξη και πριν την επεξεργασία γινόταν ανάδευση των δειγμάτων μέσω vortex (*ακολουθήσαμε πρωτόκολλο βασισμένο σε βιβλιογραφία το οποίο σχεδιάστηκε στην έναρξη της μελέτης*). (Tuck et al., 2009, Henry 1979, Thavasu et al., 1992)

Στο ερωτηματολόγιο αποτυπώθηκαν 12 ερωτήσεις που περιλαμβάνουν δημογραφικά στοιχεία: το επίπεδο εκπαίδευσης, την εργασιακή θέση, τις γνώσεις και πρακτικές για την λεπτοσπείρωση, το επίπεδο γνώσης της νόσου, τα μέτρα προστασίας που λαμβάνονται στη διάρκεια της εργασίας, τις συνήθειες κατά την διάρκεια της εργασίας, την ύπαρξη κατοικίδιου ζώου στο σπίτι, αν ναι τον προσδιορισμό του είδους του ζώου, τον τόπο της εργασίας, την ενασχόληση με αγροτικές εργασίες και αν ναι τον προσδιορισμό των εργασιών. Τα στατιστικά δεδομένα που συγκεντρώθηκαν επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS. Η δοκιμασία Chi-Square Test χρησιμοποιήθηκε για την μονοπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων. Σύμφωνα με την προστασία των προσωπικών δεδομένων τηρήθηκε η ανωνυμία των ατόμων που συμμετείχαν στην διενεργούμενη έρευνα και επιδόθηκαν προσωπικά τα αποτελέσματα από τον γιατρό Εργασίας.

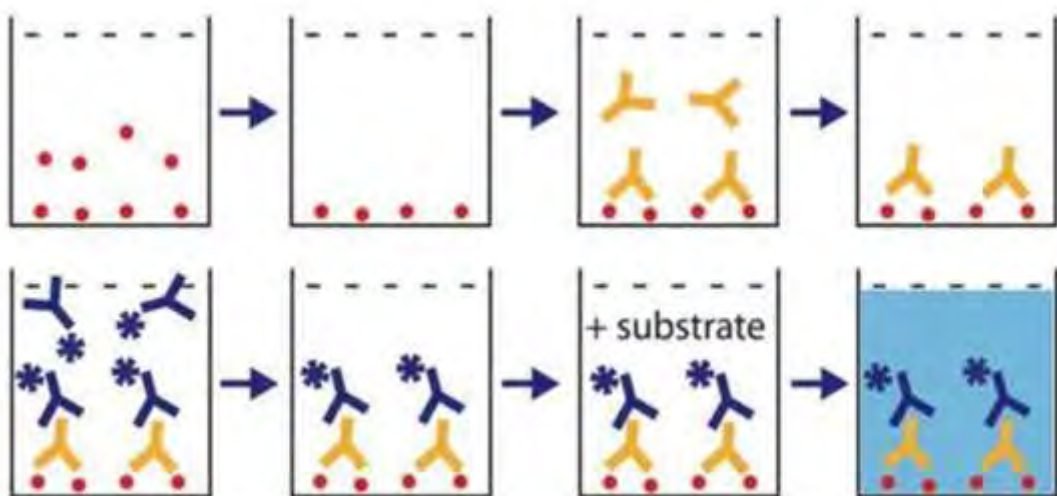
ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

Για την διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης στους εργαζόμενους στην καθαριότητα στο Δήμο Βέροιας επιλέχθηκε η ανοσοενζυμική δοκιμασία SERION ELISA *classic* Leptospira IgG, της εταιρίας BIOSNA για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι της λεπτόσπειρας στον ορό του αίματος. Η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) αποτελεί εργαστηριακή μέθοδος, η οποία είναι ειδικά προσαρμοσμένη για τον προσδιορισμό και ανίχνευση αντισωμάτων για νόσημα το οποίο έχει παρέλθει ή είναι ενεργό.

Αρχή της δοκιμασίας

Η δοκιμασία SERION ELISA *classic* Leptospira IgG αποτελεί μία ποιοτική και ποσοτική ανοσολογική μέθοδος για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG στον ορό ή το πλάσμα, έναντι στη Leptospira. Η μέθοδος χρησιμεύει για την υποστήριξη της διάγνωσης της λεπτοσπείρωσης, για την επιβεβαίωση της επαφής με το παθογόνο, καθώς και για τον προσδιορισμό της ανοσολογικής κατάστασης σε επιδημιολογικές μελέτες.

Η αντίδραση βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση των αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Οι ταινίες της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* Leptospira IgG (πλάκα μικροτιτλοποίησης) είναι επικαλυμμένες με ειδικά αντιγόνα Leptospira. Κατόπιν, προστίθονται τα δείγματα προς ανάλυση και οποιαδήποτε αντισώματα ειδικά με τα συγκεκριμένα αντιγόνα δεσμεύονται στη στερεά φάση με τα σταθερά αντιγόνα. Μετά την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου υλικού με πλύση, τα αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση αφήνονται να αντιδράσουν με το ανοσοσύμπλοκο. Στην συνέχεια με πλύση απομακρύνεται ότι δεν δεσμεύτηκε και προστίθεται το άχρωμο υπόστρωμα p-νιτροφαινολοφωσφορικό με το οποίο το συζευγμένο ένζυμο αντιδρά, μεταβάλλοντας το χρώμα του υποστρώματος της αντίδρασης, όπου μετατρέπεται στο έγχρωμο προϊόν p-νιτροφαινόλη (Εικόνα 10). Η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι ανάλογη των επιπέδων των ειδικών αντισωμάτων και μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά μέσω φασματοφωτόμετρου στα 405 nm



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* Leptospira IgG

Υλικά δοκιμασίας

Τα υλικά της δοκιμασίας SERION ELISA *classic* για αντισώματα λεπτοσπείρωσης IgG που εμπεριέχονταν στο kit και χρησιμοποιήσαμε είναι τα εξής (Πίνακας 2):

1. Δοκιμαστικές ταινίες μικροτιτλοδότησης (πλάκα μικροτιτλοποίησης), καθέ μία με 8 μονές κοιλότητες (φρεάτια) επικαλυμμένα με αντιγόνο (συνολικά 96)
2. Τυποποιημένος ορός
3. Ορός αρνητικού ελέγχου
4. Συζευγμένα ανθρώπινα αντισώματα-IgG
5. Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης
6. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης
7. Διάλυμα παύσης
8. Υπόστρωμα
9. Πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου με τυποποιημένη καμπύλη και πίνακα τιμών

Πίνακας 2. Υλικά που εμπεριέχονται στο kit SIRION ELISA *classic* Leptospira IgG

| Test components | amount / volume |
|--|-----------------|
| 1) Break apart microtiter test strips each with 8 antigen coated single wells (altogether 96), 1 frame the coating material is inactivated | 12 |
| 2) Standard serum (ready-to-use) Human serum in phosphate buffer with protein; negative for anti-HIV-Ab, anti-HBs-Ag (Hepatitis B-Virus-surface antigen) and anti-HCV-Ab; preservative: < 0.1 % sodium azide coloring: Amaranth O | 2 x 2 ml |
| 3) Negative control serum (ready-to-use) Human serum in phosphate buffer with protein; negative for anti-HIV, anti-HBs (Hepatitis B Virus-surface antigen) and anti-HCV; preservative: < 0.1 % sodium azide coloring: Lissamin green V | 2 ml |
| 4) Anti-human-IgG -conjugate (ready-to-use) Anti-human-IgG from goat (polyclonal), conjugated to alkaline phosphatase, stabilized with protein stabilization solution preservative: 0.01 % methylisothiazolone, 0.01 % bromnitrodioxane | 13 ml |

| | |
|--|-----------|
| 5) Washing solution concentrate (sufficient for 1 litre) Sodium chloride solution with Tween 20, 30 mM Tris preservative: < 0.1 % sodium azide | 33.3 ml |
| 6) Dilution buffer Phosphate buffer with protein and Tween 20; preservative: < 0.1 % sodium azide 0.01 g/l Bromphenol blue sodium salt | 2 x 50 ml |
| 7) Stopping solution 1.2 N sodium hydroxide | 15 ml |
| 8) Substrate (ready-to-use) Para-nitrophenylphosphate, solvent free buffer preservative: < 0.1 % sodium azide (Substrate in unopened bottle may have a slightly yellow color. This does not reduce the quality of the product!) | 13 ml |
| 9) Quality control certificate with standard curve and evaluation table (quantification of antibodies in IU/ml or U/ml) | 1 |

Επίσης υλικά όπου δεν εμπεριέχονται στο κιτ αλλά και εξοπλισμός που θεωρούνται απαραίτητα για την δοκιμασία είναι τα εξής:

- 1) Ο κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός
- 2) Φασματοφωτόμετρο για πλάκες μικροτιτλοποίησης με φίλτρο, μήκους κύματος 405 nm, όπου συνιστάται συνήθως μήκος κύματος αναφοράς από 620 nm έως 690 nm (π.χ. 650 nm)
- 3) Απαραίτητος θεωρείται ο επωαστικός κλίβανος 37°C
- 4) Ο υγρός θάλαμος
- 5) Το απεσταγμένο ύδωρ

Στάδια εργαστηριακής διερεύνησης

Τα στάδια εργαστηριακής διερεύνησης, που εφαρμόζονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της εταιρείας, αποτελούνται από τα εξής:

1. Συγκεντρώνουμε την μικροπλάκα με τον απαραίτητο αριθμό κοιλοτύπων για τον αριθμό των δειγμάτων μας και συντάσσουμε το φύλλο πρωτοκόλλου.

2. Με την χρήση πιπέτας γίνεται η διανομή από 100μl του ορού του δείγματος ή τα controls που είναι έτοιμα προς χρήση στις κατάλληλες κοιλότητες της μικροπλάκας, αφήνοντας μία στήλη κενή για την προσθήκη του τυφλού(blank), π.χ.

| IgG quantitative | |
|------------------|------------------|
| well A1 | substrate blank |
| well B1 | negative control |
| well C1 | standard serum |
| well D1 | standard serum |
| well E1 | sample 1.... |

3. Κατόπιν επωάζουμε το δείγμα για 60 λεπτά στους 37°C

4. Μετά το στάδιο της επώασης ακολουθεί έκπλυση των κοιλοτήτων με το διάλυμα έκπλυσης:

- Προχωράμε σε αναρρόφηση ή άδειασμα του διαλύματος επώασης από τις κοιλότητες
- Η κάθε κοιλότητα γεμίζεται με 300 μl διαλύματος έκπλυσης
- Προχωράμε σε αναρρόφηση ή άδειασμα του διαλύματος έκπλυσης
- Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται για 3 φορές, στο σύνολο 4 φορές
- Τέλος η πλάκα στεγνώνεται πάνω σε χαρτί

5. Προσθέτουμε την σύζευξη.

Με την χρήση πιπέτας προσθέτουμε 100 μl σύζευξης IgG (έτοιμο προς χρήση) στη κατάλληλη κοιλότητα

6. Κατόπιν επωάζουμε την σύζευξη για 30 λεπτά στους 37°C

7. Μετά το στάδιο της επώασης ακολουθεί έκπλυση των κοιλοτήτων με το διάλυμα έκπλυσης, ακολουθώντας την προηγούμενη διαδικασία

8. Προσθήκη του υποστρώματος

Με την χρήση πιπέτας προσθέτουμε 100 μl διαλύματος υποστρώματος (έτοιμου προς χρήση) σε κάθε κοιλότητα ακόμα και στην κοιλότητα για το κενό υπόστρωμα.

9. Κατόπιν επωάζουμε το υπόστρωμα για 30 λεπτά στους 37°C

10. Τερματισμός της αντίδρασης

Με την χρήση πιπέτας προσθέτουμε 100 μl διαλύματος παύσης σε κάθε κοιλότητα, κατόπιν ανακινούμε με προσοχή την μικροπλάκα για να επιτευχθεί η μείξη

11. Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας(OD).

Μέτρηση της OD σε φωτοφωτόμετρο εντός των 60 λεπτών με μήκος κύματος 405 nm έναντι της τιμής του κενού υποστρώματος, με μήκος κύματος αναφοράς μεταξύ 620 nm και 690 nm (π.χ. 650 nm).

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται χειροκίνητα, ωστόσο τα δείγματά μας μετρήθηκαν στον αυτόματο αναλυτή ELISA MAGO plus της εταιρίας DELTA BIOLOGICALS όπου ακολουθεί της βασικές αρχές και στάδια της χειροκίνητης δοκιμασίας.

Ο υπολογισμός της ποσοτικοποίησης των αντισωμάτων υπολογίζεται τόσο μέσω πρότυπης καμπύλης και μαθηματικού τύπου που δίδεται από τον κατασκευαστή (χειροκίνητη μέθοδος), όσο και μέσω ειδικού αυτοματοποιημένου προγράμματος για την λεπτοσπείρωση στην περίπτωση της χρήσης του αυτόματου αναλυτή. Η έκφραση του αποτελέσματος είναι σε U/ml,

- Αρνητικό αποτέλεσμα: Κάτω από 10 U/ml.
- Θετικό αποτέλεσμα: Πάνω από 15 U/ml.
- Γκρίζα ζώνη: 10 – 15 U/ml.

Ευαισθησία & Εξειδίκευση SERION ELISA *classic* Leptospira IgG > 99 % > 99 %.

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με βάση τις πληροφορίες που συγκεντρώθηκαν από το σύνολο των 80 εργαζόμενων που έλαβαν μέρος 59 ήταν άντρες με ποσοστό 73,8% και 21 ήταν γυναίκες με ποσοστό

26,3% (Πίνακας 3). Η μέση τιμή της ηλικίας των εργαζόμενων που έλαβαν μέρος ήταν 47,7 (SD 9) χρονών με την μικρότερη ηλικία που καταγράφηκε να είναι 19 χρονών και την μεγαλύτερη ηλικία 63 χρονών. Μεταξύ των εργαζόμενων 67 άτομα ήταν έγγαμοι που αφορούσε το μεγαλύτερο ποσοστό 83,75%, 9 ήταν άγαμοι με ποσοστό 11,25%, 4 ήταν διαζευμένοι, ποσοστό 5%. Το επίπεδο εκπαίδευσης που καταγράφηκε μεταξύ των συμμετεχόντων 4 άτομα ήταν απόφοιτοι δημοτικού σχολίου, ποσοστό 17,5%, 6 άτομα ήταν απόφοιτοι γυμνασίου, ποσοστό 7,5%, 48 άτομα ήταν απόφοιτοι λυκείου, ποσοστό 60%, 10 άτομα ήταν κάτοχοι πτυχίου ΑΕΙ/ΤΕΙ, ποσοστό 12,5%, 2 άτομα ήταν κάτοχοι μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών, ποσοστό 2,5%, ενώ δεν καταγράφηκε κάτοχος διδακτορικού τίτλου σπουδών. Από τα 80 άτομα που έλαβαν μέρος στην έρευνα, 50 άτομα η εργασιακή τους θέση ήταν στη συγκομιδή απορριμάτων, ποσοστό 62,5%, ενώ 30 άτομα η εργασιακή τους θέση ήταν ως διοικητικοί υπάλληλοι, ποσοστό 37,5%. Στο σύνολο των εργαζόμενων καταγράφηκε μέση τιμή τα 14,3 (SD 9,4) χρόνια εργασίας. Σχετικά με τον τόπο κατοικίας, 55 (68,75%) άτομα διαμένουν σε πόλη, 22 (27,5%) άτομα διαμένουν σε χωριό και 3 (3,75%) άτομα διαμένουν σε κωμόπολη.

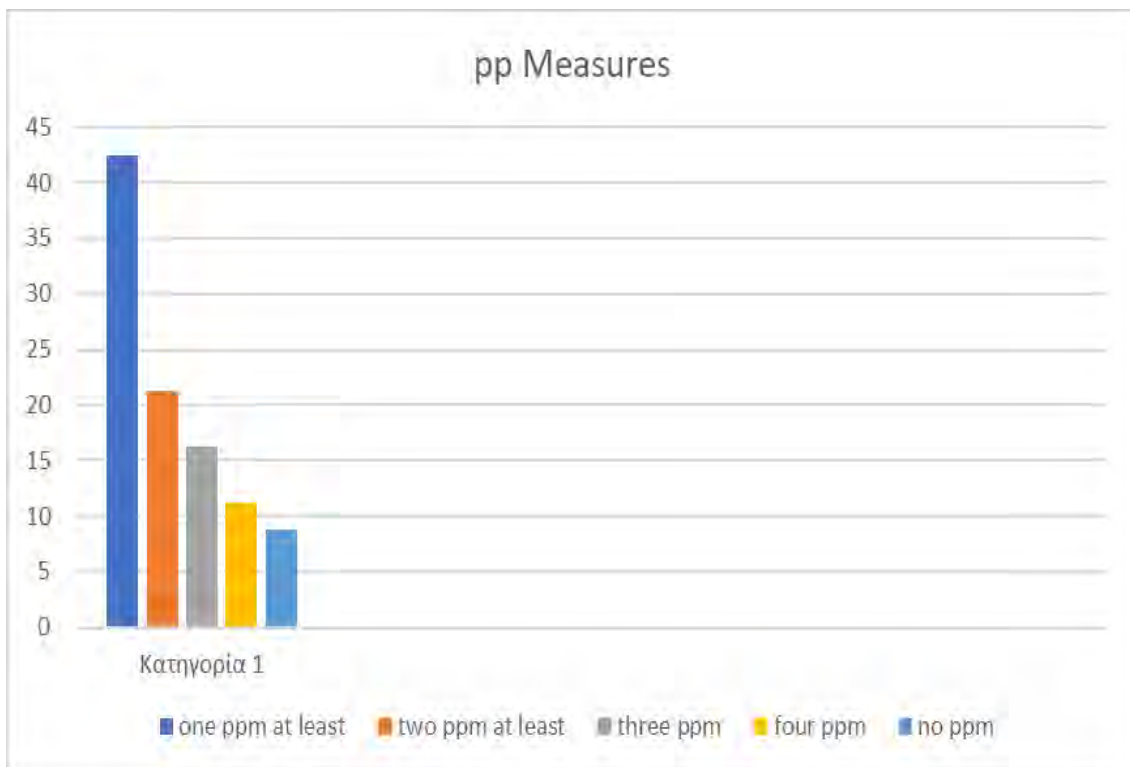
Πίνακας 3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των εργαζόμενων στον Δήμο Βέροιας (n = 80).

| Χαρακτηριστικό | Συχνότητα (%) | Μέση τιμή (SD) |
|-------------------------------|---------------|----------------|
| Φύλο | | |
| Άνδρας | 59 (73,8%) | |
| Γυναίκα | 21 (26,3%) | |
| Ηλικία | | 47,7 (9) |
| Οικογενειακή κατάσταση | | |
| Έγγαμος/η | 67 (83,75) | |
| Άγαμος/η | 9 (11,25%) | |
| Διαζευγμένος/η | 4 (5%) | |
| Επίπεδο εκπαίδευσης | | |
| Δημοτικό | 14 (17,5%) | |
| Γυμνάσιο | 6 (7,5%) | |
| Λύκειο | 48 (60%) | |

| | | |
|------------------------|-------------|------------|
| ΑΕΙ/ΤΕΙ | 10 (12,5%) | |
| Μεταπτυχιακό | 2 (2,5%) | |
| Διδακτορικό | 0 (0%) | |
| Εργασιακή θέση | | |
| Συγκομιδή απορριμμάτων | 50 (62,5%) | |
| Διοικητικός υπάλληλος | 30 (37,5%) | |
| Χρόνια εργασίας | | 14,3 (9,4) |
| Τόπος κατοικίας | | |
| Πόλη | 55 (68,75%) | |
| Κωμόπολη | 3 (3,75) | |
| Χωριό | 22 (27,5%) | |

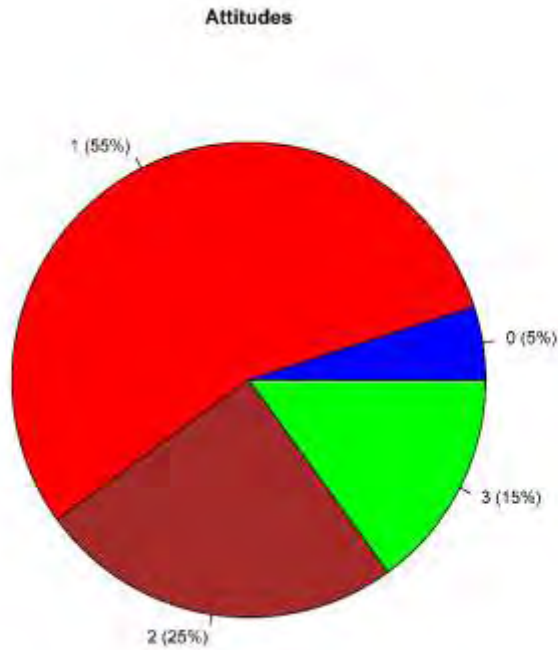
Όσον αφορά τη γνώση για την νόσο της λεπτοσπείρωσης, το ποσοστό 52,5% των εργαζόμενων απάντησαν πως δεν είχαν γνώση για την νόσο της λεπτοσπείρωσης, ενώ το 47,5% απάντησαν πως γνώριζαν για την νόσο, εκ των οποίων σε ποσοστό 92,1% των ερωτηθέντων που απάντησαν θετικά είχαν μέτρια γνώση ενώ το 7,9% απάντησαν ότι γνώριζαν πολύ καλά την νόσο.

Στην ερώτηση που αφορά τα μέτρα προστασίας κατά την διάρκεια της εργασίας το 42.5% αποτελεί το ποσοστό των εργατών που χρησιμοποιεί τουλάχιστον ένα μέτρο προστασίας, το 21.25% δύο μέτρα, το 16.25% τρία μέτρα, το 11.25% τέσσερα μέτρα ενώ το 8.75% δεν χρησιμοποιεί κανένα μέτρο (Γράφημα 1). Τα μέτρα προστασίας, όπως μάνιο στο τέλος της εργασίας και τα γάντια συγκέντρωσαν τα μεγαλύτερα ποσοστά 61,25% και 60% αντίστοιχα ενώ καπέλο/σκούφο ή στολή χρησιμοποιούν το 36,25% και 20% αντίστοιχα.



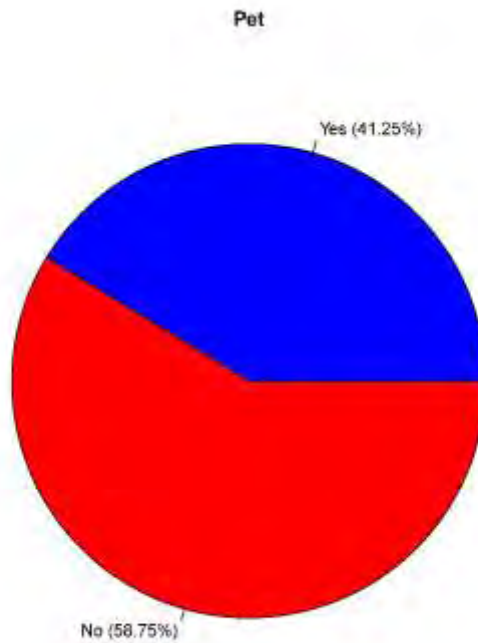
Γράφημα 1. Κατανομή των μέτρων προστασίας κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας το ποσοστό 42,5% των εργαζόμενων απάντησαν ότι συνηθίζουν να τρώνε ελαφρά, το 41,25% των εργαζόμενων απάντησαν ότι καπνίζουν, το 66,25% των εργαζόμενων απάντησαν ότι πίνουν διάφορα ροφήματα και το 5% των εργαζόμενων απάντησαν ότι δεν έχουν κάποια από της συγκεκριμένες συνήθειες, κατά την διάρκεια της εργασίας. Συνολικά το 55% ακολουθούν μία από τις παραπάνω συνήθειες, το 25% δύο συνήθειες, το 15% τρεις συνήθειες και το 5% απάντησαν ότι δεν ακολουθούσαν καμία συνήθεια κατά την διάρκεια της εργασίας τους από αυτές που ερωτήθηκαν (Γράφημα 2).



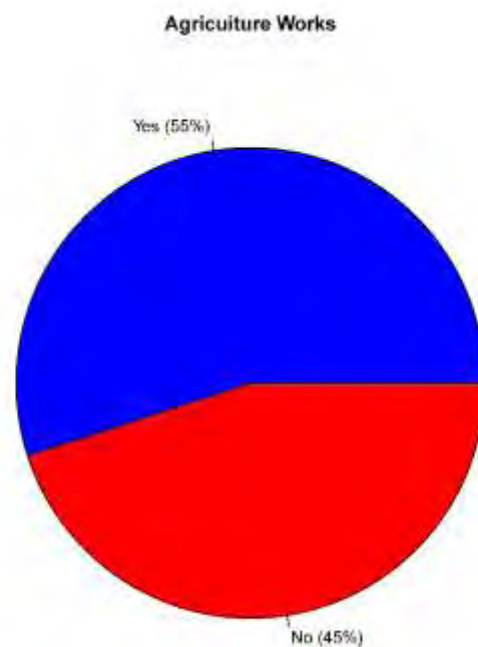
Γράφημα 2. Κατανομή του αριθμού των συνηθειών που ακολουθούν κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Στην ερώτηση για την ύπαρξη κατοικίδιου στο σπίτι, το 41.25% απάντησαν ναί, ενώ το 58.75% όχι (Γράφημα 3). Μεταξύ των ερωτηθέντων που απάντησαν θετικά το 57,57% έχουν τουλάχιστον σκύλο, το 72,72% έχουν τουλάχιστον γάτα, το 6% έχουν τουλάχιστον άλογο, το 6% έχουν τουλάχιστον γουρούνι, το 3% έχουν τουλάχιστον πρόβατο ή αίγα και το 18,18% απάντησαν τουλάχιστον άλλο.



Γράφημα 3. Απεικόνιση της ύπαρξης κατοικίδιου ζώου μεταξύ των εργαζόμενων.

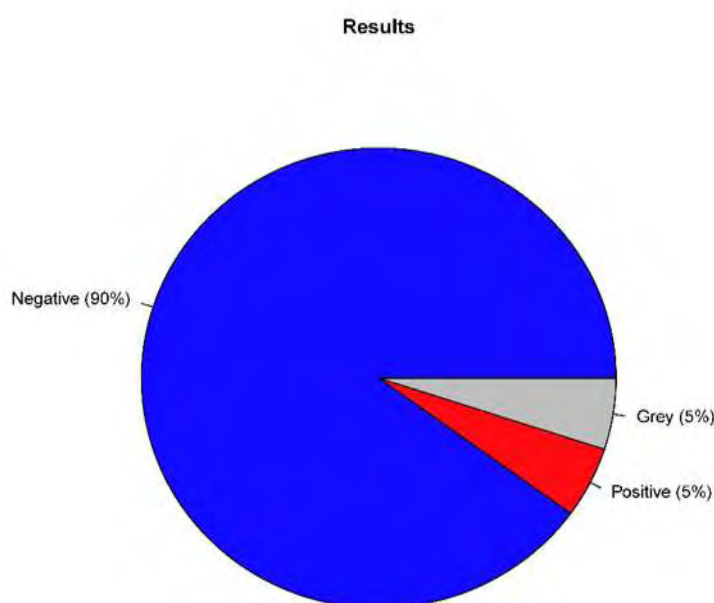
Όσον αφορά την ενασχόληση των ερωτηθέντων με αγροτικές δουλειές, 44 (55%) άτομα απάντησαν θετικά, ενώ 36 (45%) άτομα δεν έχουν κάποια ενασχόληση (Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Κατανομή της ενασχόλησης των ερωτηθέντων με αγροτικές δουλειές.

Μεταξύ των ατόμων που απάντησαν θετικά το 50% ασχολείται τουλάχιστον με το κούρεμα γκαζόν, το 47,72% ασχολείται τουλάχιστον με το κλάδεμα δέντρων, το 40,9% ασχολείται τουλάχιστον με την δενδροκαλλιέργεια, το 29,54% ασχολείται τουλάχιστον με την συγκομιδή οργανικής ύλης (κοπριά), το 15,9% τουλάχιστον με τον τρύγο και το 34,1% ασχολείται τουλάχιστον με κάτι άλλο από τα προαναφερθέντα.

Σύμφωνα με την εφαρμογή της μεθόδου ELISA στον ορό του αίματος σε δείγματα 80 ατόμων ανιχνεύθηκε η παρουσία αντισωμάτων σε 4 (5%) δείγματα, ενώ 4 (5%) δείγματα βρέθηκαν στην 'γκρίζα ζώνη' που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης(Γράφημα 5).



Γράφημα 5 . Γραφική απεικόνιση της κατανομής των αποτελεσμάτων.

Σχετικά με τον επιπολασμό της λεπτοσπείρωσης κατά φύλλο 3 άνδρες ή ποσοστό 5,1% βρέθηκε θετικό στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ενώ 56 άνδρες ή ποσοστό 94,9% βρέθηκε αρνητικό στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων. Όσον αφορά τις γυναίκες 1 άτομο ή ποσοστό 4,8% βρέθηκε θετικό στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ενώ 19 γυναίκες ή ποσοστό 95,2% βρέθηκε αρνητικό στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων. Ο επιπολασμός της λεπτοσπείρωσης

που καταγράφηκε κατά φύλλο δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,95$) (Chi-Square).

Σχετικά με τον εντοπισμό των οροθετικών δειγμάτων με βάση την εργασιακή θέση, 4 άτομα ή ποσοστό 8% βρέθηκε θετικό στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων από το σύνολο των 50 εργαζόμενων στην συγκομιδή απορριμμάτων, ενώ δεν εντοπίστηκε οροθετικό δείγμα μεταξύ των διοικητικών υπαλλήλων. Όσον αφορά τα άτομα που βρέθηκαν αρνητικά στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων 46 άτομα από τα 50 ή ποσοστό 90% περιλαμβάνονται στους εργαζόμενους στην συγκομιδή απορριμμάτων, ενώ το σύνολο των 30 ατόμων ή ποσοστό 100% περιλαμβάνονται στους διοικητικούς υπαλλήλους. Ο επιπολασμός της λεπτοσπείρωσης που καταγράφηκε με βάση την εργασιακή θέση δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,11$) (Chi-Square).

Αναφορικά με τον μέσο όρο ηλικίας των ατόμων που βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ήταν 54 με σταθερή απόκλιση 5,35, ενώ των ατόμων που βρέθηκαν αρνητικά στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ήταν 47,38 με σταθερή απόκλιση 9,06. Ο επιπολασμός της λεπτοσπείρωσης που καταγράφηκε με βάση τον μέσο όρο ηλικίας δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,15$) (Chi-Square).

Ο χρόνος εργασίας στους εργαζόμενους που βρέθηκαν θετικοί στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ήταν 12,50 έτη με σταθερή απόκλιση 12,34, ενώ στους εργαζόμενους που βρέθηκαν αρνητικοί στην ανίχνευση anti-Leptospira IgG αντισωμάτων ήταν 14,47 έτη με σταθερή απόκλιση 9,28. Ο επιπολασμός της λεπτοσπείρωσης που καταγράφηκε με βάση τον χρόνο εργασίας στους εργαζόμενους δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0,68$) (Chi-Square).

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά και επιπολασμός Anti-Leptospira IgG στο υπό μελέτη δείγμα

| Χαρακτηριστικό | Anti-Leptospira IgG (+) | Anti-Leptospira IgG (-) | P value |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| Φύλο | n (%) | n (%) | 0,95 |
| Ανδρες | 3/59 (5,1%) | 56/59 (94,9%) | |
| Γυναίκες | 1/21 (4,8%) | 19/21 (95,2%) | |
| Εργασιακή θέση | | | 0,11 |
| Συγκομιδή απορριμμάτων | 4/46 (8,0%) | 46/50 (90%) | |
| Διοικητικός υπάλληλος | 0/30 (0%) | 30/30 (100%) | |
| Ηλικία (χρόνια) | 54 (SD 5,35) | 47,38 (SD 9,06) | 0,15 |
| Χρόνια εργασίας | 12,50 (SD 12,34) | 14,47 (SD 9,28) | 0,68 |

12. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η λεπτοσπείρωση αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες ζωνόσους παγκοσμίως που εξαρτάται τόσο από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές και κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες, επηρεάζοντας ένα μεγάλο φάσμα κοινωνικών και επαγγελματικών ομάδων. Η νόσος εμφανίζεται τόσο σε τροπικές-υποτροπικές περιοχές κατά τη διάρκεια όλου του έτους, αλλά επίσης και σε εύκρατες ζώνες κατά τη διάρκεια ζεστών και υγρών περιόδων. Κρούσματα που οφείλονται στην λεπτοσπείρωση καταγράφονται τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες, όπου συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της υποδιάγνωσης της νόσου.

Στην Ελλάδα η λεπτοσπείρωση υποδιαγιγνώσκεται καθώς η νόσος καταγράφεται κυρίως σε μεμονομένα σοβαρά κρούσματα που χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης χωρίς την εμφάνιση έξαρσης επιδημίας. Παράλληλα, υπάρχει περιορισμένος αριθμός

ερευνών και επιδημιολογικών δεδομένων που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση και μελέτη της ζωνώσου.

Το γεγονός ότι η νόσος υποδιαγιγνώσκεται και η απουσία επιδημιολογικών δεδομένων, όπως και έρευνας σε επαγγελματικές ομάδες, που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν λόγω της έκθεσης σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του βακτηρίου, μας ώθησαν στην διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης σε εργαζόμενους στην καθαριότητα στον Δήμο Βέροιας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τόσο της ορολογικής εξέτασης, στην οποία ανιχνεύσαμε την παρουσία αντισωμάτων μεταξύ των συμμετεχόντων, όσο και από τις πληροφορίες που αντλήσαμε μέσω των ερωτηματολογίων, μπορούμε να προβούμε σε ορισμένα συμπεράσματα.

Η ανίχνευση 4 (8%) οροθετικών μεταξύ των 50 εργαζόμενων στην συγκομιδή απορριμμάτων μπορεί να θεωρηθεί σημαντικό εύρημα, παρόλο που το δείγμα της έρευνας μπορεί να χαρακτηριστεί μικρό, και κατέγραψε χαμηλότερο επιπολασμό αν το συγκρίνουμε με παρόμοιες μελέτες σε εργαζόμενους στη συλλογή απορριμμάτων που έχουν διενεργηθεί σε ενδημικές χώρες όπως στην Μαλαισία, όπου έχουν καταγραφεί ποσοστά από 17,9% έως 25,5% (Sulong et al., 2012, Azfar et al., 2017, Azfar et al., 2018). Η παρουσία της λεπτοσπείρωσης μεταξύ των εργαζόμενων στην συγκομιδή απορριμμάτων πιθανότατα μπορεί να σχετίζεται με την καθημερινή ενασχόληση λόγω της επαγγελματικής δραστηριότητας τους και της μεγαλύτερης έκθεσης και στενής επαφής με τα απορρίμματα που θα μπορούσαν να μολυνθούν με το βακτήριο της λεπτόσπειρας. Συνεπώς τα αποτελέσματα της έρευνας και η ανίχνευση οροθετικών μπορεί να αποτελέσει την αρχή για περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο δείγμα στους εργαζόμενους στην καθαριότητα.

Το ποσοστό γνώσης μεταξύ των ερωτηθέντων για την νόσο της λεπτοσπείρωσης καταγράφηκε στο 47,5%, εκ των οποίων 92,1% είχαν μέτρια γνώση και μόλις 7,9% γνώριζαν πολύ καλά την νόσο. Το επίπεδο γνώσης αποτελεί σημαντικό παράγοντα όπου συμβάλλει στην πρόληψη της νόσου, μέσω της εφαρμογής διάφορων προληπτικών και προστατευτικών μέτρων όπως και πρακτικών ορθής υγιεινής. Οπότε, σημαντική

θεωρείται η αύξηση της γνώσης για την νόσο, σε άτομα και επαγγελματικές ομάδες που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκτεθούν στο παθογόνο βακτήριο.

Μεταξύ των ερωτηθέντων το 42.5% χρησιμοποιεί ένα μέτρο προστασίας και το 8.75% δεν χρησιμοποιεί κανένα μέτρο που συνολικά αφορά το 51,25% των ερωτηθέντων. Η ενημέρωση για την νόσο μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση των προστατευτικών μέτρων που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια της εργασίας. Σημαντική επίσης θεωρείται η αποφυγή πρόσληψης τροφής, ροφημάτων και του καπνίσματος κατά τη διάρκεια της εργασίας όπου μεταξύ των ερωτηθέντων μόνο 5% απάντησαν ότι δεν ακολουθούσαν καμία συνήθεια κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Η επιτήρηση και ο εμβολιασμός των ζώων θεωρείται αναγκαίος για τον περιορισμό της ζωνόσου καθώς το 41.25% του συνόλου των συμμετεχόντων έχουν κάποιο κατοικίδιο στο σπίτι τους.

Η ενασχόληση με αγροτικές δουλειές αποτελεί ακόμα ένα παράγοντα που συμβάλλει στην έκθεση σε περιβάλλον (νερό, έδαφος), που μολύνεται από την έκκριση του παθογόνου παράγοντα από τα ζώα, αποτελώντας πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο. Μεταξύ των ερωτηθέντων το 55% έχει ενασχόληση με αγροτικές δουλειές. Η ενημέρωση, τα προστατευτικά μέτρα και οι κανόνες υγιεινής κατά την διάρκεια των αγροτικών εργασιών μπορούν να συμβάλλουν στην προστασία και τον περιορισμό της μετάδοσης της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdulkader, C. R. M., & Silva, M. V.** (2008). "*The kidney in leptospirosis.*" **Pediatric Nephrology** 23(2111).
- Adan, A. M., R. S., & Edmunds, P. N.** (1955). "*Leptospiral serology in Scottish coal-miners.*" **British journal of industrial medicine** 12(2): 100-102.
- Adler, B.** (2015). "*Vaccines against leptospirosis.*" **Curr Top Microbiol Immunol** 387: 251–272.
- Adler, B., & Moctezuma, A., P.** (2010). "*Leptospira and leptospirosis.*" **Veterinary Microbiology** 140: 287–296.
- Agampodi, S.** (2008). "*Doxycycline chemoprophylaxis for leptospirosis-a brief review.*" **Sri Lanka Journal of Medicine** 17.(1): 1–3.
- Agampodi, S., et al.** (2009). "*The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka.*" **Lancet Infect Dis** 9(9): 524-526.
- Ahmed, A., et al.** (2009). "*Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials.*" **PloS One** 4(9): 1-8.
- Alston, J. M., & Broom J. C** (1958). "*Leptospirosis in man and animals* " **E. & S. Edinburgh, U.K: Livingstone.**
- Anderson, D. C., et al.** (1978). "*Leptospirosis: a common-source outbreak due to leptospire of the grippotyphosa serogroup.*" **Am J Epidemiol** 107: 538–544.
- Andrade, L., et al.** (2008). "*Leptospiral nephropathy.*" **Seminars in Nephrology** 28(4): 383-394.
- Asante, J., et al,** (2019). "*Systematic Review of Important Bacterial Zoonoses in Africa in the Last Decade in Light of the ‘OneHealth’ Concept.*" **Pathogens** 8(50): 1-29.
- Ashford, D. A., et al.** (2000). "*Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua.*" **Am J Trop Med Hyg** 63(5-6): 249-254.
- Assimakopoulos, S. F., et al.** (2012). "*Anicteric leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome a case series study.*" **Am. J. Med. Sci** 344(326–329).

Azfar, Z. M., et al. (2017). "*Seroprevalence of Leptospirosis Among Town Service Workers in Kelantan, Malaysia.* ." **South-east Asian J Trop Med Public Health** 48(6): 1222-1229.

Azfar, Z. M., et al. (2018). "*Knowledge, attitude and practice about leptospirosis prevention among town service workers in northeastern Malaysia: a cross sectional study.*" **Journal of preventive medicine and hygiene** 59(1): 92-98.

Bal, A. M. (2005). "*Unusual clinical manifestations of leptospirosis.*" **J Postgrad Med** 51: 179-183.

Barcellos, C., & Sabroza, P. C. (2001). "*The place behind the case: leptospirosis risk and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro.*" **Cad Saúde Pública Rio de Janeiro** 17 59–67.

Bashiru, G., & Bahaman, A. B. (2018). "*Advances & challenges in leptospiral vaccine development.*" **Indian J Med Res.** 147(1): 15–22.

Bertherat, E., et al. (2014). "*Discovery of a leptospirosis cluster amidst a pneumonic plague outbreak in a miners' camp in the democratic republic of the Congo.*" **Int. J. Environ. Res. Public Health** 11(2): 1824-1833.

Bharti, A., et al. (2003). "*Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance.*" **Lancet Infect Dis** 3: 757–771.

Bisias, G., et al. (2010). "*Leptospirosis: An important re-emerging infection of animals and man.*" **Journal Hellenic Veterinary Medical Society** 61(1): 76-84.

Blackmore, D. K., et al. (1984). "*The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera.*" **New Z. Med. J.** 97: 83–86.

Blanco, R. M., & Romero, E. C. (2016). "*Fifteen years of human leptospirosis in São Paulo, Brazil.*" **Journal of Epidemiological Research** 2(1): 56.

Boonsilp, S., et al. (2011). "*Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis.*" **BMC Infect Dis** 11(338): 1-9.

Bourhy, P., et al. (2011). "*Comparison of realtime PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences.*" **J Clin Microbiol** 49: 2154–2160.

Boursaux-Eude, C., et al. (1995). "*IS1500, an IS3-like element from *Leptospira interrogans*.* ." **Microbiology** 141: 2165–2173.

Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). "*A century of *Leptospira* strain typing.*" **Infect Genet Evol** 9(5): 760-768.

Chakurka, G., et al. (2008). "*Cardiovascular lesions in leptospirosis: An autopsy study.*" **Journal of Infection** 56: 197-203.

- Chan, O. Y., et al.** (1987). "*Leptospirosis among abattoir workers—a serological study.*" **Singapore Med. J.** 28: 293–296.
- Chen, H. W., et al.** (2013). "*Detection of Leptospira-specific antibodies using a recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay.*" **The American journal of tropical medicine and hygiene** 89(6): 1088–1094.
- Chin, V. K., et al.** (2018). "*Leptospirosis in human: Biomarkers in host immune responses.*" **Microbiological Research** 207 108–115.
- Chusri, S., et al.** (2014). "*Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: A non-randomized controlled trial.*" **J. Infect. Chemother.** 20: 709–715.
- Costa, F., et al.** (2015). "*Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review.*" **PLoS Negl Trop Dis** 9(9): 1-19.
- Creel, v. R., et al.** (1994). "*Leptospirosis in travelers.*" **Clin Infect Dis** 19: 132–134.
- d’Andon, M. F., et al.** (2014). "*Leptospira Interrogans Induces Fibrosis in the Mouse Kidney Through Inos-Dependent, TLR – and NLR-Independent Signaling Pathways.*" **PLoS Negl Trop Dis** 8(1): 2664.
- De Brito, T., et al** (2018). "*Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review.*" **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** 60 (23.): 1-10.
- Del Sorbo, L., et al.** (2017). "*Mechanical Ventilation in Adults with Acute Respiratory Distress Syndrome. Summary of the Experimental Evidence for the Clinical Practice Guideline.*" **Ann Am Thorac Soc.** 4: 261-270.
- Desai, S., et al.** (2009). "*Resurgence of Field Fever in a Temperate Country: An Epidemic of Leptospirosis among Seasonal Strawberry Harvesters in Germany in 2007.*" **Clinical Infectious Diseases** 48(6): 691–697.
- Desakorn, V., et al.** (2012). "*Accuracy of a Commercial IgM ELISA for the Diagnosis of Human Leptospirosis in Thailand.*" **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 86(3): 524–527.
- Dhewantara, P. W., et al.** (2019). "*Spatial epidemiological approaches to inform leptospirosis surveillance and control: A systematic review and critical appraisal of methods.*" **Zoonoses Public Health.** 66: 185–206.
- Dierks, J., et al.** (2018). "*A Study on the Leptospirosis Outbreak Among US Marine Trainees in Okinawa, Japan.*" **Military Medicine** 183 (3-4): 208–212.
- Dolhnikoff, M., et al** (2007). "*Pathology and Pathophysiology of Pulmonary Manifestations in Leptospirosis.*" **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** 11(1): 142-148.

Dupouey, J., et al. (2014). "Epidemiological investigation of a human leptospirosis case reported in a suburban area near Marseille." **New Microbes New Infect** 2: 82–83.

ECDC (2018). "Leptospirosis. Annual Epidemiological Report for 2015 " Stockholm: ECDC.

Ellis, W. A. (2015). "Animal leptospirosis." **Curr Top Microbiol Immunol** 387: 99-137.

Ellis, W. A., et al. (2000). "Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in Northern Ireland." **Vet Rec** 108: 555–557.

Faine, S., et al. (1999). *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne.

Ferreira, A. S., et al. (2014). "Direct Detection and Differentiation of Pathogenic *Leptospira* Species Using a Multi-Gene Targeted Real Time PCR Approach." **PLoS ONE** 9(11): 1-12.

Fiecek, B., et al. (2017). "An outbreak of leptospirosis imported from Germany to Poland." **Adv Clin Exp Med** 26(3): 415–419.

Galloway, R. L., & Levett, P. (2010). "Application and validation of PFGE for serovar identification of leptospira clinical isolates." **PLoS Negl. Trop. Dis.** 4(824).

Garba, B., et al. (2018). "Antigenic potential of a recombinant polyvalent DNA vaccine against pathogenic leptospiral infection." **Microbial Pathogenesis** 124: 136-144.

Ghazaei, C. (2018). "Pathogenic *Leptospira*: Advances in understanding the molecular pathogenesis and virulence." **Open Veterinary Journal** 8(1): 13-24.

Girons, S. I., et al. (1992). "Genome structure of spirochetes." **Res Microbiol** 143: 615–621.

Girons, S. I., et al. (2000). "The LE1 Bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* Shuttle Vector." **J Bacteriol** 182: 5700–5705.

Goris, M. G., et al. (2011). "Serological laboratory tests for diagnosis of human leptospirosis in patients presenting with clinical symptoms." **Cochrane Database of Systematic Reviews**(11): 1-11.

Goris, M. G., et al. (2012). "Establishment of Valid Laboratory Case Definition for Human Leptospirosis." **J Bacteriol Parasitol** 3(2): 1-8.

Guerrier, G., et al. (2017). "Jarisch–Herxheimer Reaction Among Patients with Leptospirosis: Incidence and Risk Factors." **Am. J. Trop. Med. Hyg** 96(4): 791–794.

Gulati, S., & Gulati, A. (2012). "Pulmonary manifestations of leptospirosis." **Lung India** 29(4): 347-353.

- Haake, D. A., & Levett, P. N.** (2015). "*Leptospirosis in Humans.*" **Curr Top Microbiol Immunol** 387: 65–97.
- Hadad, E., et al.** (2006). "*An outbreak of leptospirosis among Israeli troops near the Jordan River.*" **Am J Trop Med Hyg** 74: 127–131.
- Haraji, M., et al.** (2011). "*Leptospira: Morphology, Classification and Pathogenesis.*" **Journal of Bacteriology and Parasitology** 2(6): 1-4.
- Hartskeerl, R. A., et al.** (2011). "*Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world.*" **Clinical Microbiology and Infection** 17(4): 494-501.
- Henry, JB.** (1979) "*Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.*" Volume 1, **W.B Saunders Company**, Philadelphia, PA, p 60.
- Inada, R., et al.** (1916). "*The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica).*" **J. Exp. Med** 23: 377–402.
- Jiménez, J. I. S., et al.** (2018). "*Leptospirosis: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine.*" **J Crit Care** 43: 361-365.
- Kager, P. A., et al.** (2001). "*Fever and chills due to leptospirosis after travel to Thailand.*" **Ned Tijdschr Geneesk** 145: 184–186.
- Kemenes, F., et al.** (1966). "*Incidence of Weil's disease among coal miners in Hungary.*" **Orvosi hetilap** 107(26): 1210-1212.
- Kitashoji, E., et al.** (2015). "*Diagnostic Accuracy of Recombinant Immunoglobulin-like Protein A-Based IgM ELISA for the Early Diagnosis of Leptospirosis in the Philippines.*" **PLOS Neglected Tropical Diseases** 9(6): 1-13.
- Klaasen, H. L. B. M., et al.** (2013). "*A novel tetravalent Leptospira bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs.*" **Vet Rec.** 172(7): 181
- Ko, A. I., et al.** (1999). "*Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil.*" **Lancet** 354: 820–825.
- Ko, A. I., et al.** (2009). "*Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen.*" **Nature reviews. Microbiology** 7(10): 736-747.
- Kobayashi, Y.** (2001). "*Clinical observation and treatment of leptospirosis.*" **J Infect Chemother** 7: 59–68.
- Koe, S. L. L., et al.** (2014). "*Leptospirosis in pregnancy with pathological fetal cardiotocography changes.*" **Singapore Med J.** 55(2): 20–24.

- Koizumi, N., et al.** (2012). "A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine " **J Clin Microbiol** 50: 2072–2074.
- Lau, C. L., et al.** (2010). "Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire?" **Trans R Soc Trop Med Hyg** 104: 631–638.
- Laurichesse, H., et al.** (2007). "Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup *Icterohaemorrhagiae* in healthy volunteers." **Clin Microbiol Infect** 13: 395–403.
- Lehmann, J. S., et al.** (2014). "Leptospiral pathogenomics." **Pathogens** 10(3): 280–308.
- Levett, P. N.** (2001). "Leptospirosis." **Clinical Microbiology Reviews** 14(2): 296–326.
- Lin, X., et al.** (2009). "Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*." **Diagn Microbiol Infect Dis** 63: 237–242.
- Lloyd-Smith, J. O., et al.** (2007). "Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species?" **BMC Infect Dis** 7(125).
- Lupi, O., et al.** (2013). "Cluster of leptospirosis cases among military personnel in Rio de Janeiro, Brazil." **Int J Infect Dis** 17: 129–131.
- Marinho, M., & Cardoso, T. C.** (2014). "Pathogenesis of Leptospirosis: Important Issues." **J Med Microb Diagn** 4(1).
- Martinez, R., et al.** (2004). "Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba." **Rev Panam Salud Publica** 15: 249–255.
- Matthias, M. A. et al.** (2005). "Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences." **Am J Trop Med Hyg** 73(5): 964–974.
- Michalopoulos, A., et al.** (2010). "Leptospirosis in a European intensive care unit." **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** 42(1): 69–71.
- Monahan, A. M., et al.** (2008). "Proteomic Analysis of *Leptospira Interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts." **Infect Immun** 76(4952–4958).
- Monis, P. T., et al.** (2005). "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis." **Anal. Biochem** 340: 24–34.
- Moreno, L. Z., et al** (2016). "Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing—a

continuous attempt at species and serovar differentiation." **Emerg. Microbes Infect** 5(1): 1-7.

Morey, E. R., et al. (2006). "*Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16srRNA Gene sequencing.*" **Jour of Clinical Microbiology**: 3510-3516.

Morgan, J., et al. (2002). "*Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998.*" **Clin Infect Dis** 34: 1593-1599.

Mori, Y., & Notomi, T. (2009). "*Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases.*" **J Infect Chemother** 15: 62-69.

Mullan, S., & Panwala, T. H. (2016). "*Polymerase Chain Reaction: An Important Tool for Early Diagnosis of Leptospirosis Cases.*" **Journal of clinical and diagnostic research** 10(12): 8-11.

Musso, D., & Scola, B. (2013). "*Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge.*" **Journal of Microbiology, Immunology and Infection** 46: 245-252.

Mythri, B. A. (2015). "*Laboratory Diagnosis of Leptospirosis: A Review.*" **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences** 4(50): 8759-8769.

Nahori, M. A., et al. (2005). "*Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells.*" **J Immunol** 175: 6022–6031.

Nakaran, J., & Pradutkanchana, S. (2004). "*Evaluation of enzymelinked immunosorbent assay and indirect hemagglutination assay for detection of leptospiral antibody by using three different antigens.*" **Journal of the Medical Association of Thailand** 87: 1218–1223.

Naotunna, C., et al. (2016). "*Etiological agents causing leptospirosis in Sri Lanka: A review.*" **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 9(4): 390–394.

Nascimento, A. L., et al. (2004). "*Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis.*" **J Bacteriol** 186(2164–2172).

Nozmi, N., et al. (2018). "*Low Levels of Knowledge, Attitudes and Preventive Practices on Leptospirosis among a Rural Community in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia.*" **Int. J. Environ. Res. Public Health** 15(693): 1-15.

Padre, L. P., et al. (1988). "*A serologic survey of rice-field leptospirosis in Central Luzon, Philippines.*" **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 19: 197–199.

Palaniappan, U. M. R., et al. (2007). "*Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis.*" **Curr Opin Infect Dis** 20: 284–292.

Panagopoulos, P., et al. (2016). "*Leptospirosis: a report on a series of five autochthonous cases in a Greek region.*" **Journal of Chemotherapy** 28(5): 428-431.

- Papa, A., & Kotrotsiou, T.** (2015). "*Leptospirosis in Greece.*" **Acta Tropica** 149: 135–137.
- Pappas, G., et al.** (2008). "*The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends.*" **Int J Infect Dis** 12(4): 351-357.
- Parveen, S. M. A., et al.** (2016). "*Leptospirosis seroprevalence among blue metal mine workers of Tamil Nadu, India.*" **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 95(1): 38-42.
- Paster, B. J., et al.** (1991). "*Phylogenetic analysis of the spirochetes.*" **J. Bacteriol** 173: 6101–6109.
- Picardeau, M.** (2013). "*Diagnosis and epidemiology of leptospirosis.*" **Médecine et maladies infectieuses** 43 1–9.
- Picardeau, M., et al.** (2014). "*Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies.*" **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 78: 1–8.
- Pijnacker, R., et al.** (2016). "*Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands 2014.*" **Euro surveill** 21(17): 1-7.
- Planka, R., & Dean, D.** (2000). "*Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans.*" **Microbes and Infection** 2: 1265-1276.
- Prescot, J. F., et al.** (2002). "*Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings.*" **Can Vet J** 43: 955–961.
- Rathinam, S. R.** (2005). "*Ocular Manifestations of Leptospirosis*" **J Postgrad Med** 51: 189-194.
- Rathinam, S. R., & Agarwa, S.** (2014). "*Uveitis and Leptospirosis.*" **Kerala Journal of Ophthalmology** 26(1): 1-4.
- Reid, S. A., et al.** (2017). "*A process for developing multisectoral strategies for zoonoses: the case of leptospirosis in Fiji.*" **BMC Public Health** 17(1): 671.
- Ricaldi, J. N., & Vinetz J. M.** (2006). "*Leptospirosis in the tropics and in travelers.*" **Curr Infect Dis Rep** 8: 51–58.
- Ridder, A. B., et al.** (2010). "*Estimating the burden of human leptospirosis.*" **Int J Antimicrob Ag** 36: 5-7.
- Ristow, P., et al.** (2007). "*The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence.*" **PLoS pathogens** 3(7): 97.
- Romero, E. C., et al.** (1998). "*The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test.*" **Rev. Inst. Med. Trop.** 40: 183-184.

- Romero, E. C., et al.** (2003). "*Human leptospirosis: atwenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil.*" **Rev InstMed Trop Sao Paulo** 45: 245-248.
- Rosa, M. I., et al.** (2017). "*IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis.*" **Cien Saude Colet.** 22(12): 4001-4012.
- Russell, K. L., et al.** (2003). "*An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. .*" **Am J Trop Med Hyg** 69(69): 53–57.
- Salkade, H. P., et al** (2005). "*A Study of Sutopsy Findings in 62 Cases of Leptospirosis in a Metropolitan City in India*" **J Postgrad Med** 51: 169-173.
- Santos, L. A., et al.** (2018). "*Genomic Comparison Among Global Isolates of L. interrogans Serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae Identified Natural Genetic Variation Caused by an Indel.*" **Front. Cell. Infect. Microbiol** 8(193).
- Schneider, M. C., et al.** (2017). "*The Use of Chemoprophylaxis after Floods to Reduce the Occurrence and Impact of Leptospirosis Outbreaks.*" **Int J Environ Res Public Health.** 14(6): 594.
- Schuler, R. C., et al.** (2017). "*Pressor support during a Jarisch Herxheimer reaction after initiation of treatment for Weil's disease.*" **American Journal of Emergency Medicine** 35 1211.
- Seguro, A., & Andrade, L.** (2013). "*Pathophysiology of Leptospirosis.*" **Shock** 39(7): 17-23.
- Sehgal, S. C., et al.** (1995). "*Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in north Andaman.*" **Indian J Med Res** 102: 9-12.
- Sejvar, J., et al.** (2003). "*Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000.*" **Emerg Infect Dis** 9(6): 702-707.
- Shafei, M. N., et al.** (2017). "*Seroprevalence of Leptospirosis among Town Service Workers in Northeastern State of Malaysia*" **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 48(6): 1222-1229.
- Shimizu, T., et al.** (1987). "*Biological activities of lipopolysaccharide- like substance (LLS) extracted from Leptospira interrogans serovar canicola strain.*" **Moulton. Microbiol. Immunol.** 31(8): 727-735.
- Shivaraj, B., et al.** (2012). "*A study on prophylactic doxycycline to reduce the incidence of leptospirosis among paddy field farmers in a coastal district of India.*" **International Journal of Infectious Diseases** 16: 462.
- Signorini, M., et al.** (2013). "*Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: A meta-analysis of the published literature.*" **Epidemiology and Infection** 141(1): 22-32.

- Silva, M. V., et al.** (1995). "*Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence.*" **J Trop Med Hyg** . 98: 268-272.
- Silveira, M. M., et al.** (2017). "*DNA vaccines against leptospirosis: A literature review.*" **Vaccine** 35 5559–5567.
- Siriwanij., et al.** (2005). "*Haemodynamics in leptospirosis: effects of plasmapheresis and continuous venovenous haemofiltration.*" **Nephrology(Carlton)** 10(1): 1-6.
- Smythe, L. D., et al** (2002). "*A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp.*" **BMC Infect Dis** 2(13).
- Sonthayanon, P., et al.** (2011). "*Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand.*" **Am J Trop Med Hyg** 84(4): 614-620.
- Stimson, A. M.** (1907). "*Note on an organism found in yellow-fever tissue.*" **Publ Health Rep** 22: 541.
- Stoddard, R. A., et al** (2009). "*Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene.*" **Diagn Microbiol Infect Dis** 64: 247–255.
- Stritof, M. Z., et al.** (2014). "*Epizootiological survey of small mammals as Leptospira spp.reservoirs in Eastern Croatia.*" **Acta Tropica** 131: 111-116.
- Sulong, M. R., et al.** (2012). "*Seroprevalence of Leptospirosis among Town Service Workers in Northeastern State of Malaysia.*" **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health** 4(4).
- Talwani, R., et al.** (2011). "*Infectious Diseases and the Liver.*" **Clin Liver Dis** 15(1): 111–130.
- Tandir, S., et al.** (2006). "*Serological and epidemiological confirmation of leptospirosis epidemic in the mine "Stara Jama" in Zenica in 2005.*" **Medicinski arhiv** 60(6): 379-382.
- Thavasu, PW et al.** (1992). "*Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions.*" **J Immunol Methods** 153:115–124.
- Thiermann, A. B., & Frank, R. R.** (1980). "*Human leptospirosis in Detroit and the role of rats as chronic carriers.*" **Int J Zoonoses** 7: 62–72.
- Trueba, G., et al.** (2004). "*Cell aggregation: a mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water.*" **Int Microbiol** 7(1): 35-40.

- Tse, K. C., et al.** (2002). "Potential benefit of plasma exchange in treatment of severe icteric leptospirosis complicated by acute renal failure." **Clin Diagn Lab Immunol** 9: 482–484.
- Tuck, M. K.** (2009). "Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group." **J Proteome Res** 8(1):113-117
- Verma, R., et al.** (2013). "Whole-cell inactivated leptospirosis vaccine: future prospects. ." **Hum Vaccin Immunother** 9: 763–765.
- Victoriano, A., et al.** (2009). "Leptospirosis in the Asia Pacific region " **BMC Infect Dis** 9: 147.
- Vijayachari, P., et al.** (2008). "Leptospirosis in the Andaman Islands, India." **Trans R Soc Trop Med Hyg** 102(2): 117-122.
- Vijayachari, P., et al.** (2008). "Leptospirosis: an emerging global public health problem." **Journal of Biosciences** 33(4): 557–569.
- Vinetz, J. M., et al.** (1996). "Sporadic urban leptospirosis." **Ann Intern Med** 125: 794–798.
- Waitkins, S. A.** (1986). "Leptospirosis as an occupational disease." **British Journal of Industrial Medicine** 43(11): 721-725.
- WHO** (2003). "Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control." **WHO Library Cataloguing in - Publication Data, ISBN 92 4 154589 5.**
- Wuthiekanun, V., et al.** (2007). "Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. ." **Emerging infectious diseases** 13(1): 124-126.
- Xu, Y., et al.** (2014). "Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: the delivery perspectives." **Pharmaceutics** 6: 378–415.
- Xu, Y., & Ye, Q.** (2018). "Human leptospirosis vaccines in China." **Human Vaccines & Immunotherapeutics** 14(4).
- Zaki, S. R., & Sheih, W. J.** (1996). "Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness with pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The epidemic working group at Ministry of Health in Nicaragua." **Lancet** 347: 535–536.
- Zilber, A. L., et al.** (2014). "High-resolution typing of leptospira interrogans strains by multispacer sequence typing." **J. Clin. Microbiol** 52: 564–571.
- Zuerner, R. L.** (1994). "Nucleotide sequence analysis of IS1533 from *Leptospira borgpetersenii*: identification and expression of two IS-encoded proteins." **Plasmid** 31: 1–11.

Zuerner, R. L., & Trueba, G.A. (2005). "*Characterization of IS1501 mutants of Leptospira interrogans serovar pomona.*" **FEMS Microbiol. Lett** 248: 199–205.

8. Έχετε κατοικίδιο στο σπίτι;

ΝΑΙ ΟΧΙ

9. Αν ναι προσδιορίστε

Γάτα Σκύλος άλογο γουρούνι
πρόβατο/αίγα άλλο.....

10. Τύπος κατοικίας:

Πόλη αριθμός κατοίκων.....

Κωμόπολη αριθμός κατοίκων.....

Χωριό αριθμός κατοίκων.....

11. Ασχολείστε με αγροτικές δουλειές ;

ΝΑΙ ΟΧΙ

12. Αν ναι εξειδικεύστε:

Κλάδεμα δέντρων
Κούρεμα γκαζόν
Συγκομιδή οργανικής ύλης (κοπριάς)
Τρύγος
Δενδροκαλλιέργεια
Άλλο-προσδιορίστε.....

Δελτίο συναίνεσης

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω ότι συναινώ στην επεξεργασία του δείγματος ορού που δίνω στους ερευνητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την διερεύνηση της λεπτοσπείρωσης.