



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**“ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ
ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ”**



**«LABORATORY DIAGNOSIS, SURVEILLANCE AND
CONTROL MEASURES OF LEPTOSPIROSIS»**

ΣΙΑΦΑΚΑ ΕΛΕΝΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ
ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ»**



**«LABORATORY DIAGNOSIS, SURVEILLANCE AND
CONTROL MEASURES OF LEPTOSPIROSIS»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ
ΣΙΑΦΑΚΑ ΕΛΕΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΓΚΑΡΤΖΟΝΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΟΝΟΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ
ΣΙΑΦΑΚΑ ΕΛΕΝΗ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:
«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ
ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ»

Ημερομηνία παρουσίασης: **26/06/2025**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής
Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Εξεταστική επιτροπή:

Πιτυρίγκα Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής
Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ
Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας,
Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η διαδικασία επικυρώνεται από:

- Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ
- Την/ον Πρόεδρο του Τμήματος

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την βοήθεια της σε αυτό το δύσκολο κομμάτι της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία ήταν δίπλα μου από την πρώτη στιγμή σε ότι χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ πολύ για την καθοδήγησή της, τις συμβουλές της και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για την συγκεκριμένη εργασία. Ακόμα, την ευχαριστώ και για τη γνώση που μου μετέφερε κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Πιτυρίγκα Βασιλική, καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, και τον κ. Μποζίδη Πέτρο, καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχτηκαν να είναι μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας και ήταν πρόθυμοι να με στηρίξουν σε αυτήν μου την προσπάθεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που ήταν πάντα δίπλα μου, για την στήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου καθώς και για την συμπαράστασή τους συμβάλλοντας έτσι στην εκπλήρωση των στόχων μου.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

A' μέρος: ΓΕΝΙΚΟ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ.....	10
2. ΔΟΜΗ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	12
3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	17
4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	22
5. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ.....	26
5.1. Παράγοντες και ομάδες κινδύνου.....	27
5.2. Κλινικές Μορφές Νόσου.....	30
5.2.1. Ανικτερική μορφή.....	30
5.2.2. Νόσος Weil (Ικτερική μορφή).....	32
6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	34
7. ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗ ΚΑΙ ΖΩΑ.....	37
7.1. Είδη ζώων-Παθογένεια-Συμπτωματολογία.....	37
7.2. Θεραπεία λεπτοσπείρωσης σε ζώα.....	38
7.3. Ζωικά μοντέλα.....	40

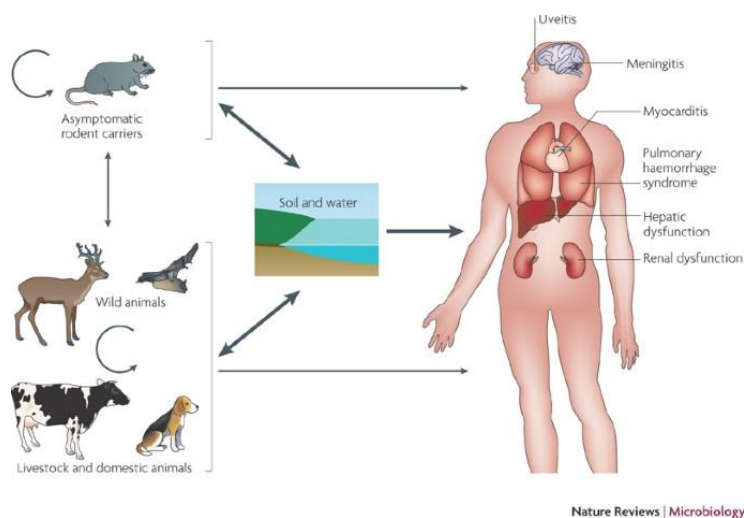
B' μέρος: ΕΙΔΙΚΟ

8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	41
8.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ.....	44
8.1.1. ΑΜΕΣΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
8.1.1.1. Μικροσκοπική Εξέταση.....	47
8.1.1.2. Καλλιέργεια.....	50
8.1.1.3. Μοριακές Μέθοδοι.....	53
8.1.2. ΕΜΜΕΣΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	64
8.1.2.1. Ορολογικές/Ανοσολογικές Μέθοδοι.....	64
9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	73
10. ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ.....	80
11. ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ.....	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	91
ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ABSTRACT.....	93-94
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η λεπτοσπείρωση είναι μία σοβαρή ζωνο νόσος που συναντάμε παγκοσμίως και η οποία προκαλείται από μόλυνση με βακτήρια του γένους *Leptospira* (Zavitsanou & Babatsikou, 2008). Κάθε χρόνο αναφέρονται περισσότερες από 500.000 περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης με τα ποσοστά θνησιμότητας να ξεπερνούν το 10% (Ko et al., 2009). Είναι αρκετά διαδεδομένη και αποτελεί ιδιαίτερα σοβαρό κίνδυνο για την δημόσια υγεία καθώς προσβάλλει όχι μόνο τα ζώα αλλά και τον άνθρωπο. Η ποικιλία ζωικών ξενιστών που έχει ταυτοποιηθεί είναι μεγάλη, με τα τρωκτικά και κυρίως τα ποντίκια ως κύριους ξενιστές, αλλά και άλλα θηλαστικά όπως βοοειδή, χοίροι και σκύλοι να θεωρούνται εξίσου σημαντικοί (Guernier et al., 2018).

Στο γένος *Leptospira* ανήκουν τόσο παθογόνα όσο και σαπροφυτικά (ελεύθερα μη παθογόνα) βακτήρια. Την νόσο ωστόσο προκαλούν τα παθογόνα στελέχη που ανήκουν στο γένος. Η μόλυνση γίνεται συνήθως μέσω άμεσης επαφής με ούρα από μολυσμένο ζώο είτε με κατανάλωση μολυσμένου νερού (Εικ. 1). Οι λεπτοσπείρες εισέρχονται στον οργανισμό μέσω πληγών, εκδορών του δέρματος ή μέσω των βλεννογόνων της μύτης, των οφθαλμών και του στοματοφάρυγγα (Samrot et al., 2021). Η έναρξη της νόσου διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο, από 1 μέρα έως και 4 εβδομάδες, ενώ η λοίμωξη μπορεί να διαρκέσει μέχρι και μήνες. Παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων και η σοβαρότητα της λοίμωξης εξαρτάται από το στέλεχος ή τον ορότυπο που εμπλέκεται (Evangelista & Coburn, 2010).



Εικόνα 1. Τρόποι μετάδοσης και διασποράς της λεπτοσπείρωσης στον άνθρωπο (Ko et al., 2009)

Οι κλινικές εκδηλώσεις της λεπτοσπείρωσης στους ανθρώπους κυμαίνονται από ήπια ασθένεια που μοιάζει με γρίπη έως σοβαρής μορφής ασθένειας που ονομάζεται αλλιώς και νόσος του Weil (Evangelista & Coburn, 2010). Η ασθένεια υποδηλώνεται σημαντικά λόγω ανεπαρκών διαθέσιμων διαγνωστικών μεθόδων αλλά και επειδή τα συμπτώματά της νόσου ομοιάζουν με άλλων ιογενών και βακτηριακών λοιμώξεων (Kumari et al., 2024).

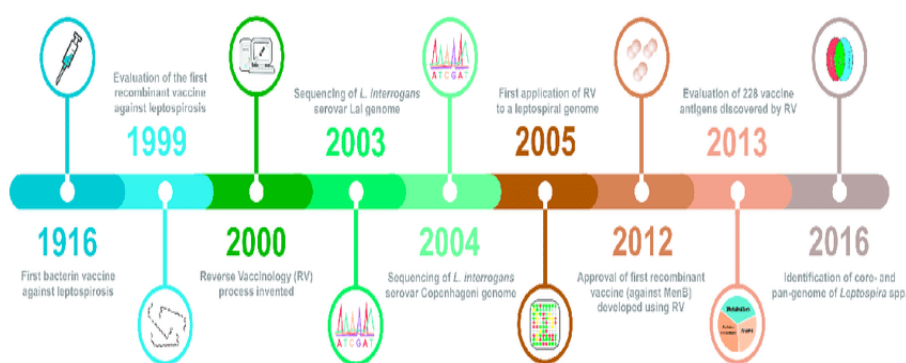
Θεωρείται ενδημική κυρίως νόσος που παρουσιάζεται σε τροπικά και υποτροπικά κλίματα. Ιδιαίτερη αύξηση κρουσμάτων υπήρξε τα τελευταία χρόνια λόγω ορισμένων παραγόντων και η μετάδοσή της έχει συσχετιστεί με κοινωνικοοικονομικές καταστάσεις. Τέλος, αρκετές φορές τα περιστατικά της νόσου δεν καταγράφονται, ιδιαίτερα σε αναπτυσσόμενες χώρες, κάτι που προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία (Arboleda et al., 2023).

1. ΙΣΤΟΡΙΑ

Ο 19^{ος} αιώνας έφερε ορθολογική κατανόηση της αιτιολογίας και της μετάδοσης των μολυσματικών ασθενειών. Ήταν η αρχή της επιστήμης της Μικροβιολογίας με την ανακάλυψη των μικροβίων ως αιτιολογικούς παράγοντες των μεταδοτικών νόσων. Κατά τον 19^ο αιώνα υπήρχαν πολλές αναφορές για επιδημίες περιστατικών με ίκτερο, που καταγράφηκαν με ποικιλία ονομάτων, όπως για παράδειγμα τυφοειδής, ηπατικός, καταρροϊκός, κτλ. Κάποιες από αυτές τις επιδημίες πολύ πιθανόν να ήταν και περιστατικά λεπτοσπείρωσης (Terpstra, 2006).

Το 1886 ο καθηγητής του Heidelberg, Adolf Weil, περιέγραψε τέσσερις περιπτώσεις μολυσματικού ίκτερου, εκ των οποίων οι δύο εμφανίστηκαν το 1882 και οι άλλες δυο το 1870. Οι περιπτώσεις αυτές ήταν τόσο όμοιες μεταξύ τους που τις θεώρησε ίδια ασθένεια. Όλες παρουσίαζαν πυρετό με σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα, ηπατοσπληνομεγαλία και σημεία νεφρικής ανεπάρκειας. Η ανάρρωση ήταν ταχεία, ακόμη και μετά από σοβαρή ασθένεια σχετικά μικρής διάρκειας. Κατά τη διαφορική διάγνωση, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι επρόκειτο για μία νέα οντότητα σε κλινικό επίπεδο, αν και δεν μπορούσε να αποδείξει ούτε την ανατομική του βάση ούτε τον αιτιολογικό παράγοντα. Ένα φαινομενικά πανομοιότυπο σύνδρομο, που εμφανίζονταν σε εργάτες δικτύων αποχέτευσης, είχε περιγραφεί αρκετά χρόνια νωρίτερα. Είχε αναγνωρισθεί ως επαγγελματικός κίνδυνος της συγκομιδής ρυζιού στην αρχαία Κίνα και η ιαπωνική ονομασία ήταν *akiyami* ή φθινοπωρινός πυρετός, που υπάρχει και χρησιμοποιείται ακόμα στη σύγχρονη ιατρική. Υπάρχουν σαφείς περιγραφές της ικτερικής μορφής, που μπορεί να αναγνωριστούν ότι εμφανίστηκαν νωρίτερα τον 19ο αιώνα, μερικά χρόνια πριν από την περιγραφή του Weil. Το βακτήριο *Leptospira interrogans* με ορότυπο *icterohaemorrhagiae* θεωρείται ότι εισήχθη στη δυτική Ευρώπη τον 18^ο αιώνα με δυτική επέκταση του εύρους του *Rattus norvegicus*. Η ονομασία "νόσος Weil" χρησιμοποιήθηκε διεθνώς για περίπου τρεις δεκαετίες μετά την αρχική περιγραφή της, προκειμένου να χαρακτηρίσει τη συγκεκριμένη κλινική οντότητα. Παρ' όλα αυτά, υπήρξαν αμφιβολίες τόσο ως προς την αιτιολογία της όσο και ως προς την ταυτοποίηση της νόσου σε μεμονωμένες περιπτώσεις. Η αρχική θεώρηση του Weil ότι επρόκειτο για νέα νοσολογική οντότητα στηριζόταν αποκλειστικά στην αξιολόγηση των κλινικών συμπτωμάτων και ευρημάτων. Η ορθότητα της υπόθεσής του επιβεβαιώθηκε τελικά το 1915, ανεξάρτητα

στη Γερμανία και στην Ιαπωνία. Ειδικότερα, οι Inada και Ido από το Imperial University του Kyushu στην Ιαπωνία απέδειξαν ότι η νόσος προκαλείται από σπειροχαίτη του γένους *Leptospira*, και συγκεκριμένα από το είδος *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Η ενοχοποίηση του παθογόνου έγινε μέσω της ανίχνευσης σπειροχαίτης και ειδικών αντισωμάτων στο αίμα Ιαπώνων ανθρακωρύχων που παρουσίαζαν συμπτώματα μολυσματικού ίκτερου (Alston & Brown, 1937). Αμέσως μετά, ανεξάρτητα, επιβεβαιώθηκε και στη Γερμανία από τους Uhlenhuth και Fromme ως η αιτία της ασθένειας που είχε αρχικά περιγραφεί από τον Weil. Δύο ομάδες Γερμανών γιατρών μελέτησαν Γερμανούς στρατιώτες που είχαν προσβληθεί από «γαλλική ασθένεια» στα χαρακώματα της βορειοανατολικής Γαλλίας. Οι Uhlenhuth και Fromme και οι Hubener και Reiter ανίχνευσαν σπειροχαίτες στο αίμα ινδικών χοιριδίων που είχαν εμβολιαστεί με αίμα μολυσμένων στρατιωτών (Εικ. 2). Ωστόσο, αυτές οι δύο ομάδες ενεπλάκησαν τόσο πολύ σε διαφωνίες για την ονοματολογία που παρέβλεψαν τις πρώτες δημοσιεύσεις των εργασιών της ομάδας του Inada, της οποίας οι αρχικές μελέτες προηγήθηκαν των δικών τους κατά 8 μήνες. Η επιβεβαίωση της εμφάνισης λεπτοσπείρωσης και στις δύο πλευρές του Δυτικού Μετώπου ελήφθη γρήγορα μετά τη δημοσίευση στην Ευρώπη του έργου του Inada (WHO, 2003).

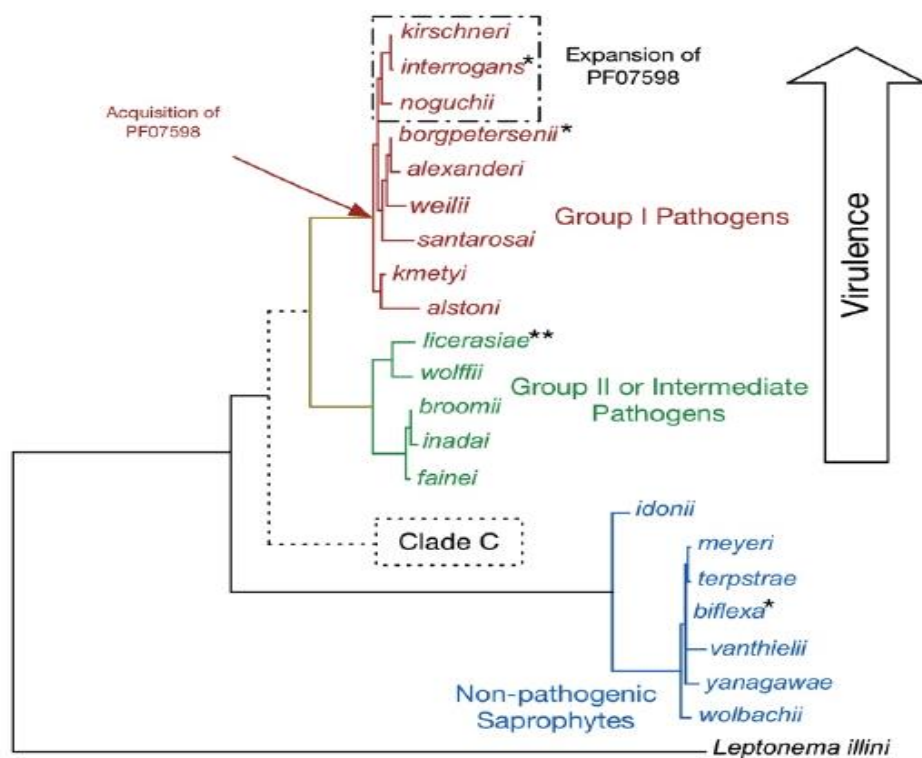


Εικόνα 2. Ιστορία εμβολιασμών κατά της λεπτοσπείρωσης, το πρώτο εμβόλιο κατά της νόσου παράχθηκε και αξιολογήθηκε σε ινδικό χοιρίδιο και ύστερα ακολούθησε η δοκιμή του σε χάμστερ (Dellagostin et al., 2017)

Από το 1918 η ασθένεια έχει αναγνωριστεί βακτηριολογικά ή ορολογικά στις περισσότερες χώρες και περιοχές του κόσμου. Οι λεπτόσπειρες είχαν παρατηρηθεί πρώτη φορά από τον Stimson, σε τομές νεφρών από άτομο που είχε θεωρηθεί ότι πέθανε από κίτρινο πυρετό. Σήμερα το όνομα του Weil εξακολουθεί να συνδέεται με τη σοβαρή μορφή λεπτοσπείρωσης που ονομάζεται και νόσος του Weil, που παραδοσιακά αποδίδεται σε λοίμωξη που μεταδίδεται από αρουραίους η οποία προκαλείται από ορότυπους της λεπτόσπειρας (Alston & Brown, 1937).

2. ΔΟΜΗ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ – ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

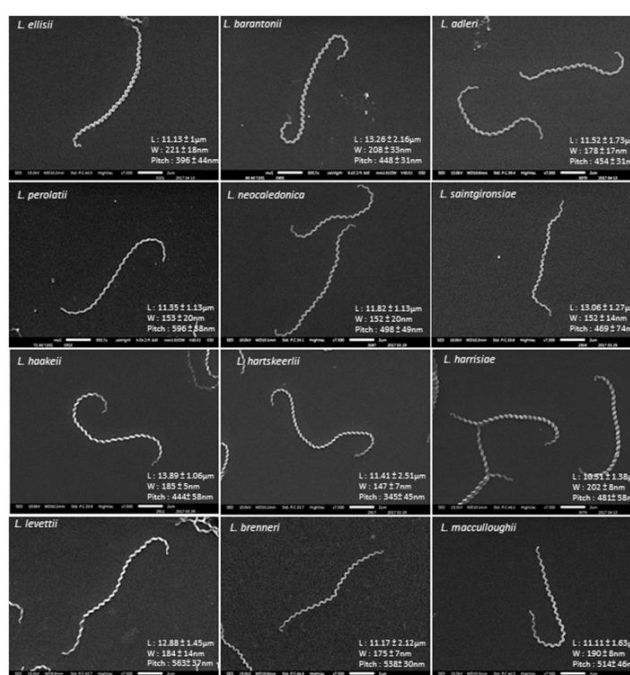
Το γένος *Leptospira* που περιλαμβάνει παθογόνα και σαπροφυτικά είδη ανήκει στην οικογένεια *Leptospiraceae* της τάξης *Spirochaetales* (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). Η σύγχρονη βακτηριακή ταξινόμηση βασίζεται κυρίως στην γενετική ποικιλότητα, ενώ η ορολογική ταυτοποίηση των στελεχών λεπτόσπειρας έχει σπουδαία πρακτική σημασία για δύο λόγους. Αρχικά βοηθά στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης και ανοσολογικής απόκρισης, και επιπλέον είναι σημαντική για τη διάγνωση και ειδικότερα για την εξακρίβωση της ανοσοποίησης μέσω εμβολιασμού. Η αντιγονική ποικιλομορφία μεταξύ των ορότυπων της λεπτόσπειρας προσδιορίζεται από υδατανθρακικές πλευρικές αλυσίδες λιποπολυσακχαριτών. Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS έχει προσδιοριστεί ως κυρίαρχο στην ανοσοποίηση αντιγόνο, τόσο στην απόκριση από φυσική μόλυνση, όσο και από τον εμβολιασμό. Επίσης θεωρείται ως το μοναδικό προστατευτικό αντιγόνο που έχει ταυτοποιηθεί (Arent et al., 2022). Έχουν καταγραφεί διάφορα είδη λεπτοσπειρών (Εικ. 3), συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων, των μη παθογόνων, καθώς και απροσδιόριστης παθογονικότητας ειδών (Levett & Haake, 2010).



Εικόνα 3. Ταξινόμηση ειδών λεπτοσπειρών ανάλογα με την παθογένεια τους (Lehmann et al., 2014)

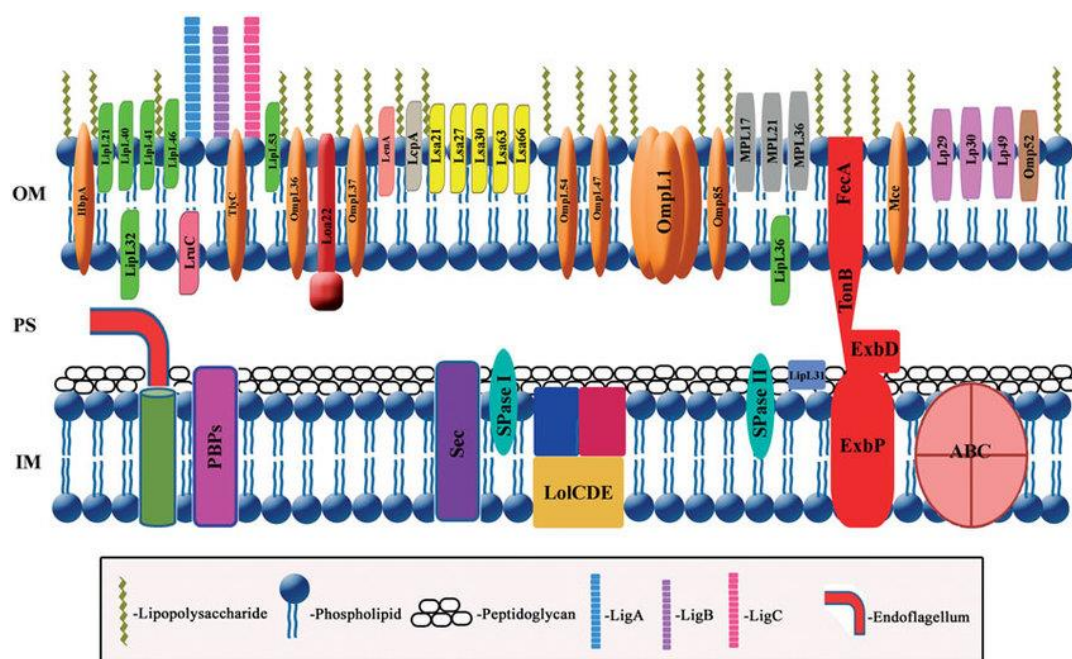
Η λέξη «λεπτόσπειρα» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις λεπτός και σπείρα, χαρακτηρίζοντας έτσι την μορφή του βακτηρίου (Levett & Haake, 2010). Τα βακτηριακά τους κύτταρα είναι διαφορετικά από αυτά των υπόλοιπων και αυτό οφείλεται κυρίως στην δομή τους (Εικ. 4) (Arent et al., 2022). Οι λεπτόσπειρες είναι πολύ λεπτές, σφιγτά συσπειρωμένες, οι οποίες ξεχωρίζουν λόγω της κινητικότητάς τους. Διακρίνονται σε δύο κύρια είδη, τις παθογόνες λεπτόσπειρες *L.interrogans*, και τις σαπροφυτικές λεπτόσπειρες *L.biflexa*. Οι διαφορετικοί ορότυποι της *L.interrogans* είναι εκείνοι που ευθύνονται για την λεπτοσπειρωση (Johnson & Faine, 1984).

Πρόκειται για μικροαερόφιλο μικροοργανισμό, ο οποίος αναπτύσσεται βέλτιστα σε περιβάλλον με μειωμένα επίπεδα οξυγόνου σε σύγκριση με αυτά της ατμόσφαιρας, αν και μπορεί να αναπτυχθεί και υπό πλήρως αερόβιες συνθήκες. Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξή του κυμαίνεται μεταξύ 28–30°C, με την ανάπτυξη να παρατηρείται ακόμη και στους 37°C. Το βέλτιστο εύρος pH για την ανάπτυξή του είναι 6,8 έως 7,4 (Cilia et al., 2021; Andersen-Ranberg et al., 2016; Bharti et al., 2003). Το μήκος των βακτηρίων κυμαίνεται μεταξύ 6 και 20 μm. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα αποτελεί το άγκιστρο στις άκρες του σώματός τους, το οποίο μοιάζει με ερωτηματικό και έδωσε το όνομά τους. Η κυτταρική επιφάνειά τους παρουσιάζει δομικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται τόσο σε Gram-θετικά όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια (Evangelista & Coburn, 2010).



Εικόνα 4. Μορφολογία διαφόρων ειδών λεπτόσπειρας (Thibeaux et al., 2018)

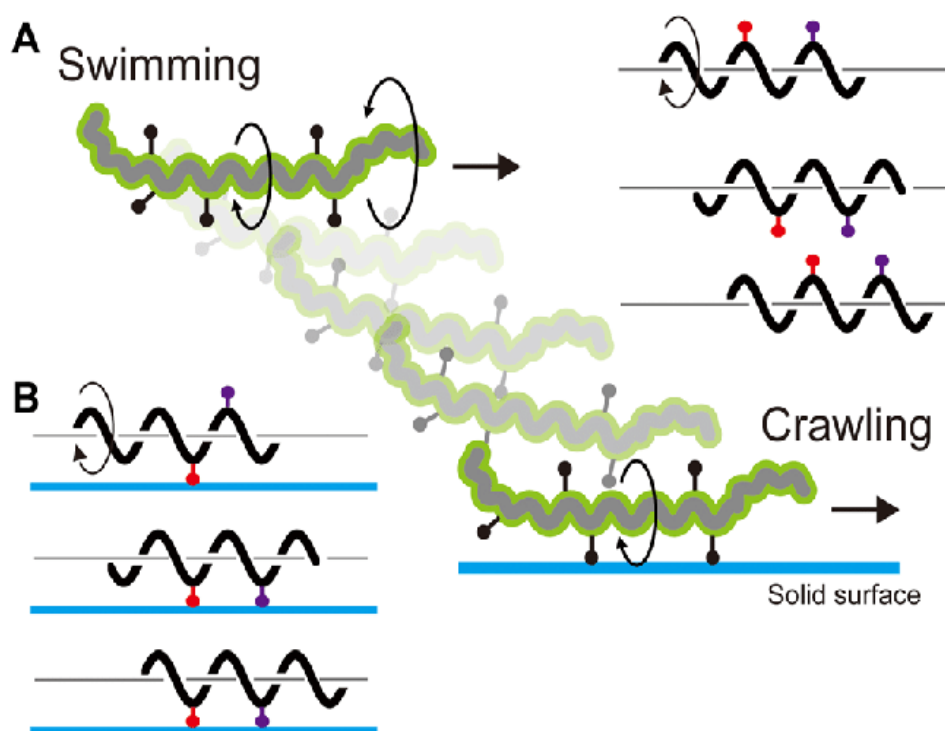
Η λεπτόσπειρα διαθέτει δύο μεμβράνες, όπου η εξωτερική μεμβράνη δεν είναι προσκολλημένη στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης (PGN) και ο περιπλασματικός χώρος περιέχει το μαστίγιο (Veerapandian & Natarajaseenivasan, 2015). Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη και κάποιες πρωτεΐνες σύνδεσης. Η επιβίωση του βακτηρίου βασίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα από πεπτιδογλυκάνη, για αυτό είναι και ο στόχος πολλών αντιβιοτικών. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει λιποπολυσακχαρίτες (LPS), λιποπρωτεΐνες, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και περιφερειακές OMPs (Εικ. 5). Οι LPS είναι σύνθετα λιπιδίων και σακχάρων στην επιφάνεια όλων των ειδών λεπτόσπειρας και έχουν χαμηλή δραστικότητα ενδοτοξίνης. Στο LPS της βακτηριακής μεμβράνης υπάρχει το λιπίδιο A (lipid A), το οποίο είναι ενεργό συστατικό του LPS και είναι υπεύθυνο για την τοξική του δραστηριότητα (Hsu & Yang, 2022).



Εικόνα 5. Η αρχιτεκτονική της εξωτερικής μεμβράνης της λεπτόσπειρας (Veerapandian & Natarajaseenivasan, 2015)

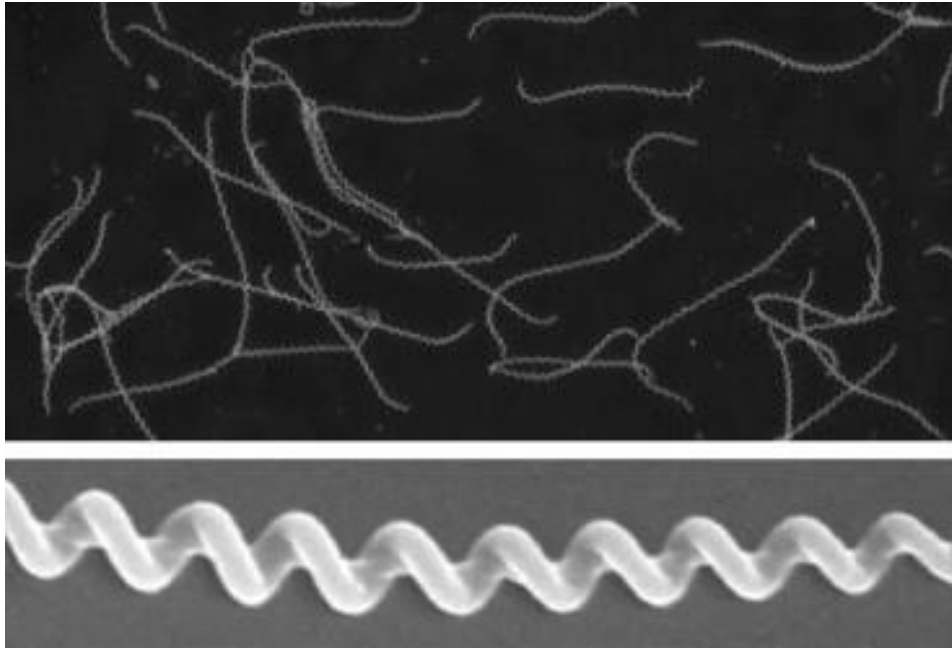
Η κινητικότητα της *Leptospira* (Εικ. 6) οφείλεται στην παρουσία περιπλασματικών μαστιγίων, τα οποία εκτείνονται από κάθε άκρο του βακτηριακού κυττάρου. Η διάσπαση του γονιδίου του μαστιγίου *flaB*, μέσω ενσωμάτωσης δείκτη κυναμικίνης στο σαπροφυτικό είδος *L. biflexa* με τη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού, οδηγεί σε απουσία σχηματισμού μαστιγίων και, κατ' επέκταση, σε πλήρη απώλεια της βακτηριακής κινητικότητας. Αντίστοιχα, μετάλλαξη στο γονίδιο *fliY* του παθογόνου *L. interrogans* είχε ως αποτέλεσμα εξασθενημένη περιστροφική

κίνηση τόσο σε υγρά όσο και σε ημιστερεά θρεπτικά μέσα. Επιπλέον, δεδομένα υποδεικνύουν ότι η λειτουργικότητα των μαστιγίων και η βακτηριακή κινητικότητα ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των λοιμώξεων από *Leptospira* (Evangelista & Coburn, 2010).



Εικόνα 6. Μοντέλο μετάβασης μορφής κινητικότητας της λεπτόσπειρας. Α) η κολύμβηση που προκαλείται από το σπειροειδές άκρο. Β) η προσκόλληση που οφείλεται στα αντιγόνα προσκόλλησης (Tahara et al., 2018)

Απαιτείται μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου ή αντίθεσης φάσης νωπού παρασκευάσματος για την απεικόνιση της λεπτόσπειρας καθώς τα βακτήρια χρωματίζονται ελάχιστα. Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία (Εικ. 7) παρατηρείται το σώμα του κυλινδρικού κυττάρου τυλιγμένο ελικοειδώς γύρω από τον άξονα, ο οποίος περιλαμβάνει δύο αξονικά νημάτια που εισάγονται υποδεέστερα στα άκρα του κυτταρικού σώματος, με τα ελεύθερα άκρα τους να κατευθύνονται προς τη μέση του κυττάρου. Ένα εξωτερικό περίβλημα περιβάλλει τον άξονα και τον πρωτοπλασματικό χώρο, ο οποίος οριοθετείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Bharti et al., 2003).



Εικόνα 7. Απεικόνιση λεπτόσπειρας από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Picardeau, 2013)

Το κυτταροπλασματικό νήμα θεωρείται ότι είναι μέρος του κυτταροσκελετού που επιτρέπει την κίνηση. Είναι προσκολλημένο στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης και συστέλλεται περιοδικά, προκαλώντας περιστροφή της σπείρας και συνεπώς κίνηση. Η εμφάνιση και η κινητικότητα της λεπτόσπειρας ποικίλει ανάλογα με το μέσο όπου αναπτύσσεται. Σε υγρό μέσο, τα κύτταρα εμφανίζονται με κλίση στο ένα ή και στα δύο άκρα ή άγκιστρα, ενώ υπάρχουν μικροί κόκκοι (1,5–2,0 μm σε διάμετρο) που περιέχουν υπολείμματα από κύτταρα λεπτόσπειρας. Τρεις είναι οι πιθανοί τρόποι κίνησης: περιστροφή γύρω από έναν κεντρικό άξονα, προοδευτική κίνηση προς την κατεύθυνση του ευθύ άκρου και κυκλική κίνηση. Σε ημιστερεό μέσο, η κίνηση γίνεται μέσω κάμψης (Bharti et al., 2003).

Το γονιδίωμα της λεπτόσπειρας αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα και είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με γονιδιώματα άλλων σπειροχαιτών, όπως για παράδειγμα *Treponema spp*, *Borrelia spp*, κάτι που υποδεικνύει την ικανότητά του να επιβιώνει σε διαφορετικά περιβάλλοντα, σε ζώα αλλά και ελεύθερα στο περιβάλλον (Cilia et al., 2021).

3. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Παρά το γεγονός ότι η λεπτοσπείρωση είναι μια γνωστή νόσος με παγκόσμια εξάπλωση, εξακολουθούν να υπάρχουν κενά στις πληροφορίες σχετικά με τη μετάδοσή της, καθώς και τους παράγοντες κινδύνου που οδηγούν σε αύξηση των περιστατικών. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι, ωστόσο, διαφέρουν ανάλογα με το οικολογικό περιβάλλον. Αυτοί οι παράγοντες σε μεγάλο ποσοστό φαίνεται να επηρεάζονται και από την κλιματική αλλαγή και τις καιρικές συνθήκες (Baharom et al., 2023; Lau et al., 2010).

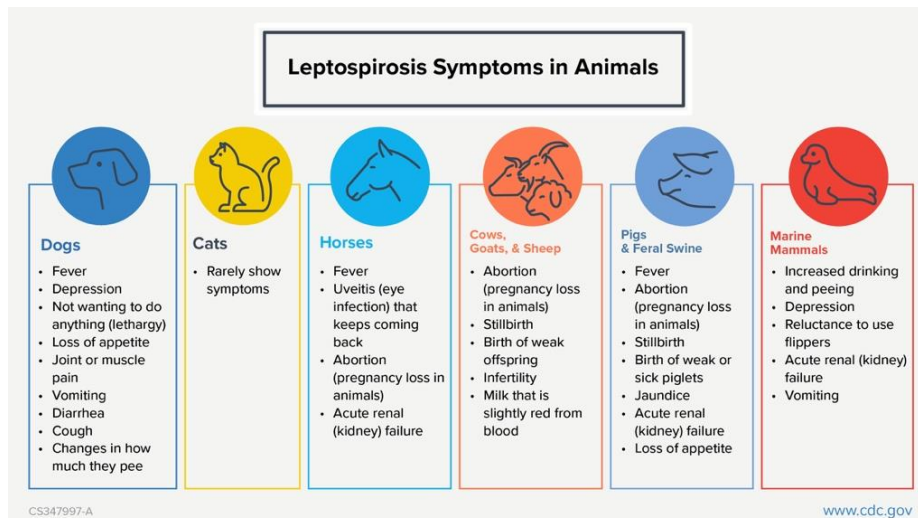
Οι λεπτόσπειρες, παθογόνες και μη, έχουν ανιχνευτεί σε παγκόσμιο επίπεδο και στο έδαφος. Η επαφή με το μολυσμένο έδαφος είναι μία από τις πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης. Η αύξηση των περιστατικών της λεπτοσπείρωσης συνήθως ακολουθεί συγκεκριμένα καιρικά φαινόμενα, όπως καταιγίδες, πλημμύρες και άλλα γεγονότα με έντονες βροχοπτώσεις, που έχουν καταγραφεί διεθνώς. Υψηλός κίνδυνος μετάδοσης σχετίζεται με τροπικές κλιματικές συνθήκες και γεγονότα ακόλουθα των βροχοπτώσεων, όπως τυφώνες, αλλά και επαφή με υγρό έδαφος και επιφανειακά ύδατα που έχουν μολυνθεί από θηλαστικά ή άλλα ζώα που αποβάλλουν λεπτόσπειρες (Bradley & Lockaby, 2023). Τα βακτήρια έχουν την δυνατότητα να προσκολλώνται στα σωματίδια του εδάφους, χαρακτηριστικό που τους επιτρέπει την παραμονή τους σε ρεύματα νερού. Ερευνητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η μετάδοση της *Leptospira* πραγματοποιείται μέσω επαφής με μολυσμένα ούρα, είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω επαφής με χώμα ή νερό που έχουν επιμολυνθεί με τα ούρα αυτά. Η παθογόνος λεπτόσπειρα απεκκρίνεται στο περιβάλλον μέσω της ούρησης μολυσμένων ξενιστών, αποτελώντας έτσι πηγή μετάδοσης για τον άνθρωπο και άλλα ζώα (Brabb et al., 2012).

Η οικολογία της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνει τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανθρώπων, ζώων, λεπτοσπειρών και του περιβάλλοντος στο οποίο συνυπάρχουν. Τα επιδημιολογικά πρότυπα διαφέρουν ανάλογα με το περιβάλλον. Σε αγροτικές περιοχές για παράδειγμα, η μετάδοση της νόσου σχετίζεται συνήθως με την γεωργία και την κτηνοτροφία, με τον κίνδυνο να αυξάνεται κατά τους θερμούς και βροχερούς μήνες. Σε αστικές περιοχές, η μόλυνση φαίνεται να συνδέεται με τον συνωστισμό, τις ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής και την οικονομική εξαθλίωση στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αντιθέτως, στις ανεπτυγμένες χώρες φαίνεται να συνδέεται με

τα διεθνή ταξίδια, αλλά και τις δραστηριότητες σε εξωτερικούς χώρους αναψυχής (Baharom et al., 2023; Lau et al., 2010).

Οι λεπτόσπειρες είναι πολύ ευαίσθητες στην ξηρασία και σε όξινο pH, υπάρχουν όμως και παθογόνα είδη που μπορούν να επιβιώσουν στο νερό για αρκετές εβδομάδες (Picardeau, 2013). Σε μελέτη που διεξήχθη κατά την περίοδο Ιούνιο 1965 μέχρι Νοέμβρη 1996, απομονώθηκαν μη παθογόνες λεπτόσπειρες από κολυμβητικούς χώρους. Το pH του νερού κυμαινόταν από 6.9 – 8.7 και στο χώμα από 7.0 – 8.6. Αυτό το εύρος pH φαίνεται να επαρκεί για την διατήρηση και επιβίωση της λεπτόσπειρας (Diesch et al., 1970).

Οι λεπτόσπειρες μολύνουν ποικιλία θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των ποντικών, των αρουραίων, των σαρκοφάγων και των μηρυκαστικών (Εικ.8) (Ko et al., 2009; Levett, 2001). Επιβεβαιωμένη και οριστική ταυτοποίηση έγινε σε 7 είδη άγριων θηλαστικών, ωστόσο βάσει των θετικών ορολογικών αποτελεσμάτων σε χελώνες, ψάρια και μη ταυτοποιημένων λεπτοσπειρών που απομονώθηκαν από βατράχους, φαίνεται να υπάρχει ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο οικολογικό, αλλά κοινό περιβάλλον στην λεπτοσπείρωση, αποδεικνύοντας έτσι ότι και οι κατώτερες μορφές ζωής έχουν συμβάλει στην οικολογία της. Μέσω των μη αναμενόμενων σχέσεων μεταξύ άγριων ζώων με τα οικόσιτα ζώα φαίνεται να μεταδόθηκε η λεπτοσπείρωση μεταξύ των ειδών, με τους ορότυπους *ballum* και *grippotyphosa* να μεταδίνονται από τα πρώτα στα δεύτερα. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι μέσω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στο περιβάλλον, μεταδόθηκαν και στον άνθρωπο οι λεπτόσπειρες. Η μετάδοση μεταξύ των ειδών δεν είναι απίθανη στα οικολογικά περιβάλλοντα όπου κάποιο από τα ζωικά είδη που συνυπάρχουν ή έρχονται τυχαία σε επαφή μεταξύ τους, είναι μολυσμένο. Ο ρόλος ωστόσο των άγριων ζώων στην διάδοση της νόσου είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, ειδικά σε περιπτώσεις ξαφνικής αύξησης της νόσου στους ανθρώπους (Diesch et al., 1970).

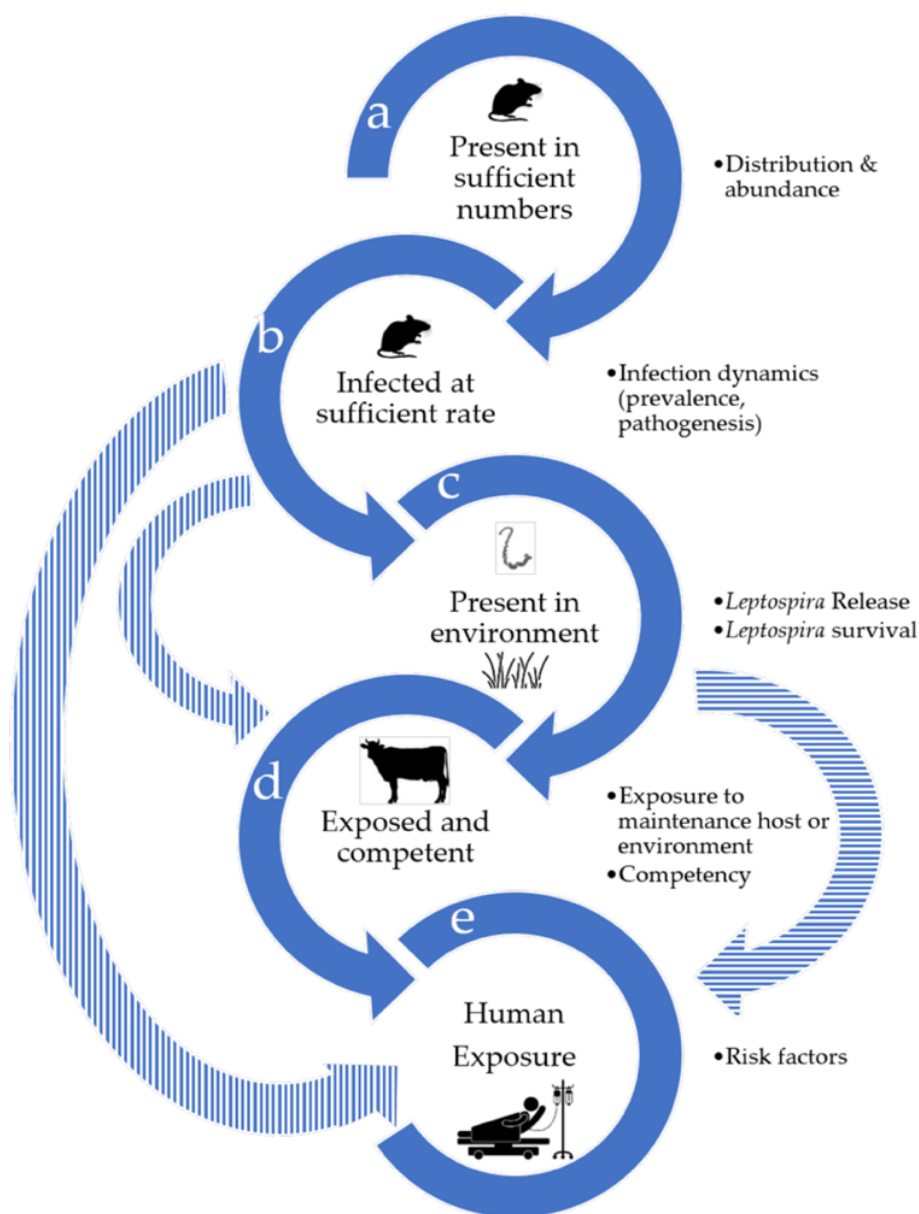


Εικόνα 8. Συμπτώματα της νόσου σε διάφορα είδη ζώων (www.cdc.gov)

Τα περισσότερα θηλαστικά, τόσο άγρια όσο και οικόσιτα, είναι φορείς της νόσου. Ωστόσο, δεν ανήκουν όλα στους φορείς-δεξαμενές του παθογόνου, καθώς μόνο λίγα από αυτά συμβάλλουν στη διατήρηση και δημιουργία περιβαλλοντικών εστιών της νόσου (Barragan et al., 2017). Από την άλλη, δεν υπάρχει απόδειξη ότι οι ορότυποι *ballum* και *grippityphosa* έχουν απομονωθεί σε περιβάλλοντα νερού τα οποία χρησιμοποιούνται από ανθρώπους και ζώα. Ο ορότυπος *grippityphosa* ωστόσο είχε απομονωθεί από άγρια θηλαστικά και βοοειδή (Diesch et al., 1970).

Η λεπτοσπείρωση αποτελεί μία λοιμώδη νόσο, της οποίας η μετάδοση στηρίζεται κυρίως σε έναν συνεχόμενο κύκλο μεταξύ μολυσμένων ζώων-ξενιστών (Εικ. 9). Ωστόσο, αυξανόμενα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι λεπτόσπειρες είναι ικανές να επιβιώνουν για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον, διατηρώντας υψηλή βιωσιμότητα υπό κατάλληλες συνθήκες, αποτελώντας έτσι πιθανές πηγές μετάδοσης (Ko et al., 2009). Αυτό το γεγονός είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς αυξάνει την δυνατότητα του παθογόνου να μεταδοθεί, αλλά και την επιβίωσή του, αφού διατηρεί την ανθεκτικότητά του στο περιβάλλον. Σύμφωνα με μελέτες, το υδάτινο στοιχείο φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη διατήρησή τους. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν μέσα σε υγρό περιβάλλον και να αντέχουν σε μεγάλο εύρος δυσμενών συνθηκών. Αυτό πιθανώς οφείλεται στη δημιουργία μίας βιομεμβράνης (biofilm), η οποία δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την επιβίωσή τους. Οι παθογόνες λεπτόσπειρες είναι ικανές να επιβιώσουν σε βιομεμβράνες στο φυσικό περιβάλλον (ακόμη και σε περιβάλλοντα χωρίς θρεπτικά συστατικά) και η αντοχή τους στα αντιβιοτικά μπορεί να αυξηθεί κατά 5 φορές,

ενισχύοντας τελικά τους ρυθμούς μετάδοσής τους (Bradley & Lockaby, 2023). Τελικά, τα βακτήρια μπορούν να επιβιώνουν σε νερό και υγρά εδάφη για εβδομάδες έως και μήνες και σε αυτό συμβάλει η κυτταρική συσσωμάτωση και οι βιομεμβράνες, τα οποία προστατεύουν τις λεπτόσπειρες σε περιβάλλοντα έξω από τους ξενιστές τους (Ko et al., 2009).



Εικόνα 9. Αλυσίδα μετάδοσης που καταλήγει στον άνθρωπο (Moinet et al., 2021)

Ο επίμονος αποικισμός στα νεφρικά σωληνάρια των ζώων-φορέων διατηρεί το βακτήριο της λεπτόσπειρας, το οποίο αποβάλλεται με τα ούρα του ζώου ακόμα και όταν το μολυσμένο ζώο δεν παρουσιάζει συμπτώματα. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχτεί αν

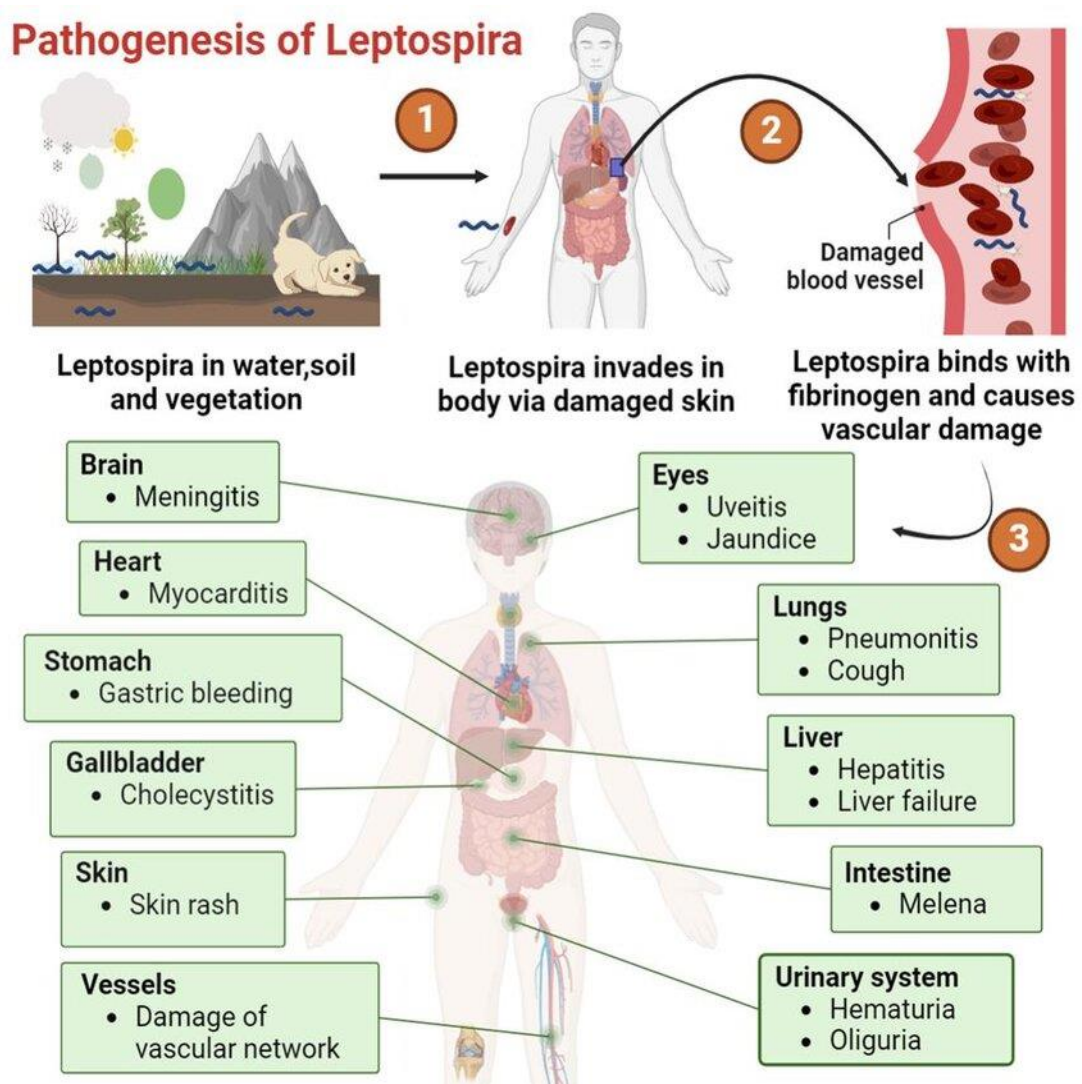
ο άνθρωπος ανήκει στις σημαντικές επιδημιολογικές πηγές μετάδοσης, αν και αποβάλλει λεπτόσπειρες μέσω των ούρων για εβδομάδες, σπανιότερα για μήνες ή και για χρόνο. Η επικράτηση διαφορετικών ορότυπων λεπτόσπειρας εξαρτάται τόσο από τα ζώα-δεξαμενές που υπάρχουν, τους ορότυπους που φέρουν, όσο και από τις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες, τις επαγγελματικές δραστηριότητες, τις αγροτικές και γεωργικές πρακτικές (Bharti et al., 2003).

Ο κίνδυνος μόλυνσης του ανθρώπου φαίνεται να επηρεάζεται και από το ποσό των βακτηρίων που απεκκρίνονται στο περιβάλλον. Σε αυτό φαίνεται να συνεισφέρει και το σωματικό βάρος του ξενιστή, όπου το μεγαλύτερο βάρος συσχετίστηκε ιδιαίτερα με το φορτίο λεπτόσπειρας στα νεφρά. Άλλες μεταβλητές που φαίνονται να επηρεάζουν είναι ο όγκος των ούρων, η επικράτηση μεταξύ των ξενιστών αλλά και η τοπική αριθμητική παρουσία κάθε ξενιστή (Barragan et al., 2017).

Τέλος οι λεπτόσπειρες είναι ικανές να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Με τις υψηλές θερμοκρασίες μειώνεται το ποσό των επιφανειακών υδάτων μέσω της εξάτμισης, αλλά ταυτόχρονα αυξάνεται η ζήτηση στις δραστηριότητες που σχετίζονται με το νερό, τόσο από τον άνθρωπο όσο και από τα ζώα (Lau et al., 2010).

4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Οι λεπτόσπειρες εισέρχονται στο σώμα μετά από έκθεση στο περιβάλλον ή από άμεση επαφή με μολυσμένο ζώο, είτε από κατάποση μολυσμένου νερού. Συστηματική λοίμωξη μπορεί να εγκατασταθεί μετά την είσοδο των μικροβίων μέσω ανοιχτών πληγών, μικρών αμυχών ή διαμέσου των βλεννογόνων (Εικ.10) (Samrot et al., 2021). Στη συνέχεια εισέρχονται στην κυκλοφορία και εξαπλώνονται σε όλο τον οργανισμό, ακόμα και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) αλλά και τους οφθαλμούς, με την φάση της βακτηριαιμίας να διαρκεί 7 ημέρες. Τα βακτήρια έχουν ταχεία εξάπλωση, ενώ πολλαπλασιάζονται στο αίμα και τους ιστούς (Adler & de la Peña Moctezuma., 2010).



Εικόνα 10. Παθογένεια της λεπτόσπειρας (Akhtar et al., 2024)

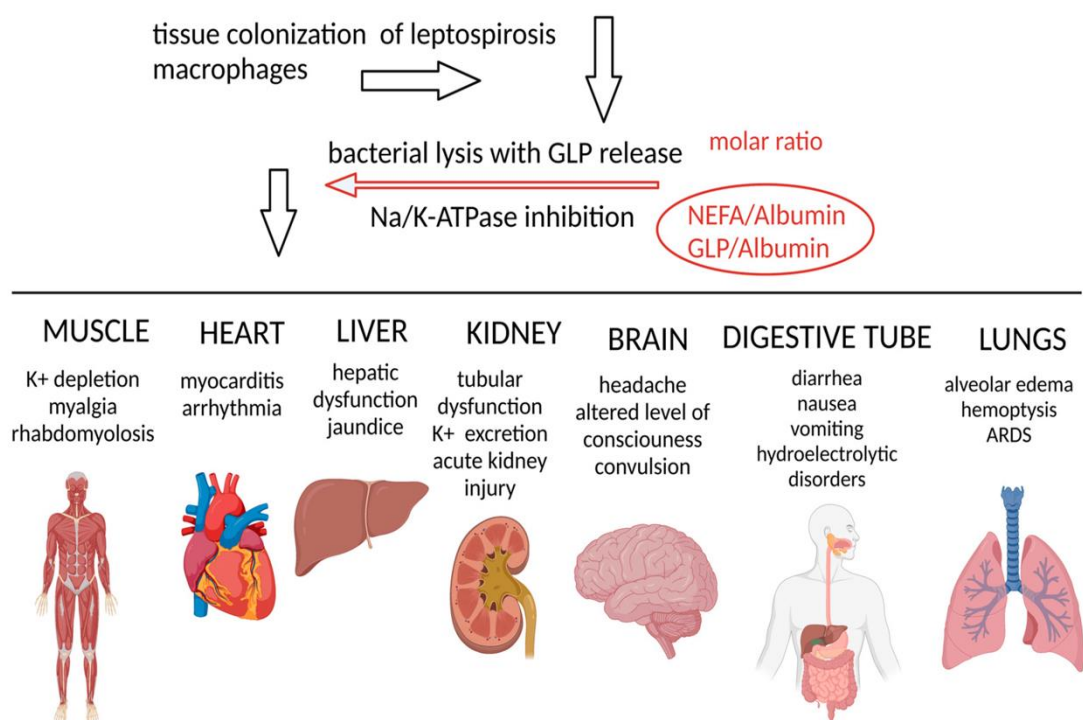
Η περίοδος επώασης είναι 7-14 μέρες, η έναρξη της νόσου στον άνθρωπο μετά την έκθεση στο παθογόνο κυμαίνεται από μία μέρα μέχρι 4 βδομάδες και μπορεί να διαρκεί έως και μήνες (Waggoner & Pinsky, 2017).

Οι λεπτόσπειρες έχουν αναπτύξει ποικιλία στρατηγικών για την αποφυγή της άμυνας και της ανοσολογικής αναγνώρισής τους από τον οργανισμό που προσβάλλουν, ενώ η κίνηση «τιρμπουσόν» τις βοηθάει να εισβάλλουν στους ιστούς, όπως για παράδειγμα διαμέσου των αγγειακών τοιχωμάτων. Μεταναστεύουν από τον αγγειακό χώρο δεσμεύοντας ενδοθηλιακές καντχερίνες και αποδυναμώνοντας τους φραγμούς των ενδοθηλιακών κυττάρων (Sykes et al., 2023).

Η λεπτόσπειρα φαίνεται ότι προσκολλάται σε διάφορους τύπους κυττάρων, με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος που βρίσκονται μεταξύ βακτηρίου και κυττάρου-ξενιστή να έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεσή της. Αλλαγές στο κυτταρικό τοίχωμα θα επιφέρουν αλλαγές και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών (Xue et al., 2009). Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί πιθανοί παράγοντες λοιμογονικότητας που μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένειά της, συμπεριλαμβανόμενων του LPS, των αιμολυσινών, που λύουν ερυθροκύτταρα και άλλες κυτταρικές μεμβράνες, των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης καθώς και άλλων μορίων προσκόλλησης. Η προσκόλληση της λεπτόσπειρας στους ιστούς του ξενιστή αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την μόλυνση και την έκφραση της παθογονικότητάς της (Evangelista & Coburn, 2010). Όταν ο αριθμός των λεπτοσπειρών φτάσει σε κρίσιμο επίπεδο, εμφανίζονται βλάβες λόγω των τοξινών και των ενζύμων που παράγουν, τα οποία οδηγούν στην εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Τα συμπτώματα στις περισσότερες περιπτώσεις ομοιάζουν με αυτά της συστηματικής λοίμωξης (Εικ. 11) με υψηλό πυρετό, μυαλγίες, πόνο στους οφθαλμούς, επιπεφυκίτιδα, κλπ. Ωστόσο υπάρχουν και περιστατικά πιο σοβαρά που παρουσιάζουν σημεία σήψης, σηπτικό shock, ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια, δυσλειτουργίες και σε άλλα όργανα, με την εμφάνιση πνευμονικής αιμορραγίας, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν μέχρι και στον θάνατο (Chancharoenthana et al., 2022; Marinho & Cardoso, 2015). Η πιο σημαντική βλάβη είναι η καταστροφή του ενδοθηλίου μικρών αιμοφόρων αγγείων που οδηγεί σε ισχαιμία πολλών οργάνων, με νεφροσωληναριακή νέκρωση, ηπατοκυτταρική και πνευμονική βλάβη, μηνιγγίτιδα κ.α. (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

PHYSIOPATHOLOGICAL HYPOTHESIS



Εικόνα 11. Η λοίμωξη από λεπτόσπείρα μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία πολλών οργάνων

(Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2023)

Η βλάβη των ιστών μπορεί να είναι σοβαρή, υπάρχει πιθανότητα όμως να είναι αναστρέψιμη ακόμα και να αποκατασταθεί πλήρως, αν και οι βλάβες μετά από μεγάλης διάρκειας νόσο μπορεί να είναι περίπλοκες (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Η παθογένεια της δυσλειτουργίας των οργάνων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί ωστόσο φαίνεται να έχει σχέση με το φορτίο της λεπτόσπειρας, αλλά σχετίζεται επίσης και με την δράση κυτταροτοξικών παραγόντων στον ιστό, ιδιαίτερα στο ήπαρ και τα νεφρά καθώς και στο ανοσοποιητικό του ασθενή και στους πνεύμονες. Έχει περιγραφεί μια ανοσολογική βάση της παθογένειας της λεπτοσπείρωσης που περιλαμβάνει τον υποδοχέα TLR (Toll-like Receptor). Ο TLR2 έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση πνευμονικών και νεφρικών εκδηλώσεων της νόσου (Khan et al., 2015). Η λιποπρωτεΐνη της λεπτόσπειρας LipL32 πυροδοτεί μια φλεγμονώδη απόκριση στα κύτταρα των εγγύς νεφρικών σωληναρίων από την ενεργοποίηση του TLR2, επομένως και του NF-κΒ (πρωτεΐνη/μεταγραφικός παράγοντας που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA) καθώς και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (Yang, 2007). Ο TLR φαίνεται να εμπλέκεται και στην μυοκαρδίτιδα, τη σηψαιμία και πιθανά

και στην παθογένεση της οξείας παγκρεατίτιδας (Zhang et al., 2010). Η παγκρεατίτιδα είναι σπάνια, εντούτοις το πάγκρεας προσβάλλεται σχετικά συχνά κατά τη λεπτοσπείρωση. Παρόλ'αυτά, λόγω της έντονης και σημαντικής δυσλειτουργίας των άλλων οργάνων, η συμμετοχή του συνήθως υποεκτιμάται. Λόγω αυτών των πολυοργανικών δυσλειτουργιών είναι δύσκολο να αναγνωριστεί κάθε μια από τις επιπλοκές. Σε ενδημικές περιοχές όπου παρουσιάζεται η νόσος, θα πρέπει να συνεκτιμάται η πιθανότητα εμφάνισης οξείας παγκρεατίτιδας και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις με ανικτερική λεπτοσπείρωση (Yang, 2007).

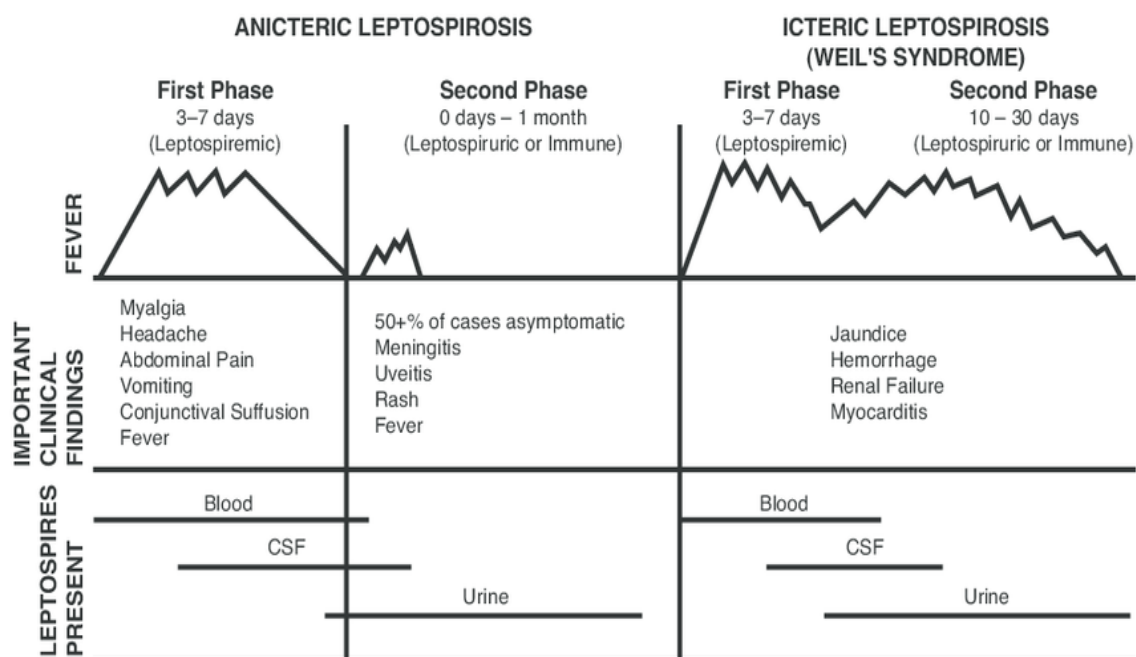
Οι λεπτόσπειρες διαθέτουν μια τάξη επαναλαμβανόμενων αντιγονικών μορίων, υψηλού μοριακού βάρους που ομοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες. Αυτές ονομάζονται οικογένεια πρωτεϊνών Lig. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τρία μέλη LigA, LigB, LigC. Η κύρια λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών σχετίζεται με την αλληλεπίδραση του παθογόνου βακτηρίου και του ξενιστή, με αναφορές που έδειξαν ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη της λεπτόσπειρας Lig αλληλεπιδρά με ECM (Extracellular matrix) πρωτεΐνες, όπως ινοδωγόνο, κολλαγόνο, λαμινίνη κλπ. Έτσι οι πρωτεΐνες αυτές θεωρήθηκαν λοιμογόνοι παράγοντες της νόσου. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι όσο μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης των LigA και LigB, τόσο επηρεάζεται και η λοιμογόνος δράση, γεγονός που υποδεικνύει τον αθροιστικό τους ρόλο στην παθογένεση (Cullen et al., 2003).

Επιπλέον, η ανάλυση του γονιδίου LipL21 αποκάλυψε την παρουσία του αποκλειστικά σε παθογόνους τύπους λεπτοσπειρών και όχι σε μη παθογόνους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντίστοιχη πρωτεΐνη συνιστά πιθανό λοιμογόνο παράγοντα (Cullen et al., 2003). Περαιτέρω γονίδια που συσχετίζονται με τη λοιμογονικότητα περιλαμβάνουν εκείνα που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Loa22 και LipL71 (Zhang et al., 2010). Η Loa22 αναγνωρίστηκε ως ο πρώτος επιβεβαιωμένος λοιμογόνος παράγοντας μέσω πειραμάτων γενετικής απενεργοποίησης γονιδίων (*gene knockouts*) (Hsu & Yang, 2022). Αντίστοιχα, η LipL71, λιποπρωτεΐνη με μοριακή μάζα 71 kDa, παρουσιάζει παλμιτυλοποίηση που επιτρέπει την αγκίστρωσή της τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μεμβράνη της λεπτόσπειρας. Η πρωτεΐνη αυτή, γνωστή και ως LruA, ταυτοποιήθηκε αρχικά σε περιπτώσεις υποτροπιάζουσας ραγοειδίτιδας και δεν ανιχνεύθηκε σε μη παθογόνους ορότυπους του γένους *Leptospira* (Hsu & Yang, 2022; Cullen et al., 2003).

5. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η λεπτοσπείρωση είναι μια μολυσματική ασθένεια με παγκόσμια εξάπλωση που προκαλείται από το είδος *L. interrogans*, στο οποίο έχουν αναγνωριστεί 200 ορότυποι (WHO, 2003).

Παλαιότερα θεωρούνταν ότι τα διακριτά κλινικά σύνδρομα σχετιζόταν με συγκεκριμένους ορότυπους, γεγονός που αμφισβητήθηκε και διαψεύστηκε σύμφωνα με μία μεγάλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια 30 ετών (Levett, 2001). Μόνο το 10% των περιπτώσεων εμφανίζουν σοβαρή νόσηση, ενώ όλες οι υπόλοιπες είναι υποκλινικές και ήπιες ανικτερικές λοιμώξεις. Εμφανίζουν ποικιλία συμπτωμάτων με μεγάλο εύρος, από ήπια συμπτώματα μέχρι και ανεπάρκεια σε πολλά όργανα, η οποία καταλήγει σε θάνατο (Selvarajah et al., 2021). Οι σημαντικότερες εκδηλώσεις της νόσου οφείλονται στην βλάβη του τριχοειδικού ενδοθηλίου (αγγειίτιδα). Η νόσος παρουσιάζει δυο φάσεις, με πρώτη φάση τον πολλαπλασιασμό της λεπτοσπείρας στο αίμα και στα όργανα και τη δεύτερη που αφορά την απέκκρισή της στα ούρα και την αλληλεπίδρασή της με την ανοσοαπόκριση (Εικ. 12). Η σοβαρή μορφή λεπτοσπείρωσης ή αλλιώς νόσος Weil έχει ποσοστό θνησιμότητας 20% (Costa et al., 2015).



Εικόνα 12. Φάσεις της λεπτοσπείρωσης (Levett, 2001)

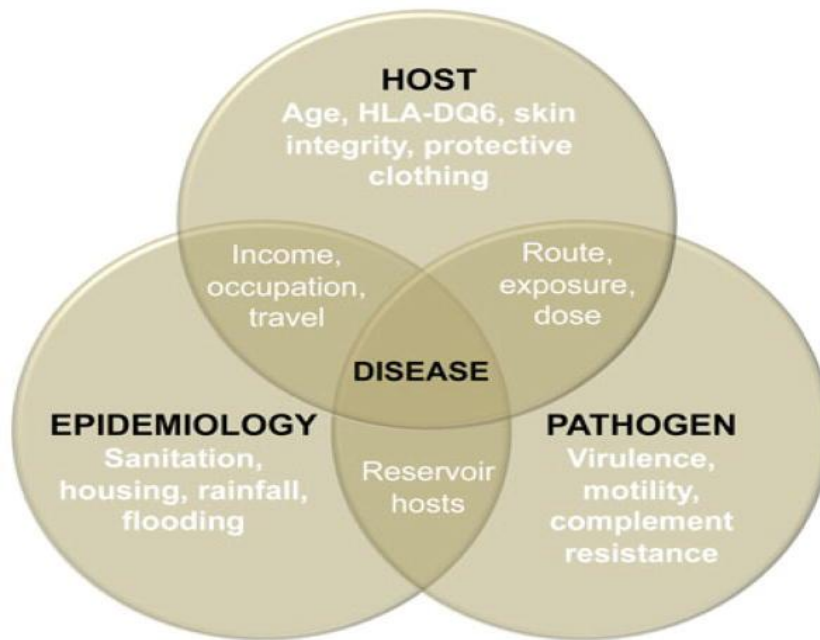
Η λεπτοσπείρωση χαρακτηρίζεται από εμφάνιση αγγειίτιδας, βλάβη ενδοθηλίου και φλεγμονώδη διήθηση (Kaya et al., 2005). Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν υψηλό πυρετό και ρίγος καθώς και κεφαλαλγίες, οι οποίες μπορεί να είναι σοβαρές. Επιπλέον υπάρχει πιθανότητα να συνοδεύονται από μυαλγίες, συνήθως στη γαστροκνημία και το κάτω μέρος της ράχης, κοιλιακό άλγος, ναυτία και έμετο αλλά και αναπνευστικά προβλήματα (Waggoner & Pinsky, 2017).

Η σοβαρότητα της λοίμωξης εξαρτάται κυρίως από τον ορότυπο αλλά ιδιαίτερη σημασία έχουν και τα υποκείμενα νοσήματα και η κατάσταση υγείας του ασθενή (π.χ. ανοσοκατασταλμένοι, ηλικιωμένοι και ευπαθείς ομάδες) (Bisias et al., 2017). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ασθενείς με λεπτοσπείρωση είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν επιμολύνσεις με άλλα παθογόνα, γεγονός που ενδέχεται να περιπλέξει τη θεραπευτική αντιμετώπιση και να αυξήσει τον κίνδυνο για σοβαρές επιπλοκές, τόσο σε ατομικό επίπεδο όσο και για τη δημόσια υγεία (Kumari et al., 2024).

5.1. Παράγοντες και ομάδες κινδύνου

Η έκθεση στον παθογόνο παράγοντα εξαρτάται από τυχαίες επαφές μεταξύ ανθρώπων και μολυσμένων ζώων ή από μολυσμένο περιβάλλον (Εικ. 13). Οι άνθρωποι θεωρούνται τυχαίοι ξενιστές καθώς μπορούν να μολυνθούν και να νοσήσουν, χωρίς όμως να αποτελούν φορείς λεπτοσπειρών, οπότε φαίνεται να μην συμβάλλουν στην μετάδοσή τους (Ko et al., 2009). Η κύρια πηγή μετάδοσης είναι τα τρωκτικά και κυρίως ο αρουραίος, στον οποίο η μόλυνση εμφανίζεται ως χρόνια ασυμπτωματική, με αποικισμό των λεπτοσπειρών στα νεφρικά τους σωληνάρια. Σε άλλα ζώα η μόλυνση μπορεί να προκαλέσει διαταραχές της αναπαραγωγής. Οι ορότυποι συνδέονται με συγκεκριμένα είδη ζώων, όπως για παράδειγμα οι αρουραίοι, οι οποίοι αποτελούν πηγή μόλυνσης συνήθως με τον ορότυπο *icterohaemorrhagiae*, ενώ οι σκύλοι φέρουν τον ορότυπο *canicola* (Picardeau, 2013).

Η αύξηση της λεπτοσπείρωσης οφείλεται κυρίως στην κλιματική αλλαγή, στις μεταναστεύσεις, ιδιαίτερα σε ταξιδιώτες που επιστρέφουν από τροπικές χώρες, στον υπερπληθυσμό, στην κακή ή ανεπαρκή διαχείριση των απορριμμάτων και των στερεών αποβλήτων και στην αύξηση του πληθυσμού των τρωκτικών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την επανεμφάνιση της νόσου στη Νέα Υόρκη (Arboleda et al., 2023).



Εικόνα 13. Οι τρεις κατηγορίες παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. (Haake & Levett, 2015)

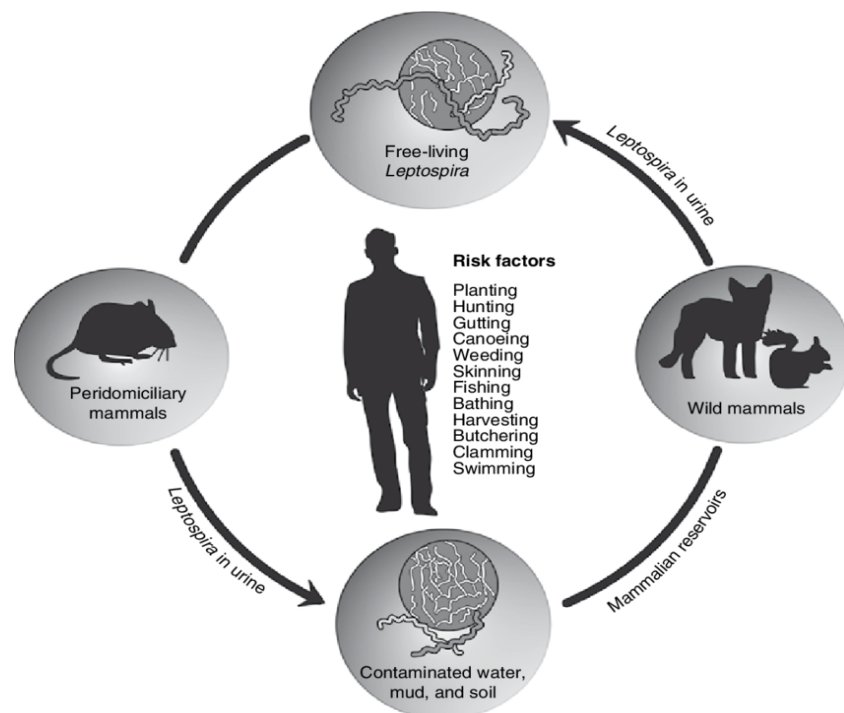
Πολλές ονομασίες της λεπτοσπείρωσης συνδέονται με τις συνθήκες μετάδοσης (π.χ. πυρετός του ρυζιού). Ο βαθμός καθώς και η φύση της έκθεσης στο βακτήριο συχνά εξαρτώνται από το επάγγελμα, τις κοινωνικές δραστηριότητες καθώς και τις δραστηριότητες αναψυχής (WHO, 2003). Από 19 ερευνητικές μελέτες που διεξήχθησαν για τη συσχέτιση της λεπτοσπείρωσης με δραστηριότητες επαφής με το στάσιμο νερό και ιδιαίτερα με την κολύμβηση, οι 17 έδειξαν ότι η κολύμβηση αυξάνει τον κίνδυνο της μόλυνσης με αναλογίες ORs που κυμαινόταν από 1.5 έως 87.0. Το ψάρεμα αποδείχθηκε σε 11 από αυτές τις μελέτες ότι σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο (Mwachui et al., 2015).

Η επαγγελματική ενασχόληση, οι μεταναστεύσεις, το γένος και η ηλικία έχουν ιδιαίτερη σημασία ως παράγοντες κινδύνου. Στο παρελθόν, η λεπτοσπείρωση συνδέθηκε με συγκεκριμένα επαγγέλματα, όπως οι ανθρακωρύχοι, οι οποίοι ήταν οι πρώτοι που καταγράφηκαν. Παρόλ'αυτά, έχει αποδειχθεί ότι μία ποικιλία θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των άγριων, εκτρεφόμενων και κατοικίδιων ζώων, φέρουν και διασπείρουν τις υπεύθυνες για τη νόσο λεπτόσπειρες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνονται οι κίνδυνοι έκθεσης και σε άλλες επαγγελματικές ομάδες, όπως αγρότες, κτηνοτρόφοι, εκδοροσφαγείς, κτηνίατροι, έμποροι κατοικίδιων ζώων, εργάτες αποχετευτικού δικτύου καθώς και επαγγέλματα που έχουν άμεση σχέση με διάφορα ζώα (Samrot et al., 2021).

Υπάρχει διαφορά στα ποσοστά μόλυνσης με λεπτοσπείρωση μεταξύ των δύο φύλων, καθώς τα αρρένα άτομα παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά συγκριτικά με τα θήλεα. Αυτό ίσως να οφείλεται στην επαγγελματική τους δραστηριότητα και στην μεγαλύτερη έκθεσή τους στο περιβάλλον. Διαφορές επίσης στα ποσοστά παρατηρούνται και σε διαφορετικές ηλικίες, αφού νεότεροι και μέσης ηλικίας άντρες παρουσιάζουν μεγαλύτερο επιπολασμό της νόσου συγκριτικά με ηλικιωμένους άντρες (WHO, 2003). Τέλος, η λεπτοσπείρωση θεωρείται νόσος της υπαίθρου αλλά την συναντάμε και στο αστικό περιβάλλον, όπου εξαρτάται από τις συνθήκες υγιεινής, τόσο εντός όσο και εκτός της οικίας (Mwachui et al., 2015).

Συμπερασματικά, οι παράγοντες κινδύνου (Εικ. 14) για λεπτοσπείρωση ταξινομούνται σε 7 κατηγορίες σχετιζόμενοι με:

- 1) Το υδάτινο στοιχείο
- 2) Τη γεωπονία
- 3) Περιβαλλοντικούς παράγοντες
- 4) Κοινωνικοοικονομικούς παράγοντες
- 5) Συνθήκες υγιεινής
- 6) Ανθρώπινη συμπεριφορά και δραστηριοποίηση
- 7) Τα ζώα (Mwachui et al., 2015).



Εικόνα 14. Μετάδοση λεπτόσπειρας και παράγοντες κινδύνου (Bisen & Raghuvarshi, 2013)

5.2. Κλινικές Μορφές Νόσου

5.2.1. Ανικτερική λεπτοσπείρωση

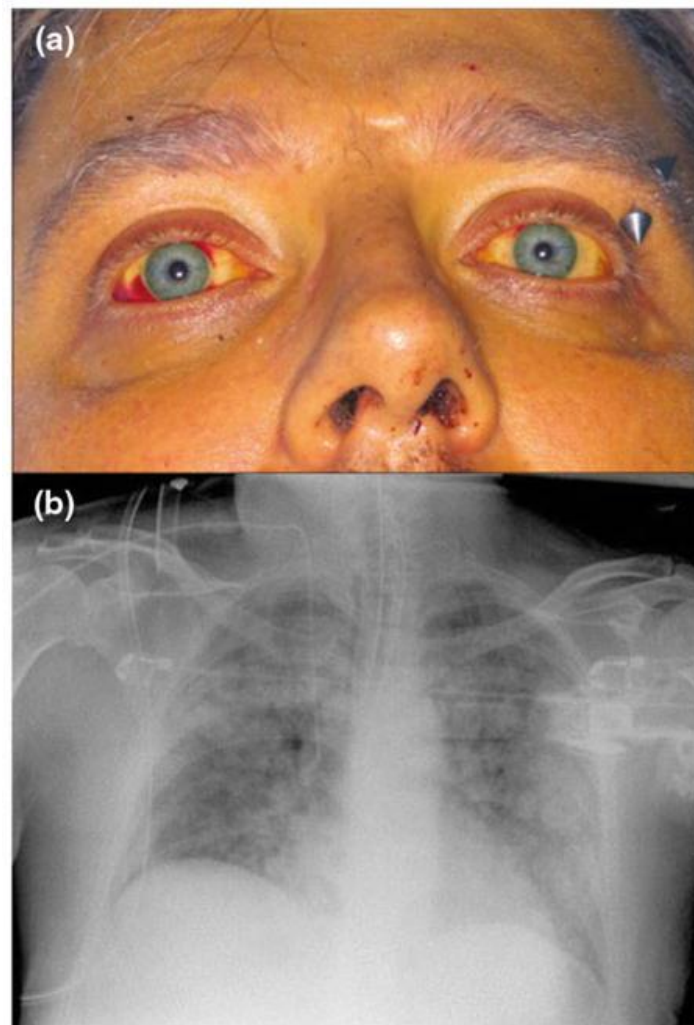
Πρόκειται για μία διφασική ήπια λοίμωξη, η πρόωμη φάση των εκδηλώσεων της λεπτοσπείρωσης που διαρκεί 3 με 7 ημέρες, στην οποία έχουν παρατηρηθεί πυρετός, πονοκέφαλοι, μυαλγία/αρθραλγία, ναυτία, έμετοι, δυσφορία και υπεραιμία του επιπεφυκότα (Εικ.15). Το 90% των περιστατικών λεπτοσπείρωσης σύμφωνα με μελέτες αλλά και με επιδημιολογικά δεδομένα ανήκουν στην ανικτερική μορφή (Seguro & Andrade, 2013).

Symptoms	Patients (%)
Anicteric presentation	
Fever	100
Myalgia	46
Headache	48
Rash	19
Arthritis/arthralgia	6
Icteric presentation	
Jaundice	49
Hepatomegaly	36
Splenomegaly	21
Hemorrhage of any kind	27
Others	
Renal involvement	30
Pulmonary involvement	11
Neurological involvement	16
Cardiovascular involvement	2

Εικόνα 15. Τα συμπτώματα της λεπτοσπείρωσης (Agrawal, 2018)

Επηρεάζει κυρίως τους νεφρούς και το ήπαρ, αλλά και διάφορα άλλα όργανα όπως τους πνεύμονες, την καρδιά, τη χοληδόχο κύστη, τον εγκέφαλο και τους οφθαλμούς. Ιδιαίτερα σπάνια είναι η περίπτωση νεκρωτικής παγκρεατίτιδας (Khan et al., 2015). Στις περισσότερες από τις μελέτες φάνηκε ότι το 66% των ασθενών παρουσιάζει διαταραχές από το ουροποιητικό, όπως αιματουρία και πρωτεϊνουρία, ενώ η οξεία νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί δείκτη κακής προγνωστικής αξίας (Turhan et al.,

2005). Επιπρόσθετα, το 20% με 70% των ασθενών παρουσιάζουν συμπτώματα από τους πνεύμονες (Εικ. 16), ποσοστό με αυξητική τάση τα τελευταία χρόνια. Σημαντικά συμπτώματα που σχετίζονται με τους πνεύμονες είναι πόνος στο στήθος, βήχας, δύσπνοια, αιμόπτυση, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) (Assimakopoulos et al., 2012). Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την κύηση καθώς επηρεάζει και την μητέρα αλλά και το έμβρυο. Μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε αποβολές, γεννήσεις νεκρών εμβρύων ή νοσούντων νεογέννητων (Selvarajah et al., 2021). Κατά τη φάση αυτή μπορούν να απομονωθούν λεπτόσπειρες από το αίμα (λεπτοσπειραιμική φάση), ενώ μετά την πάροδο αυτής της φάσης, το ποσοστό των ασθενών που δεν παρουσιάζει συμπτώματα φτάνει το 80-90% (Seguro & Andrade, 2013).



Εικόνα 16. Συμπτώματα ανικτερικής μορφής (Haake & Levett, 2015)

5.2.2. Νόσος Weil (Ικτερική μορφή)

Η νόσος Weil είναι η δεύτερη μορφή (κλινικό σύνδρομο) της λεπτοσπείρωσης. Αποτελεί το 10% των περιπτώσεων και είναι η σοβαρή μορφή λεπτοσπείρωσης, η οποία έχει υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, με περίπου 60.000 θανάτους ετησίως. Διαρκεί από 4 έως 30 ημέρες, και χαρακτηρίζεται από ίκτερο, ηπατική δυσλειτουργία που συχνά συνοδεύεται με νεφρική ανεπάρκεια και αιμορραγίες. Ιδιαίτερη σημασία έχει η γρήγορη διάγνωση της νόσου καθώς και η εντατική ιατρική φροντίδα του ασθενούς (Petakh et al., 2022).

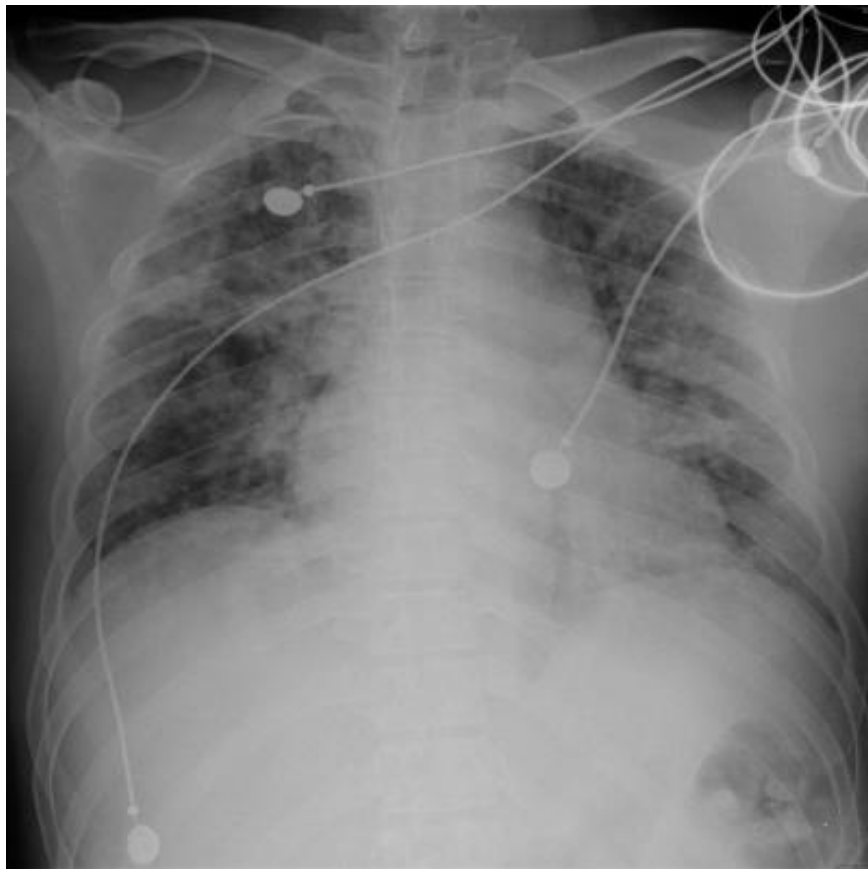
Η εξέλιξη της ήπιας μορφής λεπτοσπείρωσης σε σοβαρή κλινική οντότητα, όπως η νόσος Weil, ενδέχεται να συνοδεύεται από κυκλοφορική καταπληξία και να επιπλέκεται με την εμφάνιση συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Η λεπτοσπείρωση προκαλεί διάχυτη πνευμονική βλάβη με αποτέλεσμα την διαταραχή ανταλλαγής αερίων και κατ' επέκταση την ανάγκη για μηχανική υποστήριξη (Haake & Levett, 2015). Η υποστηρικτική θεραπεία φαίνεται να έχει ελαττώσει τη θνησιμότητα στο 5-10% (Wesley Farr, 1995). Η έντονη αιμόπτυση αντικατοπτρίζει την εκτεταμένη κυψελιδική αιμορραγία, μια επιπλοκή που σχετίζεται με ποσοστά θνησιμότητας >50% (Haake & Levett, 2015).

Η εμφάνιση αιμορραγιών, που οφείλεται κυρίως στη διαταραχή του πηκτικού μηχανισμού, είναι μία από τις σοβαρότερες εκδηλώσεις της νόσου στον άνθρωπο με τα περιστατικά να αυξάνονται συνεχώς παγκοσμίως. Στις αιμορραγικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται οφθαλμική έκχυση, πετέχειες, πνευμονική αιμορραγία, γαστρεντερική αιμορραγία και αιματουρία. Ευρήματα όπως η θρομβοπενία εμφανίζονται στο 40-85% των ασθενών, αν και η ακριβής αιτία της είναι άγνωστη. Η αγγειίτιδα, η αυξημένη περιφερική καταστροφή και η μειωμένη παραγωγή θρομβοκυττάρων έχουν θεωρηθεί ως πιθανές αιτίες θρομβοκυττοπενίας. Από το ΚΝΣ, το κύριο εύρημα είναι οι κεφαλαλγίες με αιφνίδια έναρξη (Seguro & Andrade, 2013; Kaya et al., 2005).

Οι ασθενείς που εμφανίζουν πολυσυστηματική ανεπάρκεια οργάνων έχουν εκτεταμένη αιματογενή διασπορά. Η ηπατοκυτταρική βλάβη και η διάρρηξη των μεσοκυττάρων συνδέσεων μεταξύ των ηπατοκυττάρων έχουν ως αποτέλεσμα την διαφυγή χολερυθρίνης από τους χοληφόρους πόρους που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων χολερυθρίνης. Σε περίπτωση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας θα πρέπει να

χορηγούνται στον ασθενή υγρά και ηλεκτρολύτες αλλά και άμεση έναρξη αιμοκάθαρσης (Haake & Levett, 2015). Άλλα λιγότερο κοινά συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στο 58,7% των ασθενών που συμμετείχαν σε μελέτη με 165 περιστατικά με λεπτοσπείρωση, ήταν του γαστρεντερικού συστήματος, όπως κοιλιακό άλγος, ναυτία, έμετος και διάρροια (Philip et al., 2020).

Σύμφωνα με άλλη μελέτη στην οποία η συχνότητα πνευμονικής συμμετοχής ήταν αυξημένη, η δύσπνοια και άλλες διαταραχές της πνευμονικής λειτουργίας (Εικ. 17) χαρακτηρίστηκαν ως προγνωστικοί παράγοντες θανάτου. Η ολιγουρία, η θρομβοπενία και η ηλικία άνω των 40 ετών, πέραν της πνευμονικής συμμετοχής — συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS)— έχουν αναγνωριστεί επίσης ως προγνωστικοί παράγοντες θνησιμότητας σε περιπτώσεις σοβαρής λεπτοσπείρωσης. Ωστόσο, η επίδρασή τους δεν είναι εξίσου ισχυρή με αυτή της πνευμονικής εμπλοκής. Αντιθέτως, η πνευμονική αιμορραγία αναγνωρίστηκε ως η κυριότερη αιτία θανάτου, ακόμη και σε ασθενείς χωρίς τις τυπικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, όπως ο ίκτερος (Spichler et al., 2008).



Εικόνα 17. Ακτινογραφία θώρακος που δείχνει πνευμονία με οίδημα (Lin et al., 2012)

6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο κύριος στόχος της θεραπείας είναι ο έλεγχος της λοίμωξης προτού προκαλέσει ανεπανόρθωτη βλάβη στο ήπαρ και στους νεφρούς, ενώ ο δευτερεύων στόχος είναι ο έλεγχος της λεπτοσπειρουρίας (Yadeta et al., 2016; Levett, 2001).

Η θεραπεία εξαρτάται από την κατάσταση του ασθενούς, τη σοβαρότητα και τη διάρκεια των συμπτωμάτων που παρουσιάζει. Αντιμικροβιακή θεραπεία είναι απαραίτητη για όλους τους ασθενείς, και το φάσμα των αντιμικροβιακών που χρησιμοποιούνται για την λεπτοσπείρωση είναι ιδιαίτερα ευρύ. Σε ήπιες περιπτώσεις, η θεραπεία είναι συμπτωματική, με χορήγηση από το στόμα δοξυκυκλίνης για δύο εβδομάδες, η οποία ωστόσο αντενδείκνυται για εγκύους. Σε περιπτώσεις όπου εμφανίζεται ίκτερος, θα πρέπει να υπάρχει συνεχής παρακολούθηση και πιθανώς να χρειαστεί περαιτέρω ιατρική περίθαλψη. Σε πιο σοβαρές καταστάσεις, απαιτείται εισαγωγή σε νοσοκομείο και στενή παρακολούθηση, ειδικά σε περιπτώσεις ικτερικής λεπτοσπείρωσης, όπου συχνά απαιτείται η εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, χορηγείται ενδοφλέβια πενικιλίνη G μέχρι τη διαπίστωση βελτίωσης της κατάστασης (Guerra, 2009; Levett, 2001). Αντίστοιχα, μπορεί να απαιτηθεί μετάγγιση αίματος σε περίπτωση αιμορραγικών καταστάσεων ή απώλειας αίματος, και διασωλήνωση με μηχανικό αερισμό σε ασθενείς με πνευμονική αιμορραγία (Guerra, 2009).

Ασθενείς με υποκαλαιμία και αυξημένη νεφρική δυσλειτουργία απαιτούν αναπλήρωση όγκου και συμπληρώματα καλίου για να αποφευχθεί η αφυδάτωση και η οξεία νέκρωση των σωληναρίων. Η αιμοκάθαρση είναι επείγουσα και απαραίτητη, ενώ η πρόωπη αιμοκάθαρση έχει παρατηρηθεί να σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση αλλά και μείωση του χρόνου παραμονής στα νοσοκομεία. Συνήθως δεν απαιτούνται παραπάνω από 1-2 εβδομάδες αιμοκάθαρσης (Sykes et al., 2023).

Η διασωλήνωση είναι απαραίτητη σε ασθενείς με βαριά αναπνευστική ανεπάρκεια και ARDS. Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο και σοβαρά συμπτώματα, η χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί να μην έχει σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Σ' αυτούς τους ασθενείς απαιτείται επίσης ιδιαίτερη προσοχή και έλεγχος της νεφρικής λειτουργίας, ενώ η καρδιακή λειτουργία πρέπει επίσης να παρακολουθείται (Haake & Levett, 2015; Levett, 2001).

Στις περισσότερες ήπιες περιπτώσεις οξείας λεπτοσπείρωσης, οι οποίες υποχωρούν αυτόματα, είναι αμφίβολο αν πρέπει να χορηγηθεί αντιμικροβιακή

θεραπεία. Παρά το γεγονός ότι σε ήπιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται συνήθως δοξυκυκλίνη, αζιθρομυκίνη, αμπικιλίνη και αμοξικιλίνη, δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να συγκρίνουν τα αποτελέσματα αυτών των θεραπειών. Σε τυχαιοποιημένη μελέτη, η χορήγηση αντιβιοτικής αγωγής συσχετίστηκε με μείωση των συμπτωμάτων, όπως ο πυρετός και η κεφαλαλγία, κατά περίπου δύο ημέρες, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε πρόληψη της λεπτοσπειρουρίας. Ωστόσο, δεν τεκμηριώθηκε σαφώς ότι η έγκαιρη αντιμικροβιακή θεραπεία αποτρέπει την εξέλιξη της νόσου σε σοβαρές μορφές (Lane & Dore, 2016). Αντίστοιχα, σε μελέτες που διεξήχθησαν στη Χαβάη κατά την περίοδο 1974–1998, δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς τη διάρκεια της νόσου μεταξύ των ασθενών που έλαβαν αντιβιοτική αγωγή και εκείνων που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία. Σε μετέπειτα μελέτη, η οποία περιλάμβανε 38 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με πενικιλίνη, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον χρόνο αποκατάστασης των βιοχημικών δεικτών, τη διάρκεια του πυρετού ή τα ποσοστά θνησιμότητας. Παρ' όλα αυτά, δεδομένα από άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η έγκαιρη αντιβιοτική παρέμβαση κατά την πρόδρομη φάση της νόσου ενδέχεται να επιταχύνει την ανάρρωση, μειώνοντας τη διάρκεια της συμπτωματολογίας κατά 2–4 ημέρες (Samrot et al., 2021).

Η επιλογή της θεραπείας πρέπει να λαμβάνει υπόψη το κόστος, τη διαθεσιμότητα των αντιβιοτικών, καθώς και τη διαφορική διάγνωση. Η δοξυκυκλίνη πρέπει να αποφεύγεται σε παιδιά και εγκύους, ενώ σε περιοχές με ενδημικές ρικετσιώσεις, η δοξυκυκλίνη και η αζιθρομυκίνη προτιμώνται. Αν και οι αντιδράσεις Jarisch-Herxheimer είναι συχνές κατά τις πρώτες ώρες χορήγησης, δεν σχετίζονται με συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η ενδοφλέβια χορήγηση νατριούχου πενικιλίνης G, όπως αναφέρθηκε, είναι η παραδοσιακή θεραπεία. Ωστόσο, λόγω της αυξανόμενης αντοχής των παθογόνων στα αντιβιοτικά, σε συνδυασμό με το στενό φάσμα της ενάντια σε άλλες τροπικές λοιμώξεις, αλλά και αρκετών μελετών που δεν δείχνουν κλινικά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας με πενικιλίνη, υπήρξε ενδιαφέρον για την αξιολόγηση άλλων αντιβιοτικών, όπως η δοξυκυκλίνη και η κεφοταξίμη. Σε τυχαιοποιημένη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν και τα τρία αυτά αντιβιοτικά σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη λεπτοσπείρωση, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα ποσοστά θνησιμότητας, τη διάρκεια του πυρετού ή τη διάρκεια νοσηλείας (Lane & Dore, 2016).

Για τη λεπτοσπείρωση, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και άλλοι αντιβιοτικοί παράγοντες, όπως η τετρακυκλίνη, ενώ η δοξυκυκλίνη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη

διάρκεια και τη σοβαρότητα της νόσου στην ανικτερική μορφή κατά δύο ημέρες με τη συνιστώμενη δόση 100mg δύο φορές την ημέρα για 7 ημέρες. Η πενικιλίνη ενδοφλεβίως, χρησιμοποιήθηκε για τις δύο μορφές της νόσου, ικτερική και ανικτερική και έδειξε θετικά αποτελέσματα σε διάφορες μελέτες, κυρίως στη μείωση της διάρκειας του πυρετού και της πρόληψης της λεπτοσπειρουρίας, όταν χορηγείται έγκαιρα. Η χορήγηση δοξυκυκλίνης 200mg από το στόμα μια φορά την εβδομάδα έχει παρατηρηθεί ότι για σύντομο χρονικό διάστημα προφυλάσσει από έκθεση σε περιβάλλον με υψηλό παράγοντα κινδύνου (Levett, 2001).

Στους ασθενείς που είναι είτε υπερευαίσθητοι, είτε αλλεργικοί στην πενικιλίνη μπορούν να χορηγηθούν 250mg ερυθρομυκίνης 4 φορές τη μέρα για 5 μέρες ή 100mg δοξυκυκλίνης 2 φορές τη μέρα για 10 μέρες. Η χρήση τετρακυκλίνης επίσης αντενδείκνυται για χορήγηση σε παιδιά, εγκύους αλλά και ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια (Chancharoenthana et al., 2022).

7. ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗ ΚΑΙ ΖΩΑ

7.1. Είδη ζώων-Παθογένεια- Συμπτωματολογία

Όπως στους ανθρώπους έτσι και στα ζώα οι λεπτόσπειρες εισέρχονται στο σώμα μέσω των βλεννογόνων, μέσω αμυχών ή πληγών και εξαπλώνονται στην κυκλοφορία μέσω των λεμφικών αγγείων από το σημείο μόλυνσης (Adler & de la Peña Moctezuma, 2016).

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα ζώα ποικίλουν από την ευαισθησία του ζώου και την ανοσολογική του κατάσταση την στιγμή της μόλυνσης, το είδος του ξενιστή αλλά και σε ό,τι αφορά το παθογόνο, τη μολυσματικότητα και τον ορότυπο του (de Oliveira et al., 2022).

Μετά την είσοδο του βακτηρίου στην κυκλοφορία, αυτό πολλαπλασιάζεται και εξαπλώνεται σε διάφορα όργανα όπως τους νεφρούς, το ήπαρ, τον σπλήνα, το ΚΝΣ, τους οφθαλμούς και τα αναπαραγωγικά όργανα. Ωστόσο, υπάρχουν τρεις πιθανοί οδοί που ακολουθεί το βακτήριο μετά την είσοδό του στην κυκλοφορία. Αν το μολυσμένο ζώο έχει υψηλό τίτλο αντισωμάτων, θα καταφέρει να αποβάλλει τις λεπτόσπειρες και πιθανότατα να μην εμφανίσει καθόλου συμπτώματα. Σε ζώα με μέτριο τίτλο αντισωμάτων, οι λεπτόσπειρες θα προκαλέσουν ήπια και σύντομη λεπτοσπειραιμία, με τα βακτήρια να αποβάλλονται αρχικά μέσω των νεφρών και το ζώο συνήθως να μην αποβάλλει ξανά λεπτόσπειρες μετά την εξάλειψή τους. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις όπου το ζώο εμφανίζει χαμηλό ή μη ανιχνεύσιμο τίτλο αντισωμάτων έναντι της *Leptospira*, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί δύνανται να πολλαπλασιαστούν ανεξέλεγκτα στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη ενδοθηλιακή βλάβη, προκαλώντας ισχαιμία σε κρίσιμα όργανα, όπως οι νεφροί, το ήπαρ και οι πνεύμονες. Εάν οι λεπτόσπειρες διεισδύσουν στο ΚΝΣ ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της λοίμωξης, ενδέχεται να αναπτυχθεί άσηπτη μηνιγγίτιδα, ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ραγοειδίτιδας ως πιθανή επιπλοκή. Ακόμη και σε περιπτώσεις ζώων με υψηλό τίτλο προστατευτικών αντισωμάτων, οι λεπτόσπειρες είναι δυνατόν – αν και σπανιότερα – να παραμένουν στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια, με αποτέλεσμα τη μακροχρόνια αποβολή των παθογόνων μέσω των ούρων για διάστημα που μπορεί να εκτείνεται σε μήνες ή ακόμη και έτη (Yadeta et al., 2016). Όσον αφορά τους σκύλους, αν και μπορεί να μολυνθούν και να έρθουν σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο, δεν φαίνεται να συμβάλλουν στη

μόλυνση του ανθρώπου, παρά μόνο στη διάδοση της λεπτόσπειρας στο περιβάλλον. Οι σκύλοι είναι κυρίως ξενιστές του *Leptospira canicola*, και μπορεί να εκδηλώσουν ήπια συμπτώματα ή να παραμείνουν ασυμπτωματικοί (de Oliveira et al., 2022).

Η λεπτοσπείρωση δεν επηρεάζει μόνο τα κατοικίδια και τα άγρια ζώα, αλλά και τα παραγωγικά ζώα, με αντίκτυπο στην παραγωγή και με οικονομικές επιπτώσεις. Ζώα όπως αιγοπρόβατα, χοίροι και βοοειδή μπορεί να εμφανίσουν υποκλινικές ή σοβαρές λοιμώξεις με προβλήματα αναπαραγωγής (όπως θνησιγένεια, στειρότητα, αποβολές). Τα βοοειδή προσβάλλονται από διάφορους ορότυπους λεπτόσπειρας παγκοσμίως, με την χρόνια μορφή να οδηγεί σε αποβολές, θνησιγένεια, πρόωρο τοκετό και απώλεια παραγωγής γάλακτος. Στους χοίρους, η λεπτοσπείρωση επηρεάζει την αναπαραγωγή τους. Συνδυασμοί αντιβιοτικών, όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη ή τετρακυκλίνη, χρησιμοποιούνται για να μειώσουν τον αριθμό των μολυσμένων ζώων, την αποβολή των βακτηρίων μέσω των ούρων τους καθώς και να περιορίσουν τις αποβολές των κυοφορούντων μολυσμένων ζώων (Liegeon et al., 2018).

Τα ίδια συμπτώματα παρατηρούνται και στα βοοειδή και ιπποειδή, όπως χαμηλός πυρετός, ατονία και ανορεξία σε ήπια μορφή. Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις, τα ζώα μπορεί να εμφανίσουν επιπεφυκίτιδα λόγω ίκτερου, αναιμία, αιμορραγίες και κατάθλιψη, με την πιθανότητα ανάπτυξης νεφρικής ανεπάρκειας σε νεαρά ζώα. Κατά τη διάρκεια της κυοφορίας μπορεί να προκληθεί αποβολή χωρίς την εμφάνιση προηγούμενων κλινικών συμπτωμάτων (Verma et al., 2013).

7.2. Θεραπεία λεπτοσπείρωσης σε ζώα

Στα ζώα η θεραπεία της νόσου έχει ως κύριο σκοπό τον έλεγχο την μόλυνσης πριν προκληθούν ανεπανόρθωτες βλάβες στο ήπαρ και τους νεφρούς. Με την εμφάνιση συμπτωμάτων θα πρέπει να χορηγείται άμεσα θεραπεία με διυδροστρεπτομυκίνη. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις τα ζώα που διακομίζονται είναι στο στάδιο της σηψαιμίας και έτσι τα αποτελέσματα της θεραπείας είναι συχνά απογοητευτικά. Ο δεύτερος κύριος λόγος είναι για τον έλεγχο της λεπτοσπειρουρίας των φορέων με στόχο την ασφάλεια και των άλλων ζώων της ομάδας (Levett, 2001).

Για τη θεραπεία της νόσου επίσης χρησιμοποιούνται τετρακυκλίνη, πενικιλίνη, αμπικιλλίνη, δοξυκυκλίνη, στρεπτομυκίνη και ερυθρομυκίνη. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου απαιτούνται και άλλες υποστηρικτικές θεραπείες, εκτός των αντιμικροβιακών,

όπως μετάγγιση αίματος, αναπλήρωση υγρών κλπ. Αυτού του είδους οι θεραπείες εξαρτώνται από το ζώο, την κατάστασή του και τις ανάγκες του. Η αναπλήρωση υγρών είναι απαραίτητη όταν το ζώο παρουσιάζει διάρροιες και εμέτους. Οι μεταγγίσεις αίματος ενδείκνυνται για την αιμολυτική αναιμία στα βοοειδή με οξεία λεπτοσπείρωση (Yadeta et al., 2016).

Στα κρεοπαραγωγικά κοπάδια βοοειδών, η πρόληψη των αποβολών που οφείλονται σε λοιμώξεις από λεπτόσπειρες επιτυγχάνεται μέσω προληπτικών εμβολιασμών και χορήγησης αντιμικροβιακής αγωγής σε ολόκληρο το κοπάδι. Αντιθέτως, στα γαλακτοπαραγωγά κοπάδια, η θεραπευτική προσέγγιση είναι εξατομικευμένη και περιορίζεται στα κλινικά νοσούντα ζώα. Στα ιπποειδή, η αντιμετώπιση της υποτροπιάζουσας ραγοειδίτιδας βασίζεται κυρίως στη χορήγηση αντιφλεγμονωδών και κορτικοστεροειδών φαρμάκων, σε συνδυασμό με μυδριατικά όπως η τοπική ατροπίνη, για την ανακούφιση από τον σπασμό του ακτινωτού μυός. Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστούν χειρουργικές επεμβάσεις ή άλλες εξειδικευμένες θεραπείες, ανάλογα με τη βαρύτητα και τη συχνότητα των υποτροπών (Yadeta et al., 2016). Στους σκύλους, η θεραπεία της λεπτοσπείρωσης περιλαμβάνει την αντιμικροβιακή αντιμετώπιση της λοίμωξης, καθώς και την υποστηρικτική φροντίδα για τα συστήματα που έχουν προσβληθεί. Η έκταση και το είδος της παρέμβασης καθορίζονται από τη σοβαρότητα των οργανικών βλαβών, κυμαινόμενες από απλή κλινική παρακολούθηση έως εντατική υποστηρικτική θεραπεία. Η θεραπευτική στρατηγική που εφαρμόζεται τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα περιλαμβάνει τη χορήγηση ενδοφλέβιας πενικιλίνης κατά την οξεία φάση της νόσου, με στόχο την ταχεία εξάλειψη της βακτηριαιμίας, σε συνδυασμό με από του στόματος δοξυκυκλίνη για την πρόληψη της χρόνιας νεφρικής νόσου. Ο συνδυασμός αυτός χρησιμοποιείται και στη κτηνιατρική, καθώς η αποκλειστική χορήγηση δοξυκυκλίνης δεν γίνεται καλά ανεκτή από τα περισσότερα ζώα. Άλλα αντιμικροβιακά είναι είτε λιγότερο δραστικά, όσον αφορά την απομάκρυνση των λεπτοσπειρών από τους νεφρούς στα ζωικά μοντέλα τρωκτικών, είτε επειδή σε κάποιες χώρες περιορίζεται η χρήση τους για συγκεκριμένα ανθεκτικά βακτήρια. Επιπλέον, δίνεται προτεραιότητα στη σωστή διαχείριση υγρών, ηλεκτρολυτών και αρτηριακής πίεσης, καθώς και στην υποστήριξη για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών διαταραχών (Sykes et al., 2023).

7.3. Ζωικά μοντέλα

Ιδιαίτερα σημαντική και αναγκαία έχει αποδειχτεί η χρήση ζωικών μοντέλων καθώς συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της λεπτόσπειρας, της βιολογίας του μικροβίου, της μετάδοσής του, του αποικισμού αλλά και της παθογένειάς του (Evangelista & Coburn, 2010).

Έχουν καθιερωθεί πολλά είδη ζώων ως ζωικά μοντέλα, με τα χάμστερ και τα ινδικά χοιρίδια να είναι εκείνα που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας τους στην λεπτοσπείρωση. Τα χάμστερ στην οξεία μορφή της νόσου παρουσιάζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με την σοβαρή ανθρώπινη λεπτοσπείρωση. Από την άλλη, αυτά τα δύο είδη ζώων μπορούν να παρουσιάσουν και την χρόνια λεπτοσπείρωση σε περίπτωση που μολυνθούν με συγκεκριμένα στελέχη όπως *L. interrogans pomona* ή *grippytyphosa* ή *L. borgpetersenii hardjo* ή *ballum* (Gomes-Solecki et al., 2017; Matsui et al., 2016). Τα χάμστερ και πιο συγκεκριμένα το Golden Syrian Hamster, ως μοντέλα για την λεπτοσπείρωση ήταν ιδιαίτερα χρήσιμα στην επιβεβαίωση της μολυσματικότητας του στελέχους και της λοιμογόνου δράσης του, στην αναζήτηση συγκεκριμένων οργανικών βλαβών που προκάλεσε η λοίμωξη, αλλά συνέβαλαν σημαντικά και στις μελέτες για τη δημιουργία πιθανών εμβολίων και τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα διαφόρων φαρμάκων (Haake, 2006).

Η εισαγωγή του μικροοργανισμού στα ζωικά μοντέλα γίνεται συνήθως με ενδοπεριτοναϊκό εμβολιασμό. Υπάρχουν και άλλοι τρόποι μόλυνσης, όπως υποδόρια και μέσω του επιπεφυκότα, που φαίνεται να αποδίδουν αρκετά, καθώς είναι πιο κοντά στον τρόπο φυσικής μετάδοσης- ιδιαίτερα σημαντικό για τη δημιουργία εμβολίων-, αλλά δεν έχουν μελετηθεί τόσο όσο ο πρώτος συχνότερος τρόπος, ενώ υπάρχει δυσκολία στην αναπαραγωγή τους (Truccolo et al., 2002).

8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για τους γιατρούς, τόσο τους κλινικούς όσο και τους εργαστηριακούς, καθώς και για το νοσηλευτικό προσωπικό και τα στελέχη δημόσιας υγείας. Παρά την πρόκληση, η έγκαιρη διάγνωση είναι απαραίτητη και επιβεβλημένη, καθώς η κλινική εικόνα της νόσου δεν είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Η λεπτοσπείρωση είναι μια λοίμωξη που απαιτεί πρόωμη διάγνωση, καθώς μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή νόσο με συνέπειες για τους νεφρούς, το ήπαρ, τους πνεύμονες, ενώ μπορεί να προκαλέσει και αιμορραγικές διαταραχές. Παρά το γεγονός ότι η νόσος είναι αρκετά συχνή, η διάγνωση τίθεται συνήθως μόνο όταν εκδηλωθούν συμπτώματα της νόσου Weil. Συχνά, η λοίμωξη από το βακτήριο της λεπτόσπειρας μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματική ή να προκαλεί ήπια συμπτώματα (Budihal & Perwez, 2014; Guerra, 2013; Arian, 1962).

Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης απαιτεί τη χρήση διαγνωστικών εξετάσεων, αν και η διαθεσιμότητα αυτών περιορίζεται σε περιοχές με χαμηλούς οικονομικούς πόρους. Η διάγνωση συνήθως τίθεται με την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων, τα οποία κυμαίνονται από ιογενή σύνδρομο παιδικής ηλικίας μέχρι μηνιγγίτιδα και σήψη, ενώ πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το ιστορικό έκθεσης στον κίνδυνο. Ωστόσο, η διαγνωστική ακρίβεια διαφέρει, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ορολογικές εξετάσεις. Οι τιμές ορίου (cut-off) που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της οροθετικότητας σε ένα μεμονωμένο δείγμα ενδέχεται να επηρεάζονται από τον τοπικό επιπολασμό της νόσου, δηλαδή από τη συχνότητα εμφάνισής της σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Σε περιπτώσεις συνύπαρξης άλλων λοιμώξεων, τα αποτελέσματα των διαγνωστικών εξετάσεων ενδέχεται να είναι ψευδώς θετικά ή αρνητικά (Rajapakse, 2022; Samrot et al., 2021).

Η διάγνωση βασίζεται κυρίως σε ορολογικές εξετάσεις, με τη μικροσκοπική δοκιμασία συγκόλλησης (Microscopic Agglutination Test, MAT) να θεωρείται το «χρυσό πρότυπο» (gold standard), καθώς ανιχνεύει αντισώματα κατά συγκεκριμένων οροτύπων της *Leptospira* (Jaiswal et al., 2015).

Άξιο αναφοράς είναι ωστόσο το γεγονός ότι η λεπτοσπείρωση παρουσιάζει παρόμοια χαρακτηριστικά με άλλες ασθένειες με αποτέλεσμα στη διαφορική διάγνωση να συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον οι παρακάτω λοιμώξεις (WHO, 2003):

1. Γρίπη
2. Δάγκειος Αιμορραγικός Πυρετός (μεταδίδεται με τα κουνούπια)
3. Λοίμωξη από Hantavirus ή άλλα Σύνδρομα Αναπνευστικής Ανεπάρκειας
4. Κίτρινος Πυρετός και άλλοι Ιογενείς Αιμορραγικοί Πυρετοί
5. Ελονοσία
6. Βρουκέλλωση
7. Μπορρελίωση
8. Ρικετσιώσεις
9. Πνευμονοφυρίτιδα
10. Άσηπτη Μηνιγγίτιδα
11. Τροφική ή Χημική Δηλητηρίαση
12. Τυφοειδής Πυρετός και άλλοι εντερικοί πυρετοί
13. Ιογενής Ηπατίτιδα
14. Πυρετός αγνώστου αιτιολογίας
15. Λοίμωξη από HIV
16. Λεγεωνέλλωση
17. Τοξοπλάσμωση
18. Λοιμώδης Μονοπυρήνωση
19. Φαρυγγίτιδα

Η σοβαρότητα της νόσου ποικίλλει ανάλογα με το άτομο, καθώς ορισμένοι ασθενείς μπορεί να φέρουν αντιγόνα ενός συγκεκριμένου ορότυπου χωρίς να εκδηλώνουν κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης. Αυτό καθιστά σαφές ότι η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης δεν πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στις κλινικές εκδηλώσεις, αλλά πρέπει να γίνεται συνδυαστικά και μέσω εργαστηριακών εξετάσεων. Η εξέλιξη της ιατρικής έρευνας έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ακριβέστερων και πιο αξιόπιστων διαγνωστικών μεθόδων για την επιβεβαίωση της λοίμωξης (Samrot et al., 2021). Η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για την αποτελεσματική θεραπεία της νόσου και πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατόν, ιδανικά εντός των πρώτων πέντε ημερών από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η διάγνωση αυτή συνήθως απαιτεί τη χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών τεχνικών, είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά. Η έγκαιρη διάγνωση συμβάλλει στην καλύτερη αντιμετώπιση της οξείας φάσης της νόσου. Περίπου το 5-10% των ασθενών ενδέχεται να αναπτύξουν τη σοβαρή μορφή

της λεπτοσπείρωσης, με τη θνησιμότητα να ανέρχεται περίπου στο 10% λόγω της νόσου Weil. Η θνησιμότητα αυτή μπορεί να περιοριστεί μέσω της επιδημιολογικής επιτήρησης, υπό την προϋπόθεση ότι οι ασθενείς διαγιγνώσκονται και αρχίζουν την κατάλληλη θεραπεία έγκαιρα (Arboleda et al., 2023).

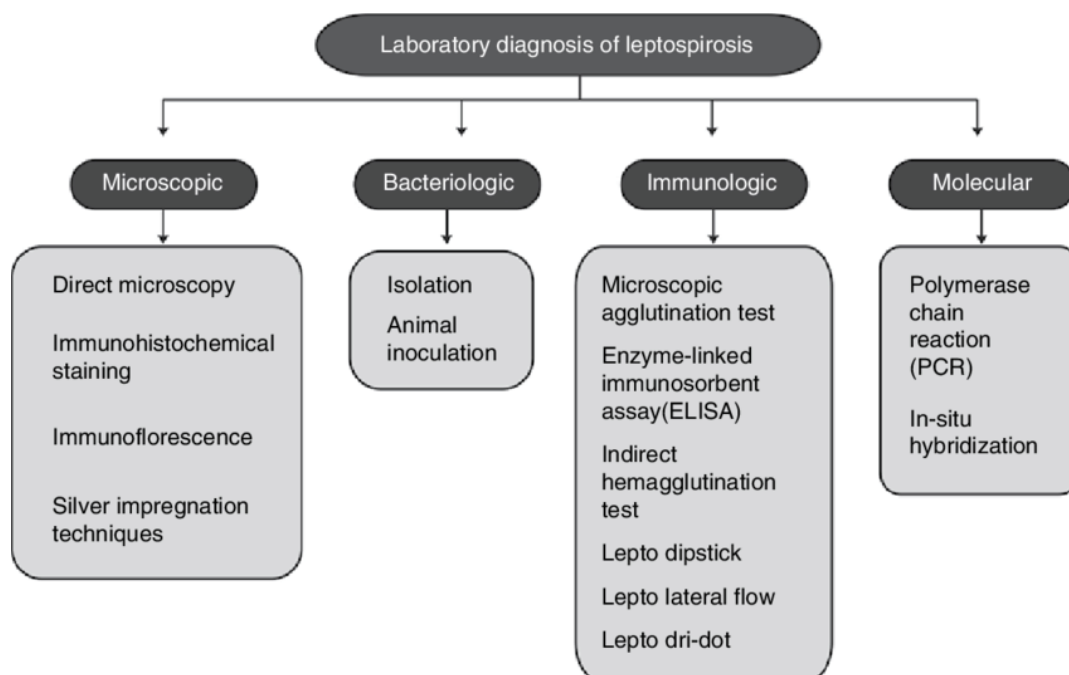
Είναι σημαντικό να υπάρχει υποψία για λεπτοσπείρωση σε οποιονδήποτε ασθενή με ιστορικό έκθεσης, ο οποίος συνδυάζει τα εξής συμπτώματα: πυρετό, έντονο πονοκέφαλο, μυαλγία, κατάπωση, γενική αδιαθεσία, ναυτία, έμετο, διάρροια, ίκτερο, υπόσφαγμα του επιπεφυκότα (αιμορραγία κάτω από τον επιπεφυκότα), ολιγουρία ή ανουρία, κοιλιακό άλγος, αρθραλγία, χαρακτηριστικά μηνιγγικού ερεθισμού (όπως φωτοφοβία, δυσκαμψία αυχένα και επιληπτικές κρίσεις), αιμορραγίες, χαρακτηριστικές καρδιακές αρρυθμίες ή υπόταση, βήχα, δερματικά εξανθήματα, ψυχική σύγχυση, ψύχωση, παραλήρημα ή οποιαδήποτε άλλη ένδειξη δυσλειτουργίας οργάνων (WHO, 2003). Από τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα, μπορεί να παρατηρηθεί αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ), που θεωρείται χρήσιμος δείκτης και εκφράζεται σε mm/h. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να κυμαίνεται από φυσιολογικός έως μέτρια αυξημένος. Στον προσδιορισμό βιοχημικών παραμέτρων ελέγχου ηπατικής λειτουργίας, συνήθως παρατηρείται αύξηση των αμινοτρανσφερασών, χολερυθρίνης και αλκαλικής φωσφατάσης, αν και η υπερχολερυθριναιμία δεν σχετίζεται πάντα με τον ίκτερο στις περιπτώσεις ικτερικής λεπτοσπείρωσης. Στους δείκτες νεφρικής λειτουργίας, η κρεατινίνη πλάσματος είναι αυξημένη, ενώ οι εξετάσεις ούρων δείχνουν μη φυσιολογικά ευρήματα, όπως πρωτεϊνουρία, πυουρία, μικροσκοπική αιματοουρία και παρουσία κυλίνδρων (υελώδεις και κοκκώδεις). Στο ENY η πρωτεΐνη μπορεί να είναι εντός φυσιολογικών ορίων ή ελαφρώς αυξημένη, ενώ η γλυκόζη παραμένει φυσιολογική. Παράλληλα, στον λευκοκυτταρικό τύπο σημειώνεται επικράτηση πολυμορφοπύρηνων και λευκοκυττάρων. Σε σοβαρές περιπτώσεις, ενδέχεται να παρατηρηθεί ξανθοχρωμία στο ENY (Budihal & Perwez, 2014; Bharti et al., 2003).

Στην σοβαρή μορφή της νόσου, παρατηρούνται λευκοκυττάρωση με μετατόπιση του τύπου προς τα αριστερά, μειωμένα αιμοπετάλια και αυξημένες συγκεντρώσεις κρεατινίνης στο πλάσμα, που υποδεικνύουν μειωμένη νεφρική λειτουργία και θρομβοπενία. Σε ασθενείς με ίκτερο, παρατηρείται αύξηση της χολερυθρίνης, η οποία είναι δυσανάλογη με τις άλλες παραμέτρους της ηπατικής λειτουργίας. Επίσης, αυξημένες τιμές κρεατινικής φωσφοκινάσης και αμυλάσης του ορού μπορεί να εντοπιστούν. Αυτά τα ευρήματα από εργαστηριακές εξετάσεις

ρουτίνας είναι χρήσιμα για τη διάγνωση της νόσου, αλλά απαιτούν επιπλέον ειδικές μικροβιολογικές εξετάσεις για την επιβεβαίωση της. Σε αυτό το πλαίσιο, η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου δεν συνιστάται, καθώς μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα (Budihal & Perwez, 2014; Bharti et al., 2003).

8.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Οι διαγνωστικές εξετάσεις (Εικ. 18) διακρίνονται σε εκείνες που παρέχουν άμεσες (μικροσκόπηση, απομόνωση, ανίχνευση γενετικού υλικού ή αντιγόνων) και έμμεσες ενδείξεις λοίμωξης, όπου στις τελευταίες ανήκουν οι ορολογικές για ανίχνευση αντισωμάτων (WHO, 2003). Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης μπορεί να παρουσιάσει προκλήσεις, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ανιχνεύονται αντιγόνα ή γενετικό υλικό (DNA) των λεπτοσπειρών στο αίμα. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται είτε σε βραχεία διάρκεια λεπτοσπειραιμίας κατά το οξύ στάδιο της νόσου, είτε σε καθυστερημένη δειγματοληψία, είτε στη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής, η οποία δύναται να εξαλείψει ταχύτατα το παθογόνο από την κυκλοφορία. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι η δειγματοληψία πριν την ορομετατροπή μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στην ανίχνευση αντισωμάτων (Picardeau, 2013).



Εικόνα 18. Εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης λεπτοσπείρωσης (Bisen & Raghuvanshi, 2013)

Η διάγνωση της λεπτοσπείρωσης βασίζεται σε διάφορες εργαστηριακές εξετάσεις, οι οποίες απαιτούν τη συλλογή συγκεκριμένων τύπων δείγματος από τον ασθενή και εμφανίζουν διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Πίν.1). Ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης, ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν ολικό αίμα ή ορός αίματος. Δείγματα αίματος με EDTA φαίνεται να προσφέρουν καλύτερα αποτελέσματα στις μεθόδους μοριακής ενίσχυσης, ενώ η χρήση ορού ή πλάσματος για τις ορολογικές εξετάσεις αποδίδει ισοδύναμα αποτελέσματα, με προτίμηση στον ορό λόγω της καλύτερης συμβατότητάς του με την πλειονότητα των διαγνωστικών ορολογικών μεθόδων. Επιπλέον, οι λεπτόσπειρες μπορεί να ανιχνευτούν και σε άλλα βιολογικά υγρά του οργανισμού, όπως τα ούρα ή το ENY, περίπου 10 ημέρες μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της νόσου. Η ανίχνευση της λοίμωξης μέσω αυτών των υγρών προσφέρει συμπληρωματικά διαγνωστικά δεδομένα. Στη σύγχρονη διαγνωστική προσέγγιση, διατίθεται μια ποικιλία κιτ ανίχνευσης, τα οποία στοχεύουν στην απομόνωση και τον καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων από δείγμα αίματος ή ούρα. Η χρήση μαγνητικών σφαιριδίων για την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων ή των αντιγόνων στα δείγματα επιτρέπει την αποδοτική και ευαίσθητη ανίχνευση της λοίμωξης. Αυτές οι τεχνολογίες έχουν ενισχύσει την ακρίβεια των διαγνωστικών εργαλείων, επιτρέποντας την έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης (Picardeau, 2013).

Πίνακας 1. Διαγνωστικές μέθοδοι, τύποι εξέτασης, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Διαγνωστική Μέθοδος	Τύπος Εξέτασης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Καλλιέργεια βακτηρίου	Μικροβιολογική /Καλλιέργεια	Χρυσός κανόνας για επιβεβαίωση της λοίμωξης. Ακριβής και αξιόπιστη μέθοδος.	Χρονοβόρα (10-14 ημέρες). Δεν είναι πάντα επιτυχημένη λόγω δύσκολης ανάπτυξης των βακτηρίων.
PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)	Μοριακή	Ταχύτητα και ευαισθησία. Εξαιρετική για πρόιμη διάγνωση	Χρειάζεται εξειδικευμένο εργαστήριο. Ακριβή και μπορεί

		και ανίχνευση χαμηλού βακτηριακού φορτίου.	να απαιτεί ειδικές αντιδράσεις για διαφορετικά στελέχη.
Ενζυμική Αντίδραση (ELISA)	Ανοσολογική	Γρήγορη και εύκολη μέθοδος για ανίχνευση αντισωμάτων ή αντιγόνων. Χρησιμοποιείται για μαζική διαγνωστική προσέγγιση.	Μπορεί να έχει ψευδώς θετικά/αρνητικά αποτελέσματα. Χρειάζεται επιβεβαίωση με άλλες μεθόδους.
Υβριδισμός Dot/In situ	Μοριακή (DNA/RNA)	Χρησιμοποιείται για ανίχνευση της μόλυνσης σε ιστολογικά δείγματα. Πολύ στοχευμένη και ευαίσθητη.	Χρειάζεται ειδικό εργαστήριο και εξοπλισμό. Η χρήση ραδιενεργών ισοτόπων είναι επικίνδυνη.
Ορολογικές δοκιμασίες με αντισώματα (Serology)	Ανοσολογική	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς.	Δεν παρέχει σαφή εικόνα για την οξεία φάση της νόσου.
Μικροσκοπική Ανίχνευση (Dark-field microscopy)	Μικροσκοπία	Ταχεία μέθοδος για τη διάγνωση σε οξεία φάση. Μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα το βακτήριο στον ορό.	Χρειάζεται ικανότητα και εμπειρία για να διακριθούν τα βακτήρια.

Ανοσοϊστοχημική Χρώση	Ανοσολογική	Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της <i>Leptospira</i> σε ιστούς (π.χ. νεφρικός ιστός).	Περιορισμένη εφαρμογή στην κλινική διάγνωση, κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς
------------------------------	-------------	--	--

8.1.1. ΑΜΕΣΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Είναι εκείνες με τις οποίες είτε παρατηρούνται και απομονώνονται οι λεπτόσπειρες από προσβεβλημένους ιστούς και κύτταρα, είτε ανιχνεύονται αντιγόνα μέσω ανοσοφθορισμού και ανοσοϊστοχημείας, ή ανιχνεύεται γενετικό υλικό μέσω εφαρμογής μοριακής μεθόδου PCR (Arboleda et al., 2023).

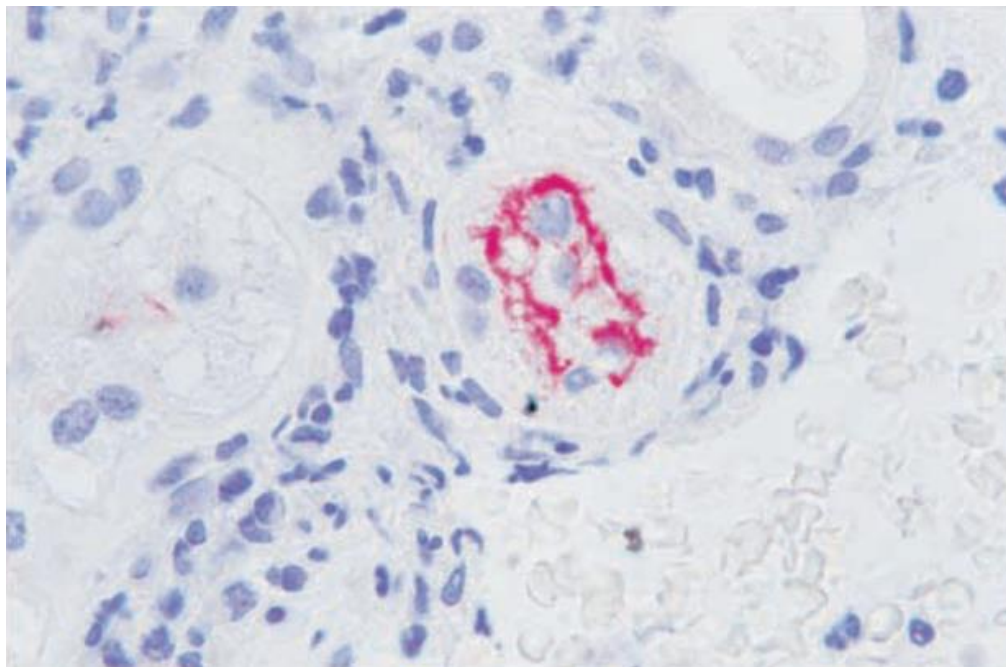
8.1.1.1. Μικροσκοπική Εξέταση

Οι λεπτόσπειρες είναι μικρόβια μορφολογικά «λεπτά», τα οποία δεν χρωματίζονται επαρκώς με τις συμβατικές χρωστικές, καθιστώντας δύσκολη την παρατήρησή τους με το κοινό μικροσκόπιο. Η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου αποτελεί μία αναγνωρισμένη τεχνική για την παρατήρηση λεπτοσπειρών, ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι αυτή η μέθοδος, παρά την αποτελεσματικότητά της, δεν παρέχει πάντα αξιόπιστα αποτελέσματα, ακόμη και όταν χρησιμοποιείται από έμπειρο προσωπικό (WHO, 2003).

Η άμεση μικροσκοπική παρατήρηση αποτελεί μια σημαντική μέθοδο για την ανίχνευση των λεπτοσπειρών σε διάφορα σωματικά υγρά και για την παρακολούθηση ανάπτυξης στις καλλιέργειες. Η μικροσκόπηση περιλαμβάνει ποικιλία τεχνικών που βοηθούν στην αναγνώριση της λοίμωξης. Αν και η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου είναι η πιο κοινή τεχνική για τη διάγνωση, η ανοσοχρώση χρησιμοποιείται σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις για την ενίσχυση της ακρίβειας της διάγνωσης (Budihal & Perwez, 2014).

Για την άμεση εξέταση, χρησιμοποιείται η μέθοδος ανοσοφθορισμού, η οποία σε συνδυασμό με τη απλή μικροσκόπηση μετά από κατάλληλη χρώση, επιτρέπουν την οπτική ανίχνευση των λεπτοσπειρών. Επιπλέον, οι λεπτόσπειρες στους ιστούς μπορούν να ανευρεθούν με ιστοπαθολογική χρώση και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Εικ. 19),

οι οποίες προσφέρουν ακριβή αναγνώριση των μικροβίων σε ιστικά δείγματα (Toyokawa et al., 2014).



Εικόνα 19. Ανοσοϊστοχημική χρώση σε λεπτοσπειρικά αντιγόνα (Wild et al., 2002)

Η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου, σε μεγέθυνση $\times 400$, θεωρείται η πλέον εξειδικευμένη μέθοδος για την ανίχνευση λεπτοσπειρών, ιδίως όταν τα δείγματα περιέχουν μεγάλο αριθμό μικροβίων και η ανάλυση γίνεται από εξειδικευμένο προσωπικό. Το κατώτατο όριο ανίχνευσης (lower limit of detection, LLOD) ορίζεται συνήθως ως 1 ή 2 λεπτόσπειρες ανά οπτικό πεδίο ($2 \times 10^3/\text{ml}$) σε «καθαρά» δείγματα, ωστόσο σε πραγματικά κλινικά δείγματα, αυτό το όριο μπορεί να αυξηθεί. Η ανίχνευση των λεπτοσπειρών είναι πιο πιθανή κατά την πρώτη εβδομάδα από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων, καθώς οι συγκεντρώσεις μικροβίων στο αίμα είναι υψηλότερες σε αυτό το διάστημα (Schreier et al., 2013). Η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου (Εικ. 20), η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των λεπτοσπειρών σε δείγμα αίματος ή ούρων κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, έχει χαμηλή ευαισθησία, δεδομένου ότι είναι απαραίτητες περίπου 1×10^4 λεπτόσπειρες/ml για την παρατήρηση ενός κυττάρου ανά οπτικό πεδίο. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, καθώς η παρουσία ινώδους, συγκεκριμένων πρωτεϊνών ορού ή ακόμη και υπολειμμάτων κυττάρων, μπορεί να παραπλανήσει τον παρατηρητή,

οδηγώντας σε εσφαλμένα αποτελέσματα (ευαισθησία 40,2%, ειδικότητα 61,5%) (Arboleda et al., 2023). Για τον λόγο αυτό, η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου δεν συνιστάται ως μοναδική μέθοδος διάγνωσης. Η ακρίβεια της εξέτασης επηρεάζεται επίσης από τον χρόνο της συλλογής των δειγμάτων, καθώς και από την εμπειρία του εργαστηριακού προσωπικού (Toyokawa et al., 2014).



Εικόνα 20. Μικροσκόπηση σκοτεινού πεδίου (Marinho, 2012)

Μικροσκοπία Σκοτεινού Πεδίου και Αντίθεσης Φάσης

Με τη μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης, οι λεπτόσπειρες εμφανίζονται ως λεπτές, φωτεινές, ενεργά κινητές ράβδοι, οι οποίες κινούνται με χαρακτηριστική ταχεία περιστροφή και «σπασμωδική» κινητικότητα. Για να είναι ορατό ένα κύτταρο ανά πεδίο, απαιτούνται περίπου 10 λεπτόσπειρες ανά mL. Ωστόσο, μετά την πρώτη εβδομάδα λοίμωξης, μειώνονται οι πιθανότητες για αξιόπιστη διάγνωση, καθώς οι συγκεντρώσεις των λεπτοσπειρών στο αίμα πέφτουν σημαντικά. Ένα άλλο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι τόσο οι ψευδώς θετικές όσο και οι ψευδώς αρνητικές διαγνώσεις είναι συχνές, ακόμα και όταν η ανάλυση γίνεται από έμπειρο προσωπικό (Budihal & Perwez, 2014; Levett, 2001).

Ιστοχημικές Χρώσεις

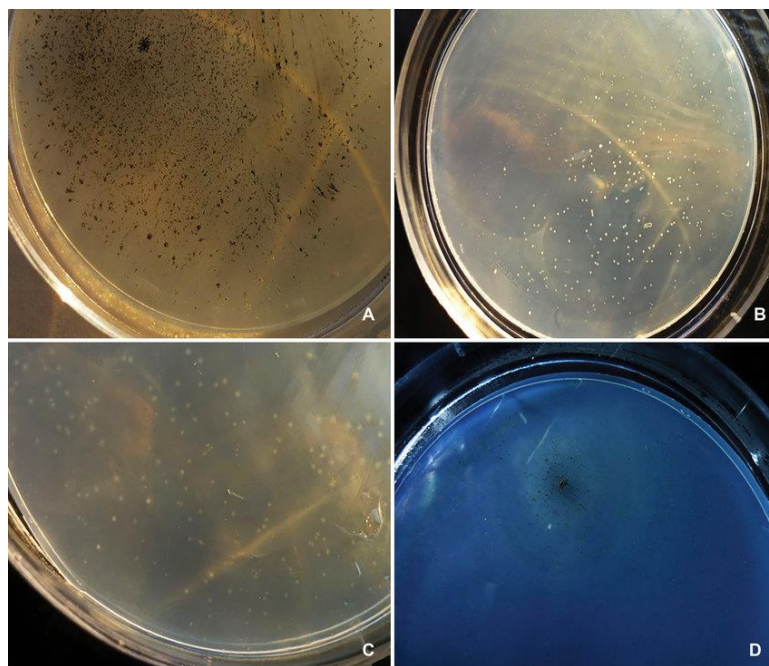
Έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των λεπτοσπειρών σε κλινικά δείγματα, διάφορες ιστοχημικές χρώσεις. Οι πρώτες μέθοδοι περιλάμβαναν χρώσεις από ασήμι, ενώ η χρώση Warthin-Starry χρησιμοποιήθηκε ευρέως μεταγενέστερα (Budihal & Perwez., 2014; Levett., 2001).

Ανοσοχρώση

Η ανοσοχρώση χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των λεπτοσπειρών σε περιπτώσεις όπου η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου δεν είναι εφικτή ή όταν οι λεπτόσπειρες είναι σπάνιες. Ωστόσο, απαιτείται ένα πρωτεύον αντίσωμα συγκεκριμένο για τον ορότυπο που αναζητείται, είτε μεμονωμένο είτε σε μίγμα ή σύνθετο μείγμα αντισωμάτων για διαφορετικούς ορότυπους. Αυτή η μέθοδος έχει αποδειχτεί λιγότερο αποτελεσματική σε πρώιμες λοιμώξεις (Budihal & Perwez, 2014; Levett, 2001).

8.1.1.2. Καλλιέργεια

Οι λεπτόσπειρες μπορούν να απομονωθούν από διάφορα κλινικά δείγματα, όπως ολικό αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), ούρα, αλλά και ιστικά δείγματα. Η καλλιέργεια αίματος συνιστάται να διενεργείται το ταχύτερο δυνατόν μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και πριν από τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής, καθώς η αντιβιοτική θεραπεία μπορεί να εξαλείψει τα παθογόνα και να περιορίσει σημαντικά τη φάση της λεπτοσπειραιμίας, μειώνοντας τις πιθανότητες απομόνωσης του παθογόνου. Η καλλιέργεια διενεργείται σε ειδικά εμπλουτισμένα θρεπτικά μέσα, με τα Fletcher και Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) να αποτελούν τα πλέον ενδεδειγμένα για την ανάπτυξη των λεπτόσπειρων *in vitro* (Εικ. 21). Τα παραπάνω θρεπτικά υλικά υποστηρίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων του γένους *Leptospira*, τα οποία απαιτούν ειδικές θερμοκρασιακές και θρεπτικές συνθήκες για να καταστούν ανιχνεύσιμα (Arboleda et al., 2023; Toyokawa et al., 2014).



Εικόνα 21. Αποικίες Λεπτόσπειρας σε EMJH agar a) *leptospira pathogens*, b) *Leptospira perdikensis*, c) *Leptospira ryugenii*, d) *Leptospira pathogens* (Yasouri et al., 2020)

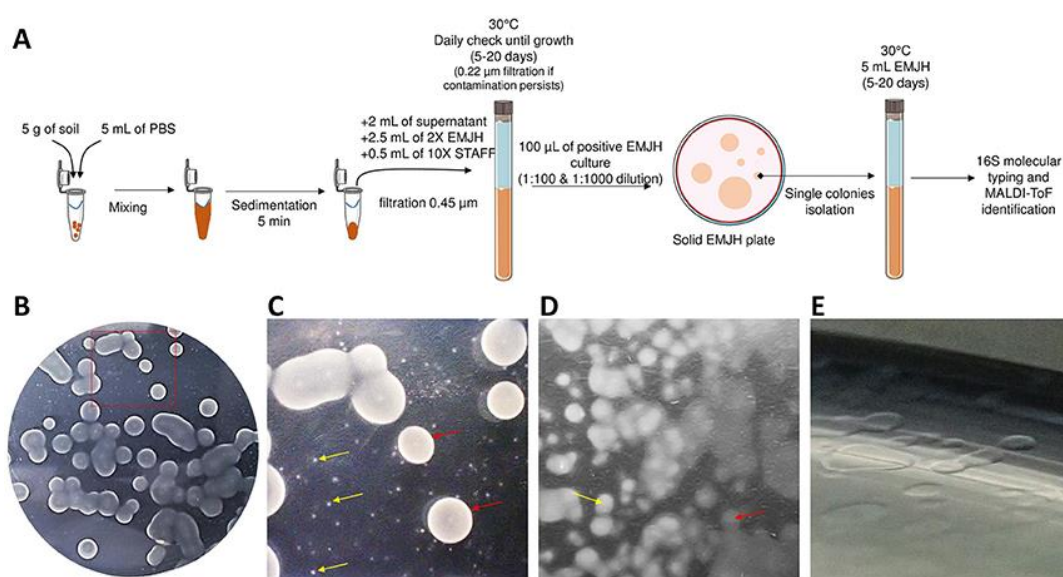
Η καλλιέργεια αποτελεί μια βασική, αν και χρονοβόρα, διαγνωστική μέθοδο απομόνωσης των λεπτοσπειρών. Η διαδικασία (Εικ. 22) περιλαμβάνει τον ενοφθαλμισμό σταγόνων αίματος σε 5–10 mL κατάλληλου θρεπτικού μέσου, όπως το *EMJH* ή το τροποποιημένο *Korthof medium* (Arboleda et al., 2023; Toyokawa et al., 2014). Το υλικό στη συνέχεια διαχωρίζεται σε πολλαπλά σωληνάρια καλλιέργειας. Έχει προταθεί και η χρήση πλάσματος, εκτός από ολικό αίμα, για την καλλιέργεια, ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι λεπτόσπειρες μπορούν να απομονωθούν ακόμα και από ηπαρινισμένο αίμα που έχει παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα έως και 109 ημερών. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη *Leptospira* έχουν τη δυνατότητα επιβίωσης σε μέσα καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων, αλλά απαιτείται ανακαλλιέργεια στα ειδικά-κατάλληλα υλικά για την ανάπτυξή τους (Toyokawa et al., 2014).

Η καλλιέργεια του ENY συνιστάται να πραγματοποιείται κατά την πρώτη εβδομάδα της νόσου, με ενοφθαλμισμό 0,5 mL ENY σε 5 mL ημιστερεού μέσου. Όσον αφορά τα ούρα, αυτά αποτελούν το καταλληλότερο βιολογικό δείγμα κατά τη φάση της λεπτοσπειρουρίας – περίπου μία εβδομάδα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Η βιωσιμότητα των λεπτοσπειρών στα όξινα ούρα είναι περιορισμένη· συνεπώς, ο ενοφθαλμισμός θα πρέπει να πραγματοποιείται εντός δύο ωρών από τη συλλογή, είτε με απευθείας προσθήκη μιας σταγόνας ούρων στο καλλιεργητικό μέσο, είτε μετά από φυγοκέντρηση και επαναιώρηση στα παραπάνω μέσα καλλιέργειας με δεκαπλάσιες

αραιώσεις. Τέλος, οι λεπτόσπειρες δύναται να απομονωθούν και από ιστικά μεταθανάτια δείγματα (Toyokawa et al., 2014).

Για την αποφυγή επιμολύνσεων στις καλλιέργειες, μπορούν να προστεθούν αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως νεομυκίνη, ναλιδιξικό οξύ, ακτιδιόνη, σουλφαδιαζόλη, ριφαμπικίνη, αμφοτερικίνη B καθώς και 5-φθοροουρακίλη. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 30°C και ελέγχονται τακτικά με μικροσκόπηση σκοτεινού πεδίου για την παρακολούθηση ανάπτυξης. Η αρχική ανάπτυξη των λεπτοσπειρών είναι βραδεία, με χρόνο διπλασιασμού περίπου 20 ωρών. Οι καλλιέργειες μπορούν να παραμείνουν ενεργές για έως και 13 εβδομάδες. Αν και η καλλιέργεια αποτελεί τη μέθοδο «αναφοράς» για την οριστική διάγνωση της λεπτοσπείρωσης, η χρησιμότητά της για έγκαιρη διάγνωση είναι περιορισμένη λόγω του αργού ρυθμού ανάπτυξης των παθογόνων, της ανάγκης για εξειδικευμένα μέσα, και της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου. Ωστόσο, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των *Leptospira* είναι ιδιαίτερα σημαντικά για επιδημιολογικές μελέτες, καθώς επιτρέπουν την τυποποίηση των απομονωμένων στελεχών, τόσο οροτυπικά όσο και γενετικά (Toyokawa et al., 2014).

Τα απομονωθέντα στελέχη *Leptospira* χαρακτηρίζονται περαιτέρω με οροτυπία ή μοριακή τυποποίηση. Η συμβατική μέθοδος οροτυποποίησης περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των οροομάδων με τη μικροσκοπική δοκιμασία συγκόλλησης (MAT) και τη δοκιμασία απορρόφησης διασταυρούμενης συγκολλητίνης (CAAT) (Arboleda et al., 2023; Waggoner & Pinsky, 2017; Musso & La Scola, 2013).



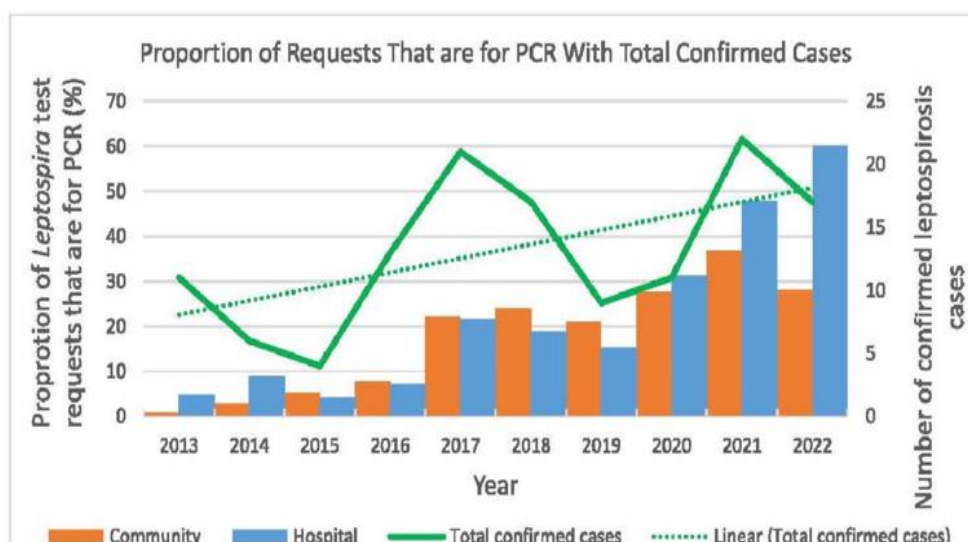
Εικόνα 22. Απομόνωση λεπτόσπειρας σε EMJH agar A) Μεθοδολογία απομόνωσης B) Μακροσκοπική όψη αποικιών, C) Διαφορετικά μεγεθών αποικιών D) διαφανείς αποικίες (Thibeaux et al., 2018)

8.1.1.3. Μοριακές Μέθοδοι

A) Πολλαπλασιασμός νουκλεϊκού οξέος- Polymerase chain reaction (PCR)

Η ταχεία και ακριβής διάγνωση της λεπτοσπείρωσης κατά την εισαγωγή του ασθενούς είναι κρίσιμη για την άμεση έναρξη θεραπείας και τη μείωση των επιπλοκών. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (NAATs), με επικρατέστερη την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η μοριακή ανίχνευση υπερτερεί της καλλιέργειας τόσο σε ευαισθησία όσο και χρονικά, καθώς παρέχει τη δυνατότητα για πρόωπη και έγκυρη διάγνωση κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, δηλαδή πριν την έναρξη της παραγωγής ειδικών αντισωμάτων (Arboleda et al., 2023; Waggoner & Pinsky, 2017; Musso & La Scola, 2013).

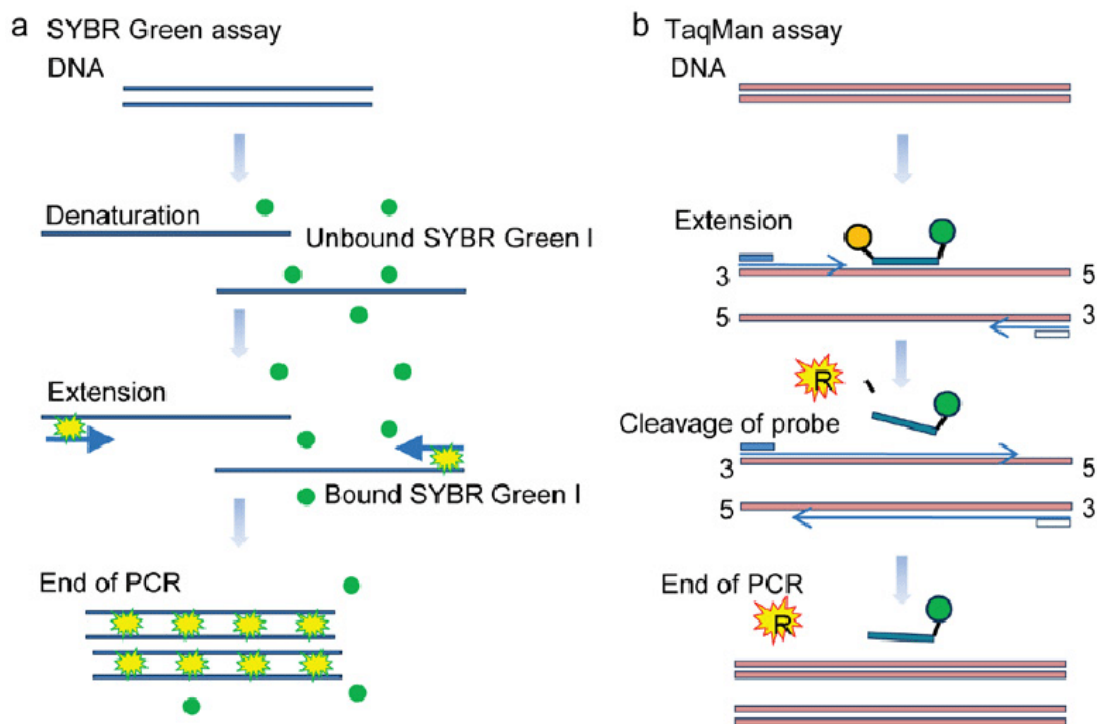
Η PCR μπορεί να ανιχνεύσει το DNA των λεπτοσπειρών στο αίμα ή τον ορό μεταξύ 5ης και 10ης ημέρας από την έναρξη των συμπτωμάτων, μέχρι και την 15η μέρα, όταν το βακτηριακό φορτίο κυμαίνεται από 10^5 έως 10^9 λεπτόσπειρες ανά λίτρο. Για την έγκαιρη διάγνωση, επαρκούν δείγματα ορού ή αίματος, με μεγαλύτερη ευαισθησία σε δείγματα αίματος που έχουν συλλεχθεί σε EDTA, καθώς το EDTA δεν αναστέλλει τη PCR, σε αντίθεση με την ηπαρίνη που δρα ως αναστολέας της ενίσχυσης. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη ακόμη και σε ασθενείς που έχουν ήδη ξεκινήσει αντιμικροβιακή θεραπεία, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει το DNA παθογόνων μη βιώσιμων που έχουν καταπολεμηθεί, αλλά δεν έχουν πλήρως εκκαθαριστεί από τον οργανισμό. Το δείγμα μπορεί να ληφθεί έως και δύο ημέρες από την έναρξη θεραπείας με αντιβιοτικά. Οι πιο συχνοί γενετικοί στόχοι είναι γενικοί στόχοι βακτηρίων, όπως *gyrB*, *rrs* (16S rRNA), *secY* ή ειδικοί παθογόνων *Leptospira* spp, όπως *lipL32*, *lfb1*, *ligA*, *ligB2*. Μεταξύ των τεχνικών, η συμβατική PCR αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη (45%), ακολουθούμενη από την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με ποσοστό 37% (Εικ. 23) (Arboleda et al., 2023; Waggoner & Pinsky, 2017; Musso & La Scola, 2013).



Εικόνα 23. Το ποσοστό αιτημάτων για τεστ PCR σε λεπτόσπειρα συγκριτικά με τον συνολικό αριθμό επιβεβαιωμένων περιπτώσεων λεπτοσπείρωσης, μαζί με τη σχέση μεταξύ του τελικού ετήσιου αριθμού επιβεβαιωμένων περιστατικών και του χρόνου αυτού (Hall et al., 2024)

Παρότι η συμβατική PCR είναι οικονομικότερη, τα αποτελέσματά της δεν είναι πάντοτε απολύτως σαφή, γεγονός που καθιστά προτιμότερη τη χρήση qPCR (quantitative PCR), RT-PCR (real time PCR) και ισοθερμικών τεχνικών ενίσχυσης. Η qPCR, ιδιαίτερα, είναι ταχύτερη, λιγότερο ευάλωτη σε επιμολύνσεις και συνδυάζει ενίσχυση και ανίχνευση σε μία αντίδραση, με εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα. Για την ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος χρησιμοποιείται συχνά το SYBR Green, μία οικονομική φθορίζουσα χρωστική, αν και λιγότερο ειδική συγκριτικά με την TaqMan, η οποία χρησιμοποιεί ειδικούς φθορίζοντες ανιχνευτές για μεγαλύτερη ακρίβεια (Εικ. 24) (Arboleda et al., 2023; Waggoner & Pinsky, 2017; Musso & La Scola, 2013).

Τέσσερις δοκιμασίες qPCR που βασίζονται σε SYBR Green ή TaqMan, στοχεύοντας τα secY, lfbI και lipL32, έχουν αξιολογηθεί σε πρόσφατες μελέτες, με τους συγγραφείς να προτείνουν συνεχή αναθεώρηση και ενδεχόμενη τροποποίηση εκκινητών (primers) και ανιχνευτών, προκειμένου να διατηρείται η διαγνωστική απόδοση των μεθόδων υψηλή, σε ένα εξελισσόμενο μικροβιακό περιβάλλον. Οι μοριακές άμεσες τεχνικές διάγνωσης (PCR και RT-PCR) είναι οι πλέον αξιόπιστες για την άμεση και ακριβή διάγνωση της λεπτοσπείρωσης (Arboleda et al., 2023; Waggoner & Pinsky, 2017; Musso & La Scola, 2013).



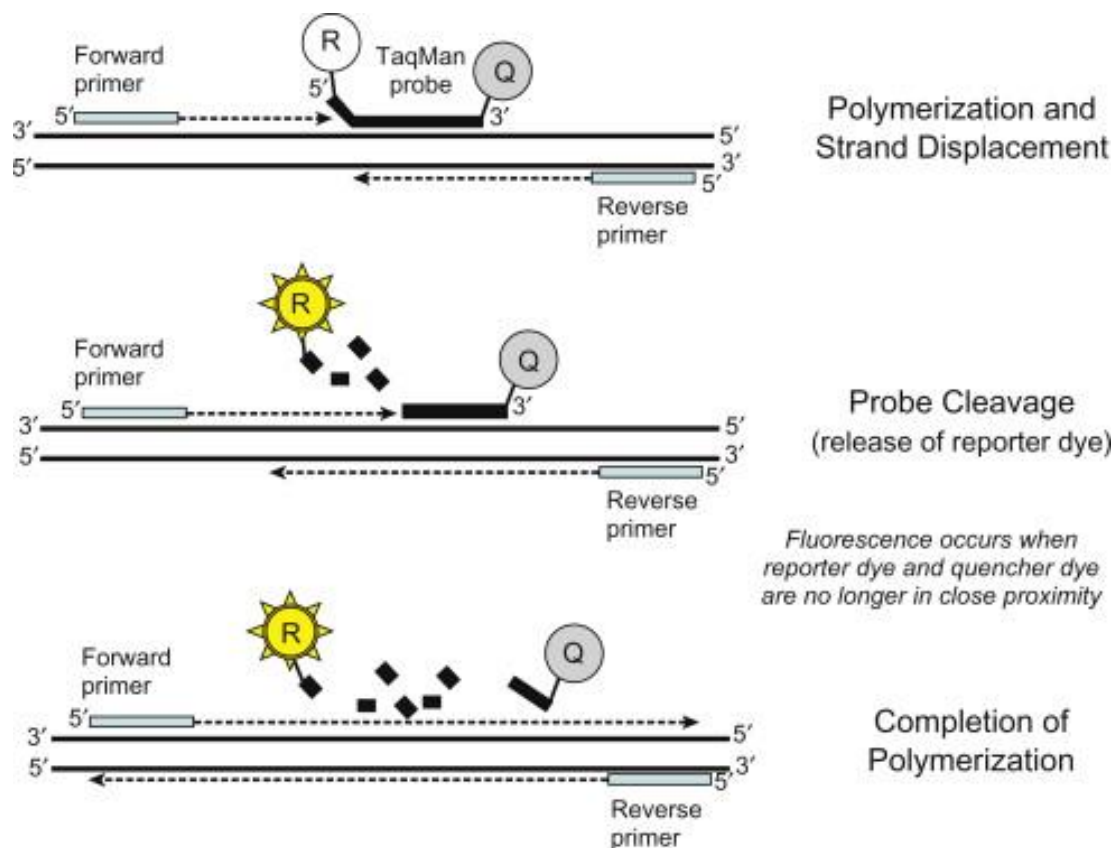
Εικόνα 24. Real-Time PCR; a) SYBR Green, b) TaqMan (Bae, 2013)

B) PCR Πραγματικού χρόνου-Real Time PCR (RT-PCR)

Η απέκκριση λεπτοσπειρών στα ούρα λαμβάνει χώρα κυρίως στο τέλος της οξείας φάσης της νόσου, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο βιολογικό υλικό μη κατάλληλο για πρώιμη διάγνωση. Παρ' όλα αυτά, η μοριακή ανίχνευση στα ούρα είναι χρήσιμη για τη διάγνωση κατά τη φάση της λεπτοσπειρουρίας, σε μεταθανάτιες αναλύσεις, καθώς και για τη χαρτογράφηση ζωικών δεξαμενών σε επιδημιολογικές μελέτες. Εκτός από τα ούρα, DNA της *Leptospira* spp. έχει εντοπιστεί επίσης στο ENY, στο υδατοειδές υγρό του οφθαλμού και σε νεφρικό ιστό, ενισχύοντας τη χρησιμότητα της μοριακής διάγνωσης σε ειδικά ή δύσκολα διαθέσιμα δείγματα. Η μέθοδος real-time PCR απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, διακριτό χώρο εργαστηρίου και προσωπικό υψηλής κατάρτισης. Αν και εφαρμόζεται ευρέως σε ερευνητικό επίπεδο, δεν έχει ακόμη καθιερωθεί παγκοσμίως ως πρότυπη διαγνωστική μέθοδος, περιοριζόμενη κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές χώρες, όπου η ενδημικότητα της νόσου είναι υψηλή (Esteves et al., 2018; WHO, 2003).

Η ποσοτική real-time PCR με ανιχνευτές TaqMan χρησιμοποιείται τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού παθογόνων από μη παθογόνα στελέχη

Leptospira spp., ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη βεβαιωμένη διαγνωστική της ισχύ. Η ποσοτικοποίηση του βακτηριακού φορτίου μέσω TaqMan ανιχνευτών και PCR ενδέχεται να έχει προγνωστική αξία, καθώς πιθανώς σχετίζεται με τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας, προσφέροντας ένα επιπλέον εργαλείο στην εκτίμηση της νόσου (Bharti et al., 2003). Οι ανιχνευτές TaqMan (Εικ. 25) φέρουν δύο φθορίζουσες ομάδες, μία στο 5' άκρο (reporter dye - R) και μία στο 3' άκρο (quencher dye - Q). Ο ανιχνευτής υβριδοποιείται στο DNA-στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές της PCR, με την θερμοκρασία υβριδισμού του να είναι υψηλότερη από εκείνη των εκκινητών, ώστε να υβριδοποιείται νωρίτερα στη διαδικασία ενίσχυσης. Η χρήση μικρών μορίων “minor groove binder” (MGB) στο 3' άκρο των ανιχνευτών μπορεί να επιτρέψει τον σχεδιασμό συντομότερων αλληλουχιών, με υψηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού, αυξάνοντας την ειδικότητα και σταθερότητα του υβριδικού δεσμού. Η μία φθορίζουσα “reporter” (R) συνδέεται στο 5' άκρο της αλληλουχίας, ενώ η δεύτερη “quencher” (Q) συνδέεται στο 3' άκρο (Butler, 2012; Smythe et al., 2002).

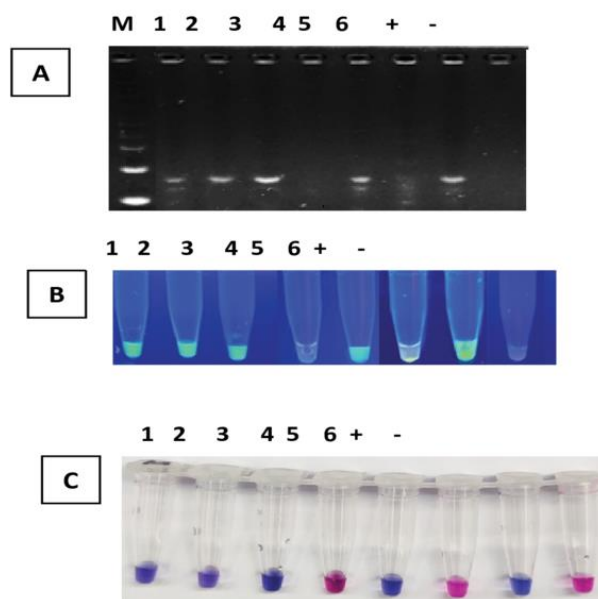


Εικόνα 25. rt-PCR με χρήση TaqMan ανιχνευτών (Butler, 2012)

Όταν η χρωστική αναφοράς βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από την χρωστική απόσβεσης θα προκύψει ελάχιστα έως και καθόλου φθορισμός επειδή γίνεται καταστολή του φθορισμού της χρωστικής αναφοράς λόγω μεταφοράς ενέργειας μεταξύ των δύο χρωστικών. Κατά τον πολυμερισμό, η σύνθεση του κλώνου εκτοπίζει ανιχνευτές TaqMan που έχουν υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία-στόχο. Όταν το μόριο της χρωστικής αναφοράς απελευθερωθεί από τον ανιχνευτή και δεν βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με τη χρωστική σβέσης μπορεί να ξεκινήσει η εκπομπή φθορισμού. Αν η αλληλουχία στόχος είναι συμπληρωματική με τον ανιχνευτή τότε παρουσιάζεται αύξηση σήματος φθορισμού. Σε περιπτώσεις που η αλληλουχία DNA και του ανιχνευτή δεν συνδεθούν σωστά, μπορούν να αποτύχουν στην σωστή ανίχνευση του πρότυπου DNA (Butler, 2012; Smith et al., 2002).

Γ) LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) – Ισοθερμική Μέθοδος Ενίσχυσης DNA

Μία πολλά υποσχόμενη, εναλλακτική στη μοριακή διάγνωση της λεπτοσπείρωσης, αποτελεί η μέθοδος LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), η οποία επιτρέπει την ενίσχυση του DNA σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς την ανάγκη για επαναλαμβανόμενες θερμικές μεταβολές, όπως στην PCR. Η μέθοδος βασίζεται σε ανάλυση της θολερότητας ή του φθορισμού του δείγματος (Εικ. 26), με αναλυτική ευαισθησία που κυμαίνεται μεταξύ 2–100 λεπτόσπειρων ανά αντίδραση, καθιστώντας την κατάλληλη για ανίχνευση σε πρώιμα στάδια της λοίμωξης, με πιθανά χαμηλότερη ειδικότητα. Ένα βασικό πλεονέκτημα της LAMP είναι η ευκολία αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, καθώς μπορούν να παρατηρηθούν οπτικά, ακόμη και με γυμνό οφθαλμό, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Αυτό την καθιστά ιδανική για εφαρμογή σε χώρες με περιορισμένους πόρους ή σε πεδία εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος, όπου η πρόσβαση σε τεχνολογικά μέσα είναι περιορισμένη. Αν και απαιτεί βήμα καθαρισμού του DNA πριν από την ανάλυση, οι συνολικές τεχνικές απαιτήσεις της είναι χαμηλές, καθιστώντας την μέθοδο οικονομικά προσιτή και ευέλικτη (Arboleda et al., 2023; Koizumi et al., 2012).



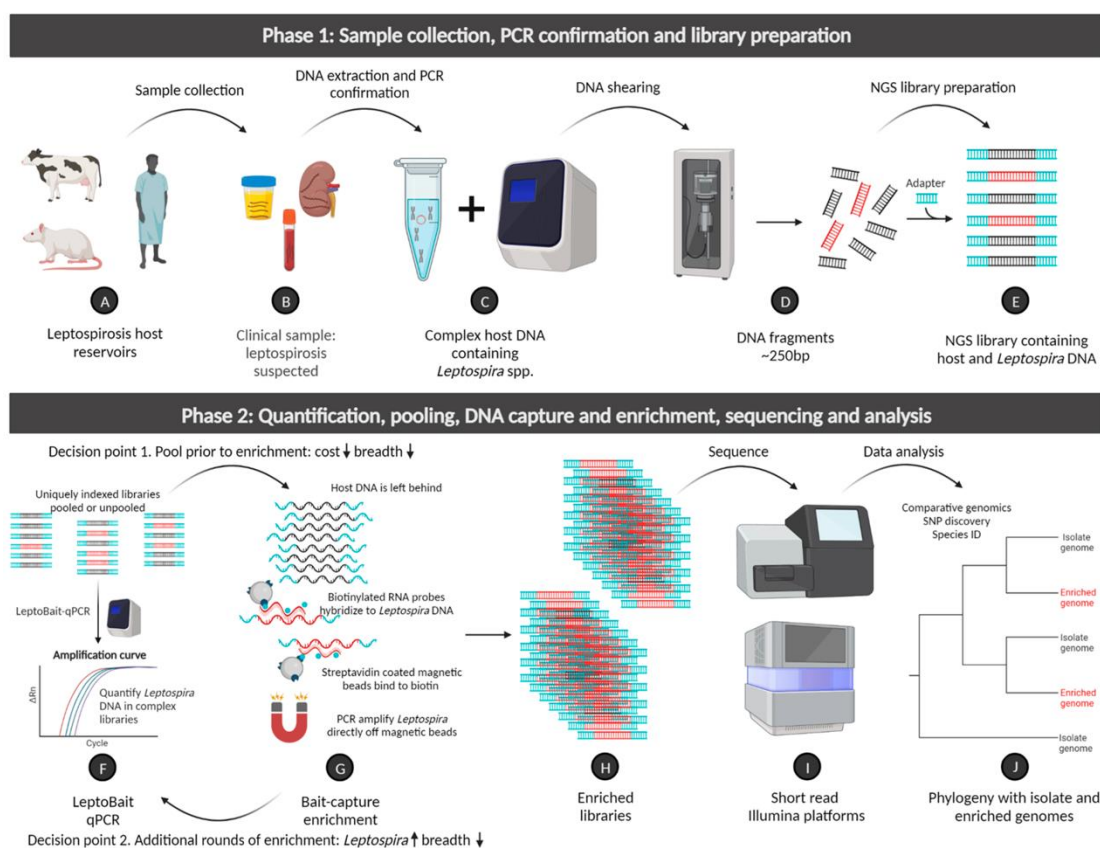
Εικόνα 26. Α) PCR, Β) Standard LAMP, Γ) Dry LAMP (Paraguison-Alili et al., 2022)

Υπάρχουν βασικές εφαρμογές της LAMP που έχουν αξιολογηθεί για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης. Διατίθεται τεχνική LAMP που στοχεύει το γονίδιο lipL41 και ανιχνεύει DNA της *Leptospira* χρησιμοποιώντας καθαρό DNA από νεφρικό ιστό ποντικού με όριο ανίχνευσης 100 γονιδιώματα ανά αντίδραση, καθώς και LAMP που στοχεύει το γονίδιο rrs (16S rRNA) (Arboleda et al., 2023; Koizumi et al., 2012).

Δ) Αλληλούχιση Γενετικού Υλικού (Sequencing)

Η τεχνολογία αλληλούχισης (sequencing) αναφέρεται στο σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανάγνωση της ακριβούς αλληλουχίας των βάσεων του DNA ή του RNA. Η γνώση της αλληλουχίας επιτρέπει την αποκρυπτογράφηση της γενετικής πληροφορίας ενός οργανισμού, αποτελώντας βασικό εργαλείο για τη μελέτη γονιδίων, γονιδιωμάτων και της γενετικής ετερογένειας. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών στην ιατρική μικροβιολογία έχει οδηγήσει σε προηγμένες διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές, με εφαρμογές σε διάφορους τομείς, από την ανθρώπινη υγεία έως την αγροβιοτεχνολογία και την περιβαλλοντική παρακολούθηση (Sanger et al., 1977).

Η αλληλούχιση (Εικ. 27) αναφέρεται στη διαδικασία της ανάλυσης και της αποκωδικοποίησης του γενετικού υλικού των βακτηρίων του γένους *Leptospira*, που προκαλούν τη νόσο της λεπτοσπείρωσης (Picardeau, 2017; Haake & Levett, 2015).



Εικόνα 17. Διαδικασίες για αλληλούχιση γενετικού υλικού (Stone et al., 2023)

Η αλληλούχιση του γενετικού υλικού της *Leptospira* spp., εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση στελεχών, τη χαρτογράφηση της γενετικής ποικιλομορφίας, αλλά και για τη βαθύτερη μελέτη του γονιδιώματος του παθογόνου (Ramos-Vázquez et al., 2024). Η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής έχει βελτιώσει σημαντικά την κατανόηση της επιδημιολογικής δυναμικής, συνεισφέροντας στον εντοπισμό νέων στελεχών λεπτόσπειρας, στην ανάλυση της μεταδοτικότητας, καθώς και στην αποτελεσματικότερη πρόληψη και θεραπεία της νόσου (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Η διαδικασία ξεκινά με την απομόνωση του γενετικού υλικού της λεπτόσπειρας από κλινικά δείγματα, όπως αίμα, ούρα, ENY ή και βιολογικά υγρά προερχόμενα από ζωικά είδη, που αποτελούν δεξαμενές του μικροβίου. Το DNA ή RNA του παθογόνου εξάγεται και «καθαρίζεται» με ειδικές τεχνικές. Συχνά προηγείται ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων γονιδιακών περιοχών, που είναι ενδεικτικές για το είδος *Leptospira*, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ποιότητα και η ποσότητα του γενετικού υλικού και να καταστεί εφικτή η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA, μέσω της

προσθήκης ειδικών προσαρμογέων (adapters) και μοριακών δεικτών (indexes). Η αλληλούχιση πραγματοποιείται είτε με τη χρήση της παραδοσιακής μεθόδου Sanger Sequencing, είτε με Next Generation Sequencing (NGS). Η NGS υπερτερεί, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάγνωση μεγάλων περιοχών του γονιδιώματος με υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και ταχύτητα. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό γονιδίων παθογένειας ή αντοχής, αλλά και για την καταγραφή φυλογενετικών συσχετίσεων με άλλους μικροοργανισμούς του ίδιου γένους ή οικογένειας (Picardeau, 2017; Haake & Levett, 2015).

Η τεχνολογία NGS επιτρέπει τη μαζική και παράλληλη αλληλούχιση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA, με δυνατότητα ανάλυσης ολόκληρων γονιδιωμάτων. Η μέθοδος αυτή προσφέρει υψηλή απόδοση, ταχύτητα και κλίμακα, καθιστώντας την κατάλληλη για μελέτες πληθυσμιακής γενετικής, ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών, καθώς και για πλήρη γονιδιωματική χαρτογράφηση της *Leptospira spp* (Picardeau, 2017).

Next Generation Sequencing (NGS) και mNGS (metagenomic NGS)

Η τεχνολογία του NGS και ειδικότερα η μεταγονιδιωματική προσέγγιση (metagenomic NGS – mNGS) αποτελεί μια ταχεία, ευαίσθητη και ολοκληρωμένη μέθοδο ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε βιολογικά δείγματα. Τα τελευταία χρόνια, το mNGS έχει αναδειχθεί ως ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στη διαγνωστική μικροβιολογία, επιτρέποντας την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας ή προκαθορισμένων διαγνωστικών στόχων. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια και ευαισθησία, παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης γνωστών, σπάνιων, αβέβαιων ή και νεοεμφανιζόμενων παθογόνων. Ενδεικτικά, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην έγκαιρη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης μέσω της ανίχνευσης του DNA της *Leptospira spp.* σε δείγματα αίματος κατά τη φάση της ενεργού λοίμωξης, συμβάλλοντας καθοριστικά στην αποφυγή λανθασμένης διάγνωσης και στην άμεση έναρξη κατάλληλης θεραπευτικής παρέμβασης (Gu et al., 2019).

Σε αντίθεση με τις στοχευμένες μοριακές τεχνικές, όπως η PCR ή ο υβριδισμός, το mNGS υιοθετεί μια ευρύτερη (unbiased) προσέγγιση. Το shotgun sequencing επιτρέπει την ανάλυση ολόκληρου του γενετικού υλικού ενός δείγματος, χωρίς να περιορίζεται σε συγκεκριμένα παθογόνα, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο εξαιρετικά ευέλικτη και προσαρμόσιμη σε πληθώρα κλινικών περιπτώσεων. Πέρα από

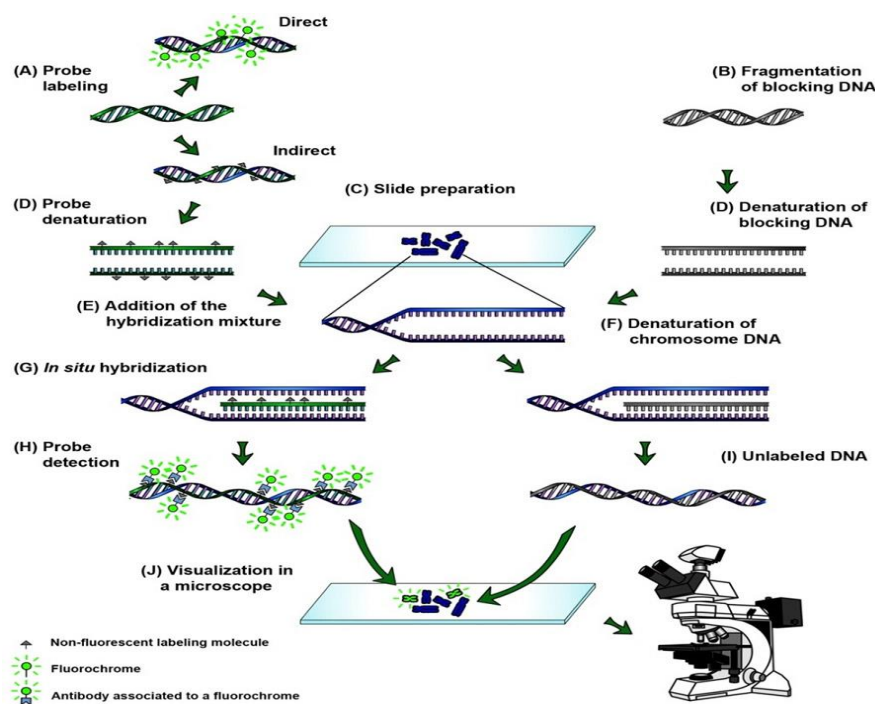
τη διάγνωση λοιμώξεων, η τεχνολογία NGS έχει ευρεία εφαρμογή στη μελέτη γενετικών γραμμών (lineage tracing), στην ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε αντιμικροβιακά, καθώς και στην ανάλυση του μικροβιώματος. Επιπλέον, προσφέρει εργαλεία για την επιδημιολογική επιτήρηση, τη γενετική τυποποίηση μικροβιακών στελεχών, την αξιολόγηση παραγόντων παθογένειας και την πρόβλεψη της ευαισθησίας ή αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Συνοψίζοντας, η ενσωμάτωσή της στην κλινική πράξη ανοίγει νέους ορίζοντες για την ακριβή διάγνωση, την παρακολούθηση της μικροβιακής αντοχής και την κατανόηση των οικοσυστημάτων του ανθρώπινου μικροβιώματος (Gu et al., 2019).

E) Τεχνικές υβριδισμού και εφαρμογές στη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης

Η μοριακή ανίχνευση παθογόνων του γένους *Leptospira* περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους υβριδισμού, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο υβριδισμός τύπου dot blot και ο in situ υβριδισμός, αξιοποιώντας σημασμένους ανιχνευτές DNA, που προέρχονται είτε από ολόκληρο το γονιδίωμα είτε από ειδικά επιλεγμένες αλληλουχίες-στόχους. Παραδοσιακά, οι τεχνικές αυτές βασίζονταν στη χρήση ραδιενεργά σημασμένων ανιχνευτών, γεγονός που ενέχει σημαντικούς περιορισμούς, γιατί απαιτεί εξειδικευμένες υποδομές βιοασφάλειας, αυστηρά πρωτόκολλα χειρισμού και εξοπλισμό υψηλής ακρίβειας. Αντιθέτως, η εφαρμογή εναλλακτικών, όπως ανιχνευτές DNA σημασμένοι με βιοτίνη σε συνδυασμό με ενζυματική δράση (enzyme-labeled hybridization probes), έχει προταθεί ως πιο λειτουργική και ασφαλής προσέγγιση. Ο in situ υβριδισμός αποτελεί επιπλέον ένα διαγνωστικό εργαλείο με εφαρμογή σε ιστολογικά παρασκευάσματα, ιδίως για την επιβεβαίωση της παρουσίας *Leptospira* σε ιστικά τεμάχια φορέων-δεξαμενών ή σε περιπτώσεις θανατηφόρων λοιμώξεων. Παρ' όλα αυτά, η περιορισμένη ευαισθησία και ο αυξημένος χρόνος επεξεργασίας μειώνουν τη χρηστικότητά του στη διαγνωστική ρουτίνας (Schreier, 2013; Ahmed, 2012). Σύμφωνα με μελέτες, η χρήση ειδικών ανιχνευτών ανασυνδυασμένου DNA μπορεί να συμβάλει τόσο στη διαγνωστική ταυτοποίηση όσο και στην οροτυπική ταξινόμηση στελεχών *Leptospira*, παρέχοντας ένα αξιόπιστο και εύελκτο εργαλείο με ευρεία εφαρμογή στο σύνολο του γένους (Schreier, 2013; Ahmed, 2012).

Αναλυτικότερα, ο in situ υβριδισμός (ISH) αποτελεί μία μοριακή ιστοχημική τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση και απεικόνιση ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) εντός ιστών ή μικροοργανισμών. Η μέθοδος βασίζεται στην

υβριδοποίηση σημασμένων μορίων-ανιχνευτών, τα οποία είναι συμπληρωματικά προς τις στοχευόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, επιτρέποντας τον ακριβή εντοπισμό παθογόνων απευθείας σε ιστολογικά παρασκευάσματα, χωρίς την ανάγκη απομόνωσης ή καλλιέργειας του γενετικού υλικού. Η ειδικότητα των παραγόμενων σημάτων αποτελεί κρίσιμο σημείο για την αξιοπιστία της τεχνικής ISH. Για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων, εφαρμόζονται διάφοροι έλεγχοι, όπως: (α) προεπεξεργασία με RNase ή DNase, ανάλογα με το αν ο στόχος είναι RNA ή DNA (β) έλεγχος με παράλειψη του ανιχνευτή κατά την αντίδραση υβριδισμού (γ) χρήση μη ειδικών ανιχνευτών (δ) ανταγωνιστικός υβριδισμός με μη σημασμένους ανιχνευτές (ε) συμπληρωματικές τεχνικές, άλλοι υβριδισμοί (western ή northern blot) (στ) συνδυασμός ISH με ανοσοϊστοχημεία (Jin & Lloyd, 1997). Η επιτυχία της αντίδρασης υβριδισμού εξαρτάται από την ικανότητα του ανιχνευτή να δεσμεύεται συμπληρωματικά στον στόχο υπό συνθήκες κάτω από το σημείο τήξης (T_m) (Εικ. 28). Παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της υβριδοποίησης περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία της αντίδρασης, τη συγκέντρωση μονοσθενών κατιόντων, την παρουσία οργανικών διαλυτών, το pH του διαλύματος και άλλα μόρια όπως ssDNA, tRNA, polyA, που μπορεί να τροποποιήσουν τη σταθερότητα των υβριδίων. Οι ανιχνευτές μπορούν να είναι σημασμένοι είτε ραδιοϊσοτοπικά είτε μη ραδιοϊσοτοπικά. Οι ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές, ανιχνεύονται με φωτογραφικό φιλμ ή φωτογραφικό gel, ενώ οι μη ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές, χρησιμοποιούν είτε άμεσες είτε έμμεσες μεθόδους σήμανσης. Στις άμεσες μεθόδους, ο ανιχνεύσιμος δείκτης (π.χ. φθορίζουσα ουσία) συνδέεται απευθείας με τον ανιχνευτή, επιτρέποντας άμεση οπτική ανίχνευση των υβριδίων. Στις έμμεσες μεθόδους, ο ανιχνευτής φέρει μόριο αναφοράς όπως βιοτίνη, DIG (digoxigenin) ή FITC, το οποίο ανιχνεύεται μέσω ειδικών αντισωμάτων σε συνδυασμό με ενζυματική ή φθορίζουσα αντίδραση (Brammer et al., 2013). Το DNA της λεπτόσπειρας σε ιστό έχει ανιχνευθεί με υβριδισμό *in situ* χρησιμοποιώντας βιοτίνη (αντίδραση υπεροξειδάσης) ή ανιχνευτές σημασμένους με φλουορεσκεΐνη. Η τεχνική βρέθηκε να έχει παρόμοια ευαισθησία, αλλά είχε ως αποτέλεσμα λιγότερη χρώση υποβάθρου σε σύγκριση με την χρώση ανοσοϋπεροξειδάσης, ωστόσο παρουσίασε χαμηλότερη ένταση σήματος (Schreier, 2013).



Εικόνα 28. Η διαδικασία του In Situ υβριδισμού (Brammer et al., 2013)

Η προετοιμασία του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε από καλλιέργειες *Leptospira* που αναπτύχθηκαν σε εμπλουτισμένο μέσο EMJH (Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris). Για τον καθαρισμό του DNA εφαρμόστηκε φυγοκέντρηση βαθμίδωσης πυκνότητας με χλωριούχο καισίου, μια μέθοδος υψηλής καθαρότητας που εξασφαλίζει την απομόνωση ακέραιου και ποιοτικά κατάλληλου DNA. Για την εκτίμηση της γενετικής ομολογίας μεταξύ διαφορετικών στελεχών του γένους *Leptospira*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του υβριδισμού στυπώματος (slot blot hybridization), με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές προερχόμενους από γονιδιωματικό DNA. Η ένταση των παραγόμενων σημάτων ποσοτικοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της γενετικής συγγένειας και του βαθμού ομολογίας μεταξύ των εξεταζόμενων στελεχών. Για τη φυλογενετική ανάλυση, τα δεδομένα υβριδισμού υποβλήθηκαν σε επεξεργασία μέσω του υπολογιστικού προγράμματος KITSCH, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία φυλογενετικού δέντρου βασισμένου στην ομοιότητα των αλληλουχιών DNA. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης αποκάλυψε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ 16 στελεχών αναφοράς (όπως τα *australis*, *canicola*, *romona*) και 66 επιπλέον στελεχών πεδίου, υποδεικνύοντας κλάδους με υψηλό βαθμό γενετικής συσχέτισης (Ramadass et al., 1992).

Η μελέτη του Ramadass και συν. (1992) ανέδειξε σημαντική γενετική ποικιλομορφία μεταξύ διαφόρων στελεχών του γένους *Leptospira*, με τις ομάδες *L.*

interrogans και *L. borgpetersenii* να σχηματίζουν διακριτές γενετικές συστάδες (genomic clusters). Τα στελέχη αξιολογήθηκαν για την ικανότητα ανάπτυξης σε διαφορετικές θερμοκρασίες (13°C, 29°C και 37°C), καθώς και για την αντοχή τους παρουσία αναστολέων της νουκλεοτιδικής σύνθεσης, όπως η 8-αζαγουανίνη και η 2,6-διαμινοπουρίνη. Η ανάπτυξη καταγράφηκε για διάστημα 28 ημερών. Σε περιπτώσεις όπου δεν παρατηρήθηκε αρχικά ανάπτυξη, εφαρμόστηκε ανακαλλιέργεια για την επαλήθευση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της ομολογίας DNA ανέδειξαν διαφορετικούς βαθμούς γενετικής συγγένειας μεταξύ των οροειδών, με ορισμένα στελέχη να παρουσιάζουν υψηλότερη γενετική ομοιότητα, υποδεικνύοντας ενδογενείς εξελικτικές σχέσεις. Η ολοκληρωμένη φυλογενετική και φαινοτυπική ανάλυση κατέδειξε ότι τα στελέχη μπορούσαν να ταξινομηθούν σε διακριτά γενετικά είδη, μεταξύ των οποίων τα *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* και άλλα συγγενή είδη, επιβεβαιώνοντας την πολυμορφία και την εξελικτική διαφοροποίηση εντός του γένους *Leptospira* (Ramadass et al., 1992).

8.1.2. ΕΜΜΕΣΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πρόκειται για μεθόδους με τις οποίες ανιχνεύονται κυρίως αντισώματα του μικροοργανισμού στον ορό αίματος, είτε αντισώματα ειδικά για κάθε ορότυπο.

8.1.2.1. Ορολογικές/Ανοσολογικές Μέθοδοι

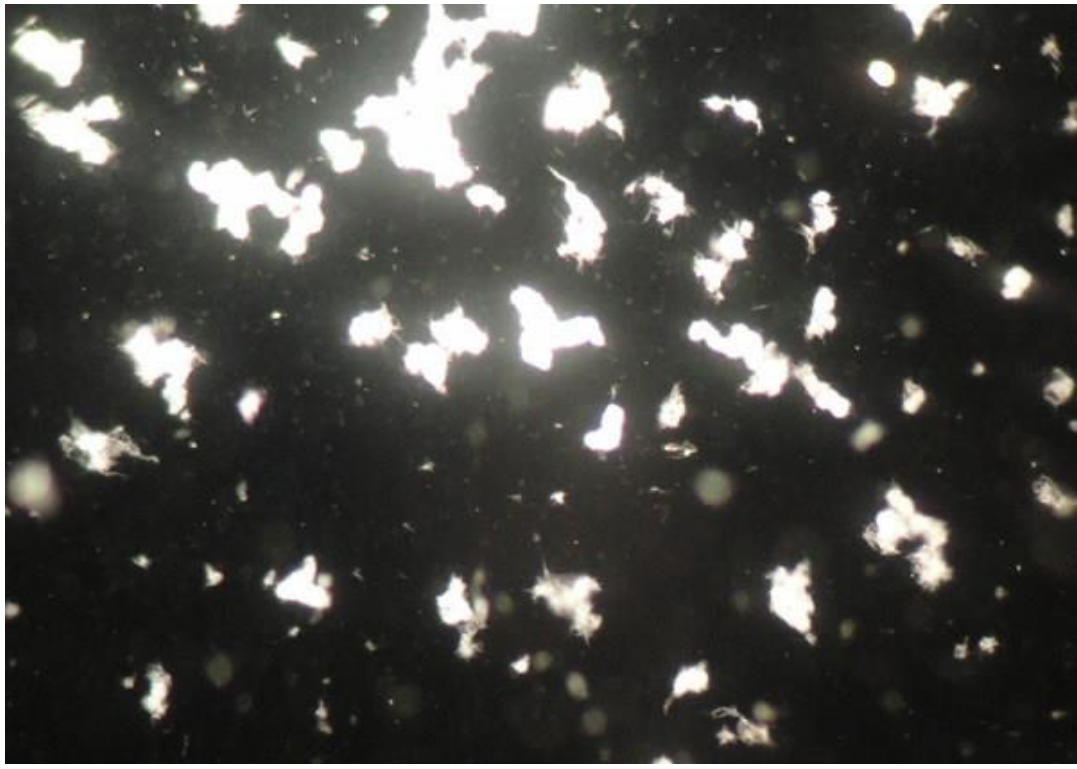
i) MAT (Microscopic Agglutination Test)

Η MAT (μικροσκοπική δοκιμασία συγκολλητινοαντίδρασης) είναι μια ορολογική τεχνική και θεωρείται το gold standard για την διάγνωση της λεπτοσπείρωσης. Είναι μια δοκιμασία για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ενός ασθενούς, τα οποία συγκολλούνται αναμειγνύοντας τα σε διάφορες αραιώσεις με ζωντανά ή νεκρά βακτήρια λεπτόσπειρας. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάμιξη του πλάσματος του ασθενούς με ζωντανά καλλιεργημένα στελέχη *Leptospira* σε σωλήνες ή μικροπλάκες. Εάν στο δείγμα του ασθενούς υπάρχουν ειδικά αντισώματα, τότε προκαλείται συγκόλληση και συσσωμάτωση των βακτηρίων, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί με μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου (Εικ. 29). Το αποτέλεσμα της συγκολλητινοαντίδρασης επιτρέπει τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων,

καθώς και του πιθανού ορότυπου που προκάλεσε τη μόλυνση (Arboleda et al., 2023; WHO, 2003; Levett, 2001).

Η MAT παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και εξαιρετική ειδικότητα, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλοί ορότυποι *Leptospira*. Είναι ικανή να διαχωρίσει ορότυπους, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό για επιδημιολογική επιτήρηση. Μπορεί να ανιχνεύσει παρελθούσα λοίμωξη, καθώς τα αντισώματα μπορούν να παραμείνουν ανιχνεύσιμα για μήνες μετά την έκθεση. Παρόλ' αυτά, απαιτεί συντήρηση ζωντανών στελεχών *Leptospira*, καθιστώντας την μέθοδο δαπανηρή, πολύπλοκη και κατάλληλη μόνο για εξειδικευμένα εργαστήρια. Η απόδοσή της εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή, καθώς σε ενδημικές περιοχές ενδέχεται να ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι MAT σε άτομα χωρίς ενεργή λοίμωξη, λόγω προηγούμενης έκθεσης. Η διάγνωση πρώιμου σταδίου είναι δύσκολη, καθώς η παραγωγή αντισωμάτων συνήθως καθυστερεί. Υπάρχει, παρά την καλή της ειδικότητα, πιθανότητα ορολογικής διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ στελεχών διαφορετικών ορότυπων, περιορίζοντας ενίοτε την ειδικότητα του αποτελέσματος (Arboleda et al., 2023; Guerra, 2013; Levett, 2001).

Η MAT χρησιμοποιείται κυρίως για επιβεβαίωση της διάγνωσης σε ασθενείς με κλινικά συμβατή εικόνα (πυρετός, ίκτερος, μυαλγίες) και ιστορικό έκθεσης σε ζώα ή υδάτινα περιβάλλοντα που ενδέχεται να είναι μολυσμένα από *Leptospira* (Shivakumar & Krishnakumar, 2006). Παρότι παραμένει το βασικό εργαλείο για επιδημιολογική καταγραφή και τυποποίηση στελεχών *Leptospira*, η MAT συχνά συνδυάζεται με μοριακές τεχνικές όπως η PCR και η καλλιέργεια, για αυξημένη διαγνωστική ακρίβεια και έγκαιρη ανίχνευση της λοίμωξης (Arboleda et al., 2023; Shivakumar & Krishnakumar, 2006; Levett, 2001).



Εικόνα 29. Θετική 100% αντίδραση συγκόλλησης σε MAT (Asokan et al., 2017)

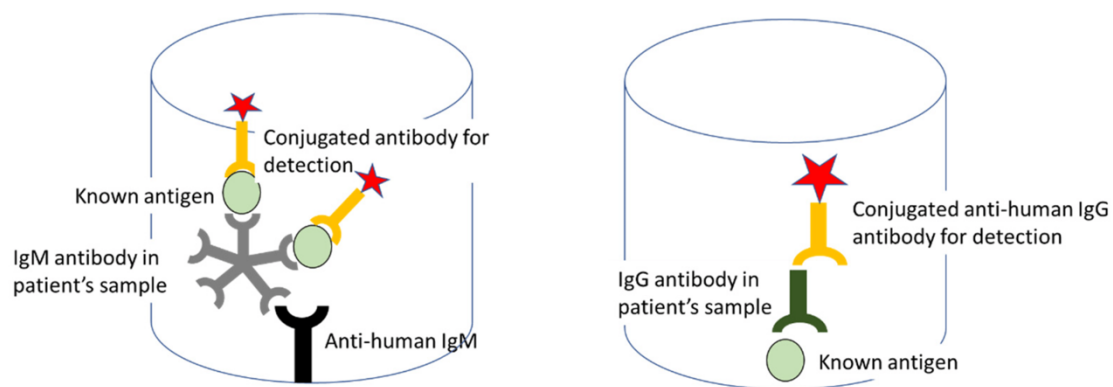
Για τη σωστή εφαρμογή της μεθόδου MAT, είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων αντιγόνων, τα οποία περιλαμβάνουν στελέχη *Leptospira* που αντιπροσωπεύουν τους κυκλοφορούντες ορότυπους της συγκεκριμένης γεωγραφικής περιοχής, καθώς και εκείνους που απαντώνται στους ξενιστές που διερευνώνται (Arboleda et al., 2023). Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, καθώς τα συγκεκριμένα στελέχη μπορεί να μην είναι διαθέσιμα σε όλα τα εργαστήρια, ειδικά σε αναπτυσσόμενες περιοχές. Ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου MAT είναι ότι απαιτεί τουλάχιστον 7–10 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, ώστε να ανιχνευτούν τα ειδικά αντισώματα. Σε αυτή τη διαδικασία τα δείγματα του ορού του ασθενή, τα οποία έχουν αραιωθεί, αναμιγνύονται με καλλιέργειες λεπτόσπειρων σε αναλογία 1:1 και το προϊόν επωάζεται στους 30°C είτε σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση είναι θετική όταν το ποσοστό των ελεύθερων λεπτόσπειρων είναι μικρότερο του 50% συγκριτικά με το εναιώρημα ελέγχου. Ανιχνεύει και τα δύο είδη αντισωμάτων IgM και IgG. Το πιο καθοριστικό κριτήριο για τη διάγνωση θεωρείται η τετραπλάσια αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων ή η ορομετατροπή, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη συλλογή και επεξεργασία δύο δειγμάτων ορού. Το ένα δείγμα λαμβάνεται κατά την οξεία φάση και ένα δεύτερο στη φάση ανάρρωσης, με χρονική διαφορά 10–15 ημερών. (Toyokawa et al., 2014; Levett, 2001).

Το απαιτούμενο των διαδοχικών δειγμάτων μπορεί να είναι προβληματικό σε περιοχές με χαμηλό εισόδημα, περιορισμένη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη, ή σε περιβάλλοντα όπου συμπτώματα άλλων λοιμώξεων (π.χ. δάγκειος πυρετός, ελονοσία, τυφοειδής πυρετός) ομοιάζουν με αυτά της λεπτοσπείρωσης, οδηγώντας σε καθυστέρηση της διάγνωσης και της θεραπείας, και σε αυξημένη θνητότητα. Παρά τους περιορισμούς της, η MAT αποτελεί ιδιαίτερα αξιόπιστη μέθοδο και χρησιμοποιείται ευρέως στην επιδημιολογική επιτήρηση, επιτρέποντας τον εντοπισμό των κυριότερων ορότυπων του παθογόνου που κυκλοφορούν σε μια δεδομένη περιοχή (Shivakumar & Krishnakumar, 2006).

ii) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Η τεχνική ELISA αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη ορολογική μέθοδο (Εικ. 30) για την ανίχνευση ειδικών IgM αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου *Leptospira spp.* Τα αντισώματα IgM ανιχνεύονται συνήθως 4–5 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, δηλαδή νωρίτερα από την εμφάνιση των IgG, και παραμένουν ανιχνεύσιμα για τουλάχιστον 4-5 μήνες (Arboleda et al., 2023; Rosa et al., 2017). Η ELISA έχει το πλεονέκτημα ότι είναι τεχνικά απλή, δεν απαιτεί ιδιαίτερα εκπαιδευμένο προσωπικό, και μπορεί να παρέχει αποτελέσματα εντός 2–4 ωρών. Συνεπώς, είναι κατάλληλη για ευρεία χρήση σε μη εξειδικευμένα εργαστήρια, ιδίως σε περιοχές με περιορισμένους πόρους. Στην κλασική της μορφή, χρησιμοποιείται αντιγόνο από τον ορότυπο *hardjo*, το οποίο είναι προσδεμένο σε στερεά επιφάνεια, όπου επιτελείται η αντίδραση ανοσοσυμπλέγματος (Budihal & Perwez, 2014).

Παρόλο που η ευαισθησία της μεθόδου είναι καλή, η ELISA ενδέχεται να εμφανίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους σπειροχαίτες ή λοιμογόνους παράγοντες, περιορίζοντας την ειδικότητα σε ορισμένα περιστατικά. Ωστόσο, χρησιμοποιείται ευρέως ως διαγνωστικό εργαλείο πρώτης γραμμής, ειδικά για πρώιμη ανίχνευση, προτού καταστεί εφικτή η εφαρμογή πιο ειδικών μεθόδων όπως η MAT ή η PCR (Arboleda et al., 2023; Rosa et al., 2017; Budihal & Perwez, 2014).



Εικόνα 30. Στην ELISA ανιχνεύονται IgM και IgG για τη διάγνωση της λεπτόσπειρας (Samrot et al., 2021)

Η τεχνική ELISA για την ανίχνευση IgM αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου της *Leptospira* πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την προεπεξεργασία των δειγμάτων ορού με αραιωμένο ρευματοειδή παράγοντα (RF) (1:4), με στόχο την απενεργοποίηση των μη ειδικών IgM παραγόντων, που μπορεί να επηρεάσουν την ειδικότητα της ανάλυσης. Η διαδικασία βασίζεται στη χρήση ακατέργαστου αντιγόνου, προερχόμενου π.χ. από εκχύλισμα του στελέχους *L. biflexa* serovar *Patoc I*, το οποίο περιέχει επίτοπους ειδικούς του γένους, ικανούς να ανιχνεύσουν αντισώματα διαφόρων ορότυπων *Leptospira*. Μετά το τέλος της διαδικασίας, η οπτική πυκνότητα έναντι του τυφλού υποστρώματος αναγνώσκεται στα 405 nm και σε μήκος κύματος 650 nm. Κάθε κιτ περιλαμβάνει αρνητικό και θετικό μάρτυρα και βαθμονομητή (standard-πρότυπα). Η ένδειξη απορρόφησης αυτών σε μια δοκιμασία (που πραγματοποιείται σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Serion ELISA) αξιολογεί το αποτέλεσμα ως αρνητικό, που δεν υποδηλώνει ένδειξη πρόσφατης μόλυνσης, οριακό/ύποπτο, που υποδηλώνει πιθανή πρόσφατη μόλυνση ή θετικό, που υποδηλώνει πρόσφατη ή ενεργό οξεία λοίμωξη (Niloofa et al., 2015).

Η ευαισθησία του ELISA IgM/Slide Agglutination Test (SAT) έχει αποδειχθεί υψηλότερη από αυτή της MAT (Εικ. 31), καθιστώντας την κατάλληλη για πρώιμο έλεγχο (Niloofa et al., 2015; Brandão et al., 1998). Ωστόσο, η μέθοδος δεν είναι επαρκώς ειδική για επιβεβαίωση της διάγνωσης, καθώς δεν προσδιορίζει τον ορότυπο ή την οροομάδα. Επομένως, το θετικό αποτέλεσμα της ELISA πρέπει να επιβεβαιώνεται με MAT, ιδίως σε κλινικά περιστατικά (Arboleda et al., 2023).

SAT results	No. of serum samples with the indicated result by the following test:			
	IgM ELISA		MAT	
	Positive	Negative	Positive ^a	Negative
First serum sample ^b				
Positive	65	5	43	27
Negative	3	35	3	35
Second serum sample ^c				
Positive	100	2	100	2
Negative	1	5	3	3
Third serum sample ^d				
Positive	44	1	45	0
Negative	1	0	1	0

^a Titer, $\geq 1:100$.

^b Collected at between 1 and 35 days after the onset of infection (mean, 6 days).

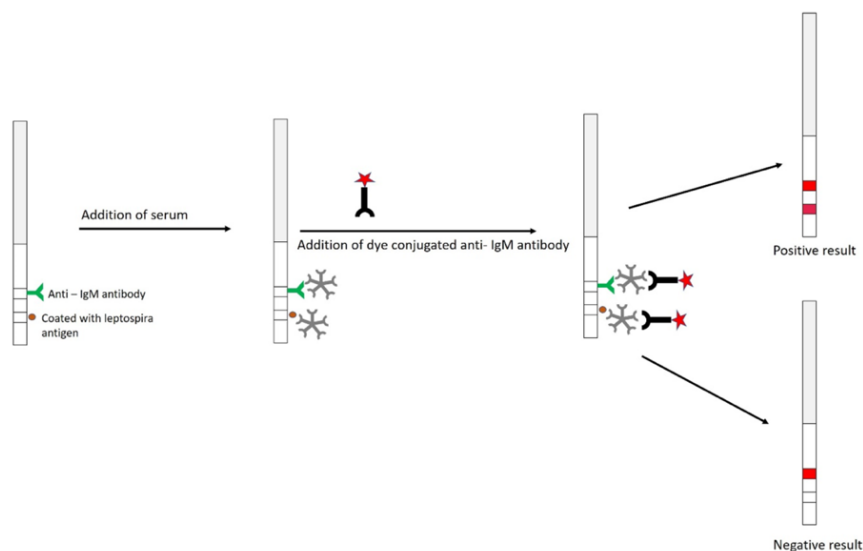
^c Collected at between 3 and 77 days after the onset of infection (mean, 17 days).

^d Collected at between 4 and 110 days after the onset of infection (mean, 28 days).

Εικόνα 31. Σύγκριση ELISA με MAT για την ανίχνευση αντισωμάτων με δείγματα ορού από 108 ασθενείς με λεπτοσπείρωση (Brandão et al., 1998)

iii) Ταχεία Δοκιμασία Ανίχνευσης Αντισωμάτων (Dipstick Test)

Οι ταχείες δοκιμασίες ανίχνευσης αντισωμάτων (rapid tests) αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την άμεση ανίχνευση αντισωμάτων IgM κατά της *Leptospira*, κυρίως σε περιοχές με περιορισμένη εργαστηριακή υποδομή ή σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Σπανιότερα μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντιγόνων της λεπτόσπειρας. Η τεχνολογία τους βασίζεται σε αρχές παρόμοιες με την ELISA (Εικ. 32), όπου χρησιμοποιούνται μονιμοποιημένα αντισώματα πάνω σε μια ταινία νιτροκυτταρίνης (dipstick format) (Behera et al., 2022; Schreier et al., 2013).



Εικόνα 32. Απεικόνιση της τεχνικής dipstick (Samrot et al., 2021)

Ο ασθενής υποβάλλεται σε λήψη αίματος ή ορού για να ανιχνευτούν αντισώματα κατά του βακτηρίου *Leptospira*. Το δείγμα τοποθετείται στην κατάλληλη περιοχή της ταινίας. Ανάλογα με τα αντισώματα του βακτηρίου που υπάρχουν στο δείγμα, η ταινία dipstick θα εμφανίσει μια ορατή αλλαγή χρώματος ή την εμφάνιση γραμμής στη θέση αντίδρασης του δείγματος, η οποία υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα. Σε αρνητικό αποτέλεσμα, αν δεν εντοπιστούν αντισώματα (ή αντιγόνα), η ταινία δεν εμφανίζει τη χαρακτηριστική γραμμή, παρά μόνο εμφάνιση γραμμής στη θέση του μάρτυρα, υποδεικνύοντας την εγκυρότητα κατά τη διενέργεια της εξέτασης (Behera et al., 2022; Schreier et al., 2013).

Τα αποτελέσματα της εξέτασης είναι διαθέσιμα συνήθως εντός λίγων λεπτών. Σε πρώιμα στάδια της νόσου ή σε ασθενείς με χαμηλή συγκέντρωση αντισωμάτων, η εξέταση μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η παρουσία άλλων λοιμώξεων ή η διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες βακτηριακές λοιμώξεις μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, γεγονός που απαιτεί επιβεβαίωση με πιο εξειδικευμένες διαγνωστικές μεθόδους. Αν και λιγότερο ακριβής από άλλες μεθόδους (Πίν. 2), όπως η PCR ή η καλλιέργεια, η μέθοδος με τη χρήση των dipstick tests είναι συνήθως οικονομική και εύκολα διαθέσιμη. Τέλος είναι πολύ απλά στη χρήση και δεν απαιτούν προηγμένη εργαστηριακή υποδομή, γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα σε περιοχές με περιορισμένη πρόσβαση σε ιατρικά εργαστήρια. Ωστόσο, λόγω της πιθανότητας ψευδών αποτελεσμάτων, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά ως πρώτο στάδιο διάγνωσης και πρέπει να ακολουθείται από

επιβεβαίωση μέσω πιο ακριβέστερων μεθόδων, όπως η PCR ή η καλλιέργεια, για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση (Behera et al., 2022; Schreier et al., 2013).

Πίνακας 2. Σύγκριση τεχνικής MAT με την IgM dot ELISA dipstick test και με το latex agglutination test (Behera et al., 2022).

Parameters	MAT Considered as Gold Standard Test (%)	Bayesian Latent Class Model (%)
Prevalence	15.0 (11.5–19.3)	18.0 (14.2–22.3)
Acute MAT		
Sensitivity	100	83.3 (72.8–91.3)
Specificity	100	99.9 (99.1–100)
PPV	100	99.5 (94.9–100)
NPV	100	96.5 (93.9–98.2)
rLigA/BCon1-5-based IgM Dot ELISA Dipstick Test		
Sensitivity	100 (91.3–100)	99.6 (96.0–100)
Specificity	95.5 (92.2–97.5)	98.9 (97.2–99.8)
PPV	79.7 (67.4–88.3)	95.2 (88.4–98.9)
NPV	100 (98.3–100)	99.9 (99.1–100)
rLigA/BCon1-5-based LAT		
Sensitivity	100 (91.3–100)	99.5 (95.2–100)
Specificity	96.5 (93.5–98.2)	99.9 (99.1–100)
PPV	83.6 (71.5–91.4)	99.6 (96.0–100)
NPV	100 (98.3–100)	99.9 (98.9–100)

iv) Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence, IF)

Η μέθοδος ανοσοφθορισμού και οι παραλλαγές της, όπως το FAT (Fluorescence Antibody Test) και το IFA (Indirect Fluorescent Antibody assay), χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της λεπτοσπείρωσης για πάνω από 50 χρόνια. Η βασική αρχή των μεθόδων αυτών είναι η χρήση αντισωμάτων που συνδέονται με φθορίζουσες ουσίες για τον εντοπισμό αντιγόνων ή αντισωμάτων στο δείγμα, τα οποία δεσμεύονται με τον

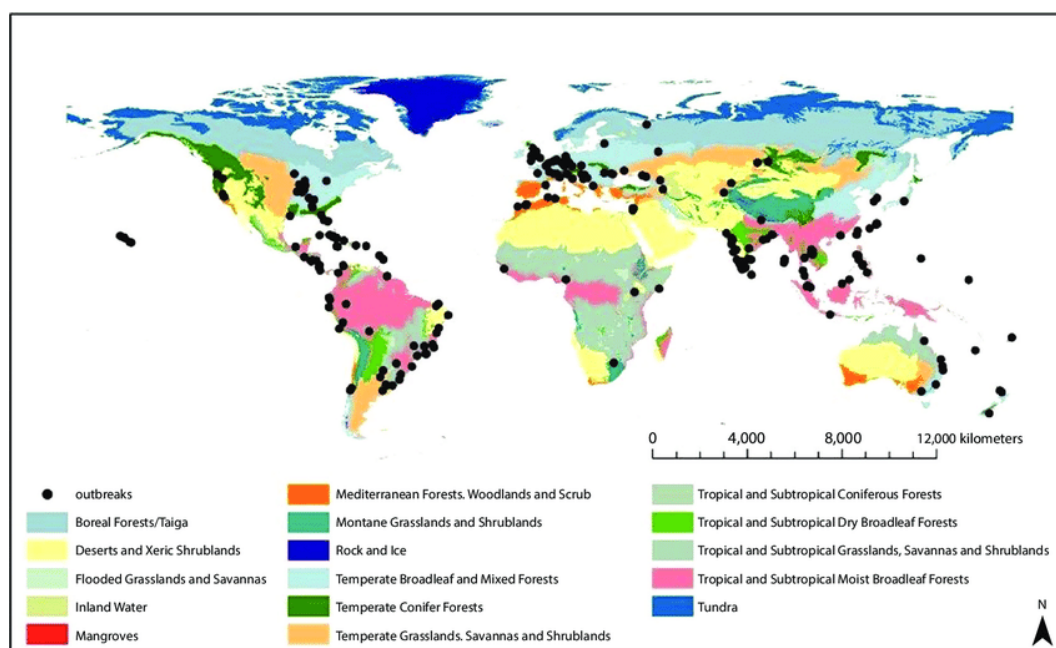
στόχο και επιτρέπουν την οπτικοποίησή του στο μικροσκόπιο μέσω φθορισμού. Αυτές οι μέθοδοι είναι οι εξής:

1. IFA (Indirect Fluorescent Antibody assay): εφαρμόζεται κυρίως για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG ή IgM σε δείγματα ορού. Τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν τα αντισώματα τοποθετούνται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα ή χρησιμοποιούνται ζωντανά αντιγόνα σε διάλυμα. Το δείγμα ορού (συνήθως σε αραιώσεις 1:100 έως 1:400) αναμειγνύεται με τα αντιγόνα, και μετά προστίθενται αντισώματα που συνδέονται με φθορίζουσες ουσίες κατά των IgG και IgM αντισωμάτων *Leptospira* που υπάρχουν στον ορό των ασθενών.
2. DIF (Direct Immunofluorescence, DIF)- Άμεσος ανοσοφθορισμός: Χρησιμοποιείται για την άμεση ανίχνευση των *Leptospira* σε ιστούς ή υγρά δείγματα. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της μόλυνσης σε ιστολογικά δείγματα (IF) ή δείγματα υγρών (FAT, Fluorescence Antibody Test) και έχει δείξει παρόμοια ευαισθησία με την PCR σε δείγματα καθαρής καλλιέργειας (Schreier et al., 2013).

Η μέθοδος IFA θεωρείται πιο ευαίσθητη στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, αν και η ευαισθησία της είναι ελαφρώς χαμηλότερη σε σύγκριση με την MAT. Επιπρόσθετα, η IFA και FAT παρέχουν άμεση διάγνωση μέσω της παρατήρησης φθορισμού και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανίχνευση αντισωμάτων ή των *Leptospira* σε κλινικά δείγματα. Οι μέθοδοι μπορεί να εμφανίσουν διασταυρούμενες αντιδράσεις ή μη ειδικές συνδέσεις των αντισωμάτων, οι οποίες ενδέχεται να μειώσουν την ειδικότητα της δοκιμασίας, αυξάνοντας το φθορίζον υπόστρωμα, δίνοντας έτσι ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Γι' αυτό, σε ορισμένες περιπτώσεις, εφαρμόζεται αντιστάθμιση, χρησιμοποιώντας καποιες αντίθετες χρωστικές (counterstaining), όπως το Eriochrome Black, για τη βελτίωση της οπτικοποίησης στο μικροσκόπιο φθορισμού. Συνολικά, οι μέθοδοι ανοσοφθορισμού παραμένουν σημαντικά εργαλεία για την διάγνωση της λεπτοσπείρωσης και για την ταχεία και ακριβή ανίχνευση των *Leptospira* σε κλινικά δείγματα (Schreier et al., 2013).

9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Πρόκειται για μια από τις πιο διαδεδομένες ζωοανθρωπονόσους παγκοσμίως (Εικ. 33), όπως προαναφέρθηκε, με κύρια πηγή μόλυνσης για το ανθρώπινο είδος την άμεση ή έμμεση επαφή συνήθως με ούρα από μολυσμένο ζώο. Παρατηρείται αυξημένη συχνότητα σε χώρες με θερμά κλίματα και λιγότερο συχνά σε εύκρατες περιοχές. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα της λεπτόσπειρας να διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε ζεστό περιβάλλον και με συνθήκες υγρασίας. Η νόσος είναι εποχική με εξάρσεις κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου σε εύκρατες περιοχές. Η θερμοκρασία λειτουργεί ως περιοριστικός παράγοντας για τη βιωσιμότητα της λεπτόσπειρας, ενώ κατά τις περιόδους βροχών αυξάνονται τα περιστατικά σε περιοχές με θερμά κλίματα, όπου η έντονη ξηρασία εμποδίζει την επιβίωση του βακτηρίου. Η νόσος συσχετίστηκε επίσης και με την εργασιακή απασχόληση και την επαγγελματική δραστηριότητα των ανθρώπων. Οι ανθρακωρύχοι, για παράδειγμα, αναγνωρίστηκαν ως η πρώτη ομάδα επαγγελματικού κινδύνου (Levett, 2001).



Εικόνα 33. Παγκόσμια κατανομή των επιδημιών ανθρώπινης λεπτοσπείρωσης που ελήφθη από συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση από το 1970 έως το 2012 (Munoz-Zanzi C., et al., 2020)

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), η λεπτοσπείρωση αποτελεί ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας, με περίπου 500.000 καταγεγραμμένα περιστατικά ετησίως, εκ των οποίων μεγάλο ποσοστό παρουσιάζει

σοβαρή κλινική εικόνα. Η θνησιμότητα σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να ξεπερνά το 10%, ιδίως όταν η διάγνωση καθυστερεί ή όταν η νόσος εξελίσσεται σε πιο βαριά μορφή, όπως η νόσος Weil. Παρά τα διαθέσιμα δεδομένα, η ακριβής εκτίμηση του παγκόσμιου φορτίου της νόσου παραμένει δύσκολη, λόγω ελλιπούς αναφοράς, περιορισμένης εργαστηριακής υποστήριξης και λανθασμένης διάγνωσης, καθώς τα συμπτώματα συχνά συγχέονται με εκείνα άλλων λοιμώξεων (Arboleda et al., 2023). Σύμφωνα με μια συστηματική ανασκόπηση 80 δημοσιευμένων μελετών νοσηρότητας και θνητότητας καθώς και βάση δεδομένων από 34 χώρες, υπολογίζεται ότι υπάρχουν 1,03 εκατομμύρια περιπτώσεις λεπτοσπείρωσης και 58.900 θάνατοι κάθε χρόνο. Οι εκτιμήσεις αυτές τοποθετούν τη λεπτοσπείρωση ως μια κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, η οποία ηγείται συγκριτικά με άλλες ζωνόσους (Arboleda et al., 2023; Haake & Galloway, 2021). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η πνευμονική συμμετοχή στη λεπτοσπείρωση, η οποία φαίνεται να αποτελεί ένα ολοένα αυξανόμενο φαινόμενο τα τελευταία χρόνια. Η συχνότητα εμφάνισης πνευμονικών εκδηλώσεων στη λεπτοσπείρωση κυμαίνεται διεθνώς μεταξύ 20% και 70%. Οι παγκόσμιες αναφορές αυτών των πνευμονικών εκδηλώσεων στη λεπτοσπείρωση έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Χαρακτηριστικά, το 2006, στη μητροπολιτική περιοχή του Σάο Πάολο της Βραζιλίας, αναφέρθηκε συχνότητα εμφάνισης της νόσου Weil με συνοδό πνευμονική αιμορραγία που έφτανε το 69% (Seguro & Andrade, 2013).

Η νόσος παρουσιάζει υψηλή ενδημικότητα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, με ποσοστό εμφάνισης που αγγίζει το 73% των παγκόσμιων περιστατικών. Περιοχές όπως η Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, η Αφρική, ο Δυτικός Ειρηνικός, η Καραϊβική, η Ωκεανία καθώς και η Νότια και Κεντρική Αμερική καταγράφονται ως τα γεωγραφικά διαμερίσματα με τη μεγαλύτερη επίπτωση. Σε αυτές τις περιοχές, σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες για τη διατήρηση και μετάδοση της νόσου είναι οι πλημμύρες, η κλιματική αλλαγή, η ανεπαρκής στεγανότητα των δικτύων αποχέτευσης, οι κακές συνθήκες υγιεινής και η αυξημένη παρουσία ξενιστών, όπως οι αρουραίοι, οι οποίοι αποτελούν βασική δεξαμενή για τη *Leptospira*. Η ετήσια επίπτωση της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 10-100 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού, ενώ σε περιόδους επιδημιών ή σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως εργάτες σε γεωργικές ή αποχετευτικές εργασίες, στρατιώτες ή άτομα που συμμετέχουν σε υπαίθριες δραστηριότητες και υγρό περιβάλλον, το ποσοστό αυτό μπορεί να αυξηθεί σημαντικά. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχουν καταγραφεί επιδημίες που σχετίζονται με χώρους αναψυχής και υδάτινα αθλήματα, αναδεικνύοντας τη σημασία της νόσου και σε ομάδες

που δεν κατατασσόνταν στους παραδοσιακούς πληθυσμούς κινδύνου (Costa et al., 2015; Guerra, 2013).

Σύμφωνα με δεδομένα που βασίζονται στον δείκτη “Years of Potential Life Lost” (YPLL), οι πέντε χώρες της Νότιας Αμερικής που φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από τη λεπτοσπείρωση είναι η Τρινιντάντ και Τομπάγκο, η Γουιάνα, ο Ισημερινός, το Σουρινάμ και η Κολομβία (Arboleda et al., 2023). Οι περιοχές αυτές παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας, τα οποία σχετίζονται με κοινωνικοοικονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η φτώχεια, η ανεπαρκής πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας και οι ασταθείς κλιματικές συνθήκες. Στην περιοχή Ασίας-Ειρηνικού, η λεπτοσπείρωση χαρακτηρίζεται ως υδατογενής ασθένεια, με σημαντικό αριθμό επιδημιών να έχει καταγραφεί τα τελευταία χρόνια. Ενδεικτικά, κρούσματα την τελευταία εικοσαετία στην Ινδονησία (2003), την Ινδία (2005), τη Σρι Λάνκα (2008) και τις Φιλιππίνες (2009) συνδέθηκαν με εκτεταμένες αστικές πλημμύρες, οι οποίες συνέβαλαν στη διασπορά των λεπτοσπειρών σε μολυσμένα ύδατα και στην αύξηση της ανθρώπινης έκθεσης. Οι ανεπαρκείς υποδομές υγιεινής σε συνδυασμό με τις θερμές και υγρές καιρικές συνθήκες αποτελούν βασικούς επιταχυντές της εξάπλωσης της νόσου σε περιοχές με πενιχρούς οικονομικούς πόρους. Παράλληλα, η νόσος απαντάται και σε αγροτικές περιοχές, όπου συχνά σχετίζεται με επαγγελματικές δραστηριότητες της υπαίθρου, όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία (Evangelista & Coburn, 2010).

Σε περιοχές όπου η λεπτοσπείρωση δεν καταγραφόταν συχνά στο παρελθόν, όπως ο Καναδάς και οι Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν αναφερθεί σποραδικά κρούσματα, τα οποία σχετίζονται κυρίως με δραστηριότητες σε φυσικά περιβάλλοντα παρουσία γλυκών νερών μολυσμένων από λεπτόσπειρες. Τα περιστατικά αυτά αποδίδονται εν μέρει στην κλιματική αλλαγή και τις μεταβολές στα πρότυπα θερμοκρασίας και βροχοπτώσεων, τα οποία ευνοούν την εξάπλωση του βακτηρίου (Evangelista & Coburn, 2010). Επιπλέον, σε περιοχές με υψηλή ενδημικότητα, η εμφάνιση κρουσμάτων συσχετίζεται συχνά με έντονες βροχοπτώσεις, οι οποίες παρασύρουν τις λεπτόσπειρες από το έδαφος και τις συγκεντρώνουν σε στάσιμα ύδατα, αυξάνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης και μετάδοσης της λοίμωξης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι χώρες γεωγραφικά απομακρυσμένες μεταξύ τους, όπως η Βραζιλία και το Ισραήλ, αναφέρουν μεταβολή στην επιδημιολογική εικόνα της νόσου, έτσι ώστε από σποραδικό αγροτικό πρόβλημα, να εξελίσσεται σε μια ασθένεια που προσλαμβάνει

αστική διάσταση, επηρεάζοντας πληθυσμούς εντός πόλεων (Evangelista & Coburn, 2010).

Στην Ευρώπη, αν και οι περισσότεροι από τους βασικούς επιδημιολογικούς παράγοντες που συνδέονται με την εξάπλωση της νόσου απουσιάζουν, εντούτοις παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα επιδημιολογικά δεδομένα της ανθρώπινης λεπτοσπείρωσης. Τοπικοί περιβαλλοντικοί και κλιματικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν τη συχνότητα των αναφερόμενων κρουσμάτων. Ενδεικτικά, στη Γαλλία και στην Τσεχία έχει παρατηρηθεί αύξηση της επίπτωσης της νόσου έπειτα από έντονες πλημμύρες, όπως αυτές του 1997 και του 2002. Στη Γερμανία, η αύξηση του πληθυσμού των αρουραίων και η επανεμφάνιση της λεπτοσπείρωσης στους σκύλους συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον ανθρώπινο πληθυσμό. Αντίστοιχα, στοιχεία από το Υπουργείο Υγείας της Πορτογαλίας για την περίοδο 2001–2005 δείχνουν αυξανόμενη επίπτωση στα νησιά των Αζορών, τα οποία πλέον αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 50% των ετήσιων κρουσμάτων στη χώρα (Pappas et al., 2008).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι ορότυποι *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona*, *L. hardjo* και *L. grippityphosa* καταγράφονται σε όλες τις ηπείρους, με εξαίρεση την Ανταρκτική. Η λεπτοσπείρωση μπορεί να προσβάλει ζώα όλων των ηλικιακών ομάδων, με τα νεαρότερα να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά νοσηρότητας. Συχνότερα επηρεάζονται τα βοοειδή, τα πρόβατα, οι αίγες, οι σκύλοι, τα άλογα και οι χοίροι, ενώ οι γάτες προσβάλλονται σπανιότερα (Yadeta et al., 2016). Η βιοποικιλότητα των λεπτοσπειρών στο περιβάλλον επηρεάζεται από τη γεωγραφία, το κλίμα, τις βιοτικές αλληλεπιδράσεις και τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Τη μετάδοση της λεπτοσπείρωσης επηρεάζουν έντονα οι περιβαλλοντικές συνθήκες τροποποιώντας τη βιολογία του πληθυσμού, τη συμπεριφορά ή την οικολογία της κοινότητας των σπειροχαιτών και των ξενιστών τους. Σε περιοχές όπως τα Μπαρμπάντος, έχουν εντοπιστεί μόνο τέσσερις παθογόνοι ορότυποι μεταδοτικοί στον άνθρωπο. Σε αστικά περιβάλλοντα, όπου οι κύριες πηγές μόλυνσης περιορίζονται συνήθως στους αρουραίους και στους σκύλους, η έκταση της νόσου και οι κυκλοφορούντες ορότυποι είναι επίσης περιορισμένοι. Αντίθετα, σε τροπικές περιοχές με μεγάλη ζωική ποικιλία – όπως η λεκάνη του Αμαζονίου ή η αγροτική Νοτιοανατολική Ασία – η ποικιλομορφία των παθογόνων λεπτόσπειρων που μολύνουν τα άγρια θηλαστικά είναι σημαντικά αυξημένη (Bharti et al., 2003). Η επιδημιολογία της λεπτοσπείρωσης επίσης παρουσιάζει στενή σύνδεση με την

παρουσία φυσικών ξενιστών, είτε πρόκειται για είδη που διαδραματίζουν ρόλο στη διατήρηση της λεπτόσπειρας στο περιβάλλον, είτε για τυχαίους ξενιστές που συμβάλλουν στην περιστασιακή μετάδοσή της. Η γεωγραφική κατανομή της νόσου επηρεάζεται σημαντικά από την οικολογική ποικιλομορφία, καθώς και από τις τοπικές περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες. Ενδεικτικά, στη Νότια Αμερική και συγκεκριμένα σε χώρες όπως η Βραζιλία και η Αργεντινή, καταγράφεται σημαντική ενδημικότητα, γεγονός που αποδίδεται εν μέρει στην ιδιαίτερα πλούσια ποικιλία ζωικών ειδών, που ευνοούν τη διατήρηση του βακτηρίου στο περιβάλλον (Cilia et al., 2021).

Η χώρα με την υψηλότερη συχνότητα λεπτοσπείρωσης παγκοσμίως είναι η Σρι Λάνκα με περισσότερους από 700 θανάτους ετησίως και εκτιμώμενη ετήσια εισαγωγή στα νοσοκομεία 52.1 ασθενείς σε πληθυσμό 100.000. Ωστόσο δεν είναι ο ακριβής αριθμός κρουσμάτων καθώς υπάρχει ελλιπής διάγνωση. Στην χώρα έχουν καταγραφεί συχνές, πολλές και μεγάλες εξάρσεις λεπτοσπείρωσης κατά την τελευταία δεκαετία. Η πρώτη απομόνωση λεπτόσπειρας σε αίμα ανθρώπου καταγράφηκε το 1959 στο Colombo, και από τότε έχουν αναφερθεί περιστατικά σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές της χώρας (Warnasekara et al., 2019).

Στην Ελλάδα, τα δηλωμένα κρούσματα λεπτοσπείρωσης είναι σχετικά σπάνια, αλλά παρουσίασαν αυξητική τάση κατά τη δεκαετία 1998-2007. Τα κρούσματα είναι σημαντικά πιο συχνά στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες, κυρίως λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης σε αγροτικές και εξωτερικές δραστηριότητες. Σύμφωνα με τα δεδομένα, η Ελλάδα κατατάσσει τη λεπτοσπείρωση στην 5η θέση μεταξύ των κυριότερων ζωνοσών που μεταδίδονται στον άνθρωπο (Papa et al., 2009). Νεότερα στοιχεία του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) μεταξύ 2004-2023 δηλώθηκαν 529 κρούσματα με μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος 0,24/100.000 πληθυσμού και μέσο αριθμό κρουσμάτων ανά έτος 26,5. Υψηλή επίπτωση καταγράφηκε κατά τα έτη 2014 και 2015 που φάνηκε να οφείλεται στην αυξημένη συχνότητα κρουσμάτων στο νησί της Ζακύνθου, τα οποία αποτέλεσαν το 22,5% του συνόλου των κρουσμάτων που καταγράφηκαν εκείνη την περίοδο στη χώρα μας. Το 2023 υπήρξε εντονότατη έξαρση κρουσμάτων με καταγεγραμμένα 95 κρούσματα συνολικά, εκ των οποίων τα 45 αποδίδονται στις πλημμύρες των καταιγίδων Daniel και Elias στη Θεσσαλία. Τα Ιόνια νησιά, η Θεσσαλία και η Δυτική Ελλάδα είναι οι περιφέρειες που διαχρονικά παρουσιάζουν την υψηλότερη μέση ετήσια συχνότητα κρουσμάτων. Στην Ελλάδα είναι κυρίως μεμονωμένα τα κρούσματα και η

μέση ετήσια συχνότητα των κρουσμάτων λεπτοσπείρωσης ομοιάζει με τη συχνότητα των υπόλοιπων Ευρωπαϊκών χωρών (ΕΟΔΥ, 2023).

Ο Π.Ο.Υ αξιοποιεί τον δείκτη Disability-Adjusted Life Year (DALY) για την εκτίμηση του παγκόσμιου φορτίου της νόσου, υπολογίζοντας τα χρόνια υγιούς ζωής που χάνονται λόγω πρόωρου θανάτου ή μόνιμης αναπηρίας που σχετίζεται με τη λεπτοσπείρωση (GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators, 2017). Η παγκόσμια ετήσια επίπτωση εκτιμάται σε 14,77 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού, με 1.030.000 περιστατικά και 58.900 θανάτους ετησίως, ιδίως σε τροπικές περιοχές κοντά στον Ισημερινό (Ασία, Ειρηνικός, Λατινική Αμερική). Η θνησιμότητα είναι υψηλότερη στις περιοχές αυτές και σχετίζεται στενά με πλημμύρες και επιδημικές εξάρσεις. Στην Ινδία, όπου η λεπτοσπείρωση είναι ενδημική από τις αρχές του 20ού αιώνα, καταγράφονται τακτικές επιδημίες. Το 2018, στην Κεράλα καταγράφηκαν 1.318 επιβεβαιωμένα κρούσματα με 95 θανάτους (θνητότητα 4%). Η υψηλότερη επίπτωση καταγράφεται κατά τη μονσούνα (Οκτώβριος–Νοέμβριος). Το 2007, στην Καρνατάκα αναφέρθηκαν 1.516 κρούσματα, ενώ το 2011 στη Νότια Γκουτζαράτ σημειώθηκαν 130 θάνατοι μέσα σε δύο μήνες. Πρόσφατα, καταγράφηκαν 209 νέα κρούσματα και 12 θάνατοι στην Κότσι, καθώς και 16 θάνατοι στη Σουράτ και τη Βαλσάντ (Costa et al., 2015).

Το 2022, καταγράφηκαν στοιχεία για τη λεπτοσπείρωση από 28 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης/Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου (ΕΕ/ΕΟΧ). Οι 22 χώρες, εξ' αυτών, κατέγραψαν συνολικά 765 επιβεβαιωμένα κρούσματα, ενώ έξι χώρες δεν ανέφεραν κανένα. Τα περισσότερα επιβεβαιωμένα κρούσματα (245) καταγράφηκαν στην Γαλλία, τα οποία αντιστοιχούν στο 41% του συνόλου, με «δείκτη ειδοποίησης» 0,36 ανά 100.000 πληθυσμού. Άλλες χώρες με υψηλό αριθμό κρουσμάτων ήταν η Γερμανία (153), η Ολλανδία (87), η Πορτογαλία (65), η Ισπανία (50) και η Ρουμανία (45). Συνολικά αυτές οι χώρες αντιπροσώπευαν το 78% των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων, παρότι αποτελούν μόνο το 54% του πληθυσμού της ΕΕ/ΕΟΧ. Ο συνολικός «δείκτης ειδοποίησης» για την ΕΕ/ΕΟΧ ήταν 0,18 ανά 100.000, με σταθερότητα από το 2018 ως το 2022 (0,14–0,23). Δεν φαίνεται να υπήρξε γεωγραφικό μοτίβο κατανομής των κρουσμάτων, αλλά η Εσθονία και η Πορτογαλία παρουσίασαν δείκτη πάνω από 0,50. Το 19% των 496 επιβεβαιωμένων κρουσμάτων με διαθέσιμα ταξιδιωτικά δεδομένα σχετιζόνταν με ταξίδια το 2022 – ποσοστό αυξημένο συγκριτικά με την πανδημική περίοδο, παραμένοντας ωστόσο χαμηλότερο από τα επίπεδα που καταγράφονταν προ της πανδημίας (26%). Η λεπτοσπείρωση παραμένει σπάνια νόσος στην ΕΕ/ΕΟΧ, με χαμηλά ποσοστά εμφάνισης, με εμφάνιση κυρίως από Ιούλιο

μέχρι Νοέμβρη λόγω των κλιματικών συνθηκών και της ανθρώπινης δραστηριότητας. Μετά τη μείωση των κρουσμάτων το 2020 εξαιτίας της πανδημίας, τα ποσοστά αυξήθηκαν ξανά το 2021–2022, πιθανώς λόγω περισσότερων ταξιδιών και αναζήτησης ιατρικής βοήθειας. Η Γαλλία και η Γερμανία προηγούνται όσον αφορά την αύξηση των κρουσμάτων την τελευταία δεκαετία. Παράγοντες που συμβάλλουν είναι η αύξηση των πληθυσμών των αρουραίων και άλλων θηλαστικών, η κλιματική αλλαγή, διάφορες δραστηριότητες καθώς και τα πιο σύγχρονα διαγνωστικά εργαλεία που δίνουν σαφέστερα και ακριβή αποτελέσματα. Η Πορτογαλία, συμπεριλαμβανομένων των Αζορών και της Μαδέρας, ευθύνεται για το 40% των εγχώριων κρουσμάτων, γεγονός που αποδίδεται στο υποτροπικό κλίμα των περιοχών αυτών καθώς και στην υψηλή παρουσία τρωκτικών (ECDC, 2024).

10. ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ

Οι επιδημιολογικές τάσεις της λεπτοσπείρωσης υπογραμμίζουν την επιτακτική ανάγκη για βελτιωμένα διαγνωστικά εργαλεία και ενισχυμένες στρατηγικές πρόληψης. Η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση έναρξη θεραπείας μπορούν να περιορίσουν σημαντικά τη θνησιμότητα της νόσου, γεγονός που καθιστά την επιδημιολογική επιτήρηση κρίσιμη (Arboleda et al., 2023).

Σε περιπτώσεις μόλυνσης, είναι σημαντικό να συμπληρώνονται έντυπα καταγραφής, ώστε να τηρείται αρχείο πιθανών ή επιβεβαιωμένων περιστατικών λεπτοσπείρωσης. Αυτά τα έντυπα συμβάλλουν στην τεκμηρίωση ενδημικών καταστάσεων και επιδημικών εξάρσεων, ενώ διευκολύνουν τον εντοπισμό πληθυσμών υψηλού κινδύνου και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου στην κοινότητα. Οι πληροφορίες που πρέπει να περιλαμβάνονται και καταγράφονται είναι οι εξής (WHO, 2003):

- Προσωπικά στοιχεία: ονοματεπώνυμο, διεύθυνση, πόλη, χώρα, ηλικία, φύλο, εθνικότητα και επάγγελμα ασθενούς, καθώς και στοιχεία θεράποντος ιατρού
- Κλινικά χαρακτηριστικά: ημερομηνία εμφάνισης συμπτωμάτων, αρχική κλινική εικόνα, περίοδος επώασης, διάρκεια νοσηλείας και συμπτωμάτων, έκβαση (π.χ. ανάρρωση ή θάνατος) και κλινική σημειολογία
- Διαγνωστικά ευρήματα: τύπος τεστ που χρησιμοποιήθηκε, ημερομηνίες λήψης δειγμάτων, αποτελέσματα
- Ιστορικό έκθεσης (τελευταίες 4 εβδομάδες): επαφή με μολυσμένα ύδατα ή λάσπη, έκθεση σε γλυκό νερό, παρουσία δερματικών τραυμάτων/αμυχών, είδος και κατάσταση ζώων με τα οποία υπήρξε επαφή, πηγές πόσιμου νερού και ημερομηνίες/τοποθεσίες έκθεσης.
- Οικονομικός αντίκτυπος: καταγραφή ημερών εργασίας που χάθηκαν λόγω της ασθένειας.

Η ολοκληρωμένη συλλογή δεδομένων και η συστηματική επιδημιολογική καταγραφή αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για την κατανόηση της δυναμικής της νόσου, την έγκαιρη ανίχνευση εστιών και την υλοποίηση στοχευμένων παρεμβάσεων (Guerra, 2009).

Η ενεργή επιδημιολογική επιτήρηση είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης της λεπτοσπείρωσης σε μία κοινότητα. Για την εφαρμογή της, οι ιατροί οφείλουν να συλλέγουν αίμα και ορό από ασθενείς που

παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα συμβατά με τη λεπτοσπείρωση, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες διεθνών και εθνικών οργανισμών, όπως τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC) ή της Ευρώπης (ECDC), ο Π.Ο.Υ. (ή WHO) ή οι εθνικές υγειονομικές αρχές (Bal et al., 1994). Επιπλέον, συνιστάται η λήψη δεύτερου δείγματος ορού 2-3 εβδομάδες μετά το πρώτο, καθώς η ορομετατροπή – δηλαδή η μεταβολή των αντισωμάτων στον ορό – μπορεί να λάβει χώρα 5 έως 7 ημέρες μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Το δεύτερο δείγμα βοηθά στην επιβεβαίωση της διάγνωσης της οξείας φάσης της νόσου και στην καλύτερη εκτίμηση του επιπολασμού καθώς και στην ταυτοποίηση των τοπικών ορότυπων της νόσου. Η μεταφορά των δειγμάτων σε κεντρικά εργαστήρια μέσω των δικτύων δημόσιας υγείας διευκολύνει την ορθή εργαστηριακή ανάλυση, ενώ ταυτόχρονα με την επιτήρηση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μελέτη περιπτώσεων-μαρτύρων (case-control study), με στόχο την αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου. Σημαντικό εργαλείο για την επιτήρηση είναι η χορήγηση ερωτηματολογίων, τα οποία επιτρέπουν τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με το κλινικό ιστορικό και το ιστορικό έκθεσης των ασθενών. Σε case-control μελέτη, εκτός από την καταγραφή κλινικών και διαγνωστικών δεδομένων, χρησιμοποιείται δεύτερο εξειδικευμένο ερωτηματολόγιο που εστιάζει σε πιθανές συμπεριφορές ή περιβαλλοντικές εκθέσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου (Arboleda et al., 2023; WHO, 2003; Levett, 2001). Τα ερωτηματολόγια μπορούν να αναλυθούν στατιστικά με τη χρήση ελεύθερου λογισμικού. Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι άτομα που δεν έχουν προσβληθεί από τη λεπτοσπείρωση, ώστε να διευκολύνεται η σύγκριση των συμπεριφορών και των συνθηκών έκθεσης. Πιθανοί παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν:

- Επαφή με ζώα ή τα ούρα τους
- Έκθεση σε γλυκό νερό ή λάσπη
- Συμμετοχή σε δραστηριότητες όπως κολύμπι, αγροτικές εργασίες, τσίσιμα χοίρων, δραστηριότητες αναψυχής στη φύση
- Δερματικά τραύματα
- Κατανάλωση μη επεξεργασμένου νερού
- Βάδιση χωρίς υποδήματα σε περιοχές με πιθανή μόλυνση

Τέλος, η επιτήρηση των ζώων – τόσο άγριων όσο και κατοικίδιων – ενισχύει την επιδημιολογική επιτήρηση, συμβάλλοντας στον εντοπισμό των πηγών μόλυνσης και στην κατανόηση της δυναμικής μετάδοσης της νόσου (WHO, 2003).

Η ύπαρξη ισχυρών συστημάτων επιτήρησης είναι καθοριστική για τη βελτίωση της ευαισθητοποίησης γύρω από τη λεπτοσπείρωση. Αυτά τα συστήματα επιτρέπουν την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, οδηγώντας σε καλύτερα υγειονομικά αποτελέσματα. Παράλληλα, διευκολύνουν τη συλλογή δεδομένων, την παρακολούθηση της εξάπλωσης της νόσου και την ανάπτυξη στοχευμένων παρεμβάσεων (Sykes et al., 2022; Guerra, 2013).

Η διάγνωση της ανθρώπινης λεπτοσπείρωσης είναι σημαντική και κρίσιμη για την αποτελεσματική επιδημιολογική επιτήρηση και την αξιόπιστη εκτίμηση του πραγματικού φορτίου της νόσου, η οποία παραμένει υποαναφερόμενη σε παγκόσμιο επίπεδο. Η φύση της νόσου, με μη ειδικά συμπτώματα όπως πυρετός, κεφαλαλγία και μυαλγίες, οδηγεί συχνά, όπως αναφέρθηκε, σε λανθασμένη ή καθυστερημένη διάγνωση, καθώς αυτά τα συμπτώματα μοιάζουν με εκείνα άλλων ιογενών λοιμώξεων. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς είτε παραμένουν αδιάγνωστοι είτε λαμβάνουν εσφαλμένη διάγνωση, γεγονός που οδηγεί σε καθυστέρηση ή ακόμη και απουσία θεραπευτικής παρέμβασης, αυξάνοντας τον κίνδυνο σοβαρών επιπλοκών. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ασθενείς παρουσιάζουν ήπια ή αυτοπεριοριζόμενα συμπτώματα, με συνέπεια να μην αναζητούν ιατρική φροντίδα και να μην καταγράφονται στα επιδημιολογικά δεδομένα (Arboleda et al., 2023; Sykes et al., 2022; Levett, 2001). Η υποδήλωση της λεπτοσπείρωσης αποτελεί σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας, κυρίως λόγω της λανθασμένης διάγνωσης κατά την αρχική προσέλευση των ασθενών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επιδημία οξείας εμπύρετης νόσου με πνευμονική αιμορραγία που εκδηλώθηκε στη Νικαράγουα το 1995, σε περίοδο έντονων βροχοπτώσεων. Αρχικά, η κλινική εικόνα αποδόθηκε σε λοίμωξη από hantavirus. Ωστόσο, η ανοσοϊστοχημεία των πνευμονικών ιστών οδήγησε στην αναγνώριση λεπτοσπειρών, προσδιορίζοντας τελικά τη λεπτοσπείρωση ως την αιτία της επιδημίας (Sykes et al., 2022).

Οι μοριακές μέθοδοι διαδραματίζουν ολοένα και πιο σημαντικό ρόλο στην ακριβή διάγνωση της λεπτοσπείρωσης, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις νευρολογικών συνδρόμων αδιευκρίνιστης αιτιολογίας. Για παράδειγμα, σε μελέτη από το Σάο Πάολο της Βραζιλίας, το 40% δειγμάτων ENY από 103 ασθενείς με άσηπτη μηνιγγίτιδα βρέθηκαν θετικά για DNA λεπτόσπειρας με τη χρήση PCR. Περαιτέρω, η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS) έχει αναδείξει τη λεπτοσπείρωση ως αιτία μηνιγγοεγκεφαλίτιδας και επιληπτικών κρίσεων σε ασθενείς με σοβαρή

συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, υπογραμμίζοντας την αξία των προηγμένων τεχνικών στην αποκάλυψη δύσκολων διαγνωστικών περιπτώσεων (Sykes et al., 2022).

Η καλλιέργεια και η ταυτοποίηση απομονωθέντων στελεχών αποτελεί μια σημαντική διαδικασία, καθώς επιτρέπει την αναγνώριση των κυκλοφορούντων στελεχών *Leptospira* που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο. Μέσω αυτής της ταυτοποίησης, μπορούν να εντοπιστούν πιθανές ζωικές δεξαμενές της μόλυνσης, δίνοντας τη δυνατότητα για στοχευμένα προγράμματα ελέγχου ξενιστών. Για παράδειγμα, το βακτήριο *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* μεταδίδεται κυρίως από αρουραίους, ενώ το *L. borgpetersenii* serovar *Ballum* έχει εντοπιστεί σε ποντίκια. Η αναγνώριση αυτών των στελεχών σε ανθρώπινες λοιμώξεις μπορεί να πυροδοτήσει στοχευμένα μέτρα ελέγχου τρωκτικών για τη μείωση της διασποράς της νόσου (Sykes et al., 2022; Picardeau, 2017; Haake & Levett, 2015).

Η απομόνωση νέων στελεχών ή η μετατόπιση κυρίαρχων στελεχών μπορεί να υποδηλώνει την εμφάνιση νέων φορέων ή γεγονότων έκθεσης, γι' αυτό η συστηματική επιτήρηση και ο χαρακτηρισμός των απομονώσεων θεωρείται καίριας σημασίας για την πρόληψη επιδημιών (Sykes et al., 2022).

Η ορολογική επιτήρηση (serosurveillance) αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο, ιδίως σε περιόδους ευρείας κυκλοφορίας ιογενών νοσημάτων, όπως ο δάγκειος πυρετός ή η COVID-19, τα οποία συχνά καλύπτουν τα πραγματικά κρούσματα λεπτοσπείρωσης. Παράλληλα, η λεπτοσπείρωση ενδέχεται να προκαλέσει σοβαρότερη νόσο ή να λειτουργεί ως συνλοίμωξη, επιδεινώνοντας τη γενική κλινική εικόνα. Εξαιτίας αυτού, η οροεπιτήρηση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον εντοπισμό εστιών, στην παρακολούθηση των τάσεων και στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ λοιμωδών νοσημάτων στον συνεχώς μεταβαλλόμενο χάρτη της παγκόσμιας εμπύρετης νοσηρότητας (Arboleda et al., 2023; Sykes et al., 2022; Levett, 2001).

Η λεπτοσπείρωση εμφανίζει τρία διακριτά επιδημιολογικά πρότυπα, ανάλογα με τις γεωγραφικές και οικολογικές συνθήκες και τα κυκλοφορούντα στελέχη. Στις εύκρατες ζώνες, περιορισμένος αριθμός οροτύπων της *Leptospira* ευθύνεται για λοιμώξεις στον άνθρωπο, κυρίως μέσω άμεσης επαφής με μολυσμένα ζώα-ξενιστές. Αντιθέτως, σε τροπικές και υγρές περιοχές παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη ποικιλομορφία τόσο σε ορότυπους όσο και σε είδη ξενιστών, με τη μετάδοση να συμβαίνει συνήθως έμμεσα, μέσω επαφής με μολυσμένα περιβαλλοντικά ύδατα ή εδάφη. Σε αστικές και αγροτικές περιοχές χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου, τα τρωκτικά αποτελούν τον κυριότερο δεξαμενή-ξενιστή, διαδραματίζοντας

καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση της νόσου στον ανθρώπινο πληθυσμό. Η επιδημιολογική σημασία κάθε επιμέρους ζωικού ξενιστή καθορίζεται από την αλληλεπίδραση παραγόντων όπως η τοπική οικολογία, οι ανθρώπινες δραστηριότητες στο συγκεκριμένο περιβάλλον, καθώς και οι δυναμικές αλλαγές στην επικράτηση και παθογένεια των εκάστοτε κυκλοφορούντων οροτύπων της *Leptospira* (Lau et al., 2010). Συμπερασματικά, η ακριβής γνώση των επικρατέστερων οροτύπων και των ξενιστών συντήρησής τους είναι θεμελιώδης για την κατανόηση της τοπικής επιδημιολογίας της νόσου και τον σχεδιασμό στοχευμένων μέτρων πρόληψης και ελέγχου σε ενδημικές περιοχές.

11. ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Όπως αναλύθηκε προηγουμένως, η λεπτοσπείρωση έχει ιστορικά αναγνωριστεί ως επαγγελματική νόσος, καθώς σχετιζόταν με δραστηριότητες υψηλής έκθεσης όπως η γεωργία, η κτηνοτροφία και η συντήρηση αποχετεύσεων. Ως ζωνόσος επίσης, μεταδίδεται μέσω άμεσης ή έμμεσης επαφής με ούρα ζώων-φορέων ή με μολυσμένο νερό και έδαφος, με κύριους φορείς τα τρωκτικά, τους σκύλους και τα οικόσιτα ζώα (Guerra, 2013).

Αναγνωρίζοντας ότι ο κίνδυνος της λεπτοσπείρωσης υποεκτιμάται διεθνώς, ιδίως σε χώρες με ελλιπή ή μη υποχρεωτικά συστήματα καταγραφής, ο Π.Ο.Υ δημιούργησε την Ομάδα Αναφοράς Επιδημιολογίας και Επιβάρυνσης της Λεπτοσπείρωσης (Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group, LERG). Οι συνεδριάσεις της ομάδας, το 2009 και 2010, επικεντρώθηκαν στους εξής στόχους:

- Αναθεώρηση των δεδομένων για τη θνησιμότητα, νοσηρότητα και αναπηρία που προκαλεί η λεπτοσπείρωση
- Ανάπτυξη και βελτίωση μοντέλων μετάδοσης της νόσου
- Εκτίμηση του παγκόσμιου φορτίου της λεπτοσπείρωσης
- Εντοπισμός ερευνητικών κενών
- Παροχή στρατηγικών κατευθύνσεων στον Π.Ο.Υ για τη διαμόρφωση πολιτικής υγείας.

Σύμφωνα με τη συστηματική ανασκόπηση της ομάδας, η ετήσια παγκόσμια επίπτωση της ανθρώπινης λεπτοσπείρωσης κυμαίνεται μεταξύ 5 και 14 περιστατικών ανά 100.000 πληθυσμό, με διαφοροποίηση μεταξύ ενδημικών και επιδημικών περιοχών, αντίστοιχα. Η επίπτωση ήταν χαμηλότερη στην Ευρώπη (0,5/100.000) και υψηλότερη στην Αφρική (έως 95/100.000) (Haake & Levett, 2015).

Τα τελευταία χρόνια, η διεθνής υγειονομική κοινότητα αντιμετώπισε πολλαπλές προκλήσεις, κυρίως λόγω της ταχείας εξάπλωσης νέων στελεχών γρίπης και άλλων λοιμώξεων υψηλού αντίκτυπου. Παρά τα μέτρα ελέγχου (π.χ. έλεγχοι αεροδρομίων, περιορισμοί ταξιδιών κτλ.), η παγκοσμιοποίηση μέσω του τουρισμού, των επαγγελματικών μετακινήσεων και της μετανάστευσης εντείνει τη διασπορά παθογόνων παραγόντων (Arguin et al., 2009). Η αστικοποίηση ενισχύει την κυκλοφορία και μετάδοση της νόσου, αποτελώντας υποτιμημένο κίνδυνο για τις πόλεις και τα προάστια (Westblade et al., 2016). Η ανθρώπινη επέκταση σε περιοχές άγριας

φύσης, η επαφή με ζώα, αλλά και η εμπορία άγριων ή εξωτικών κατοικιδίων αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης. Ο οικοτουρισμός, μέσω δραστηριοτήτων σε υγρές περιοχές και φυσικά περιβάλλοντα, ενισχύει την έκθεση στον παθογόνο παράγοντα. Οι πλημμύρες και άλλες φυσικές καταστροφές μπορούν επίσης να αυξήσουν τον κίνδυνο λεπτοσπείρωσης, διαταράσσοντας τις υπηρεσίες και τις υποδομές δημόσιας υγείας, καταστρέφοντας τα δίκτυα ύδρευσης και αποχέτευσης, εκτοπίζοντας πληθυσμούς, καταστρέφοντας κατοικίες και αυξάνοντας την περιβαλλοντική έκθεση σε παθογόνους οργανισμούς. Τέλος, η κλιματική αλλαγή αποτελεί παράγοντα επιδείνωσης, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας παρατείνει τη βιωσιμότητα των βακτηρίων *Leptospira* στο περιβάλλον και μεταβάλλει τη γεωγραφική εξάπλωση των ζωικών ξενιστών (Lau et al., 2010; Levett, 2001).

Η αύξηση των ζωοανθρωπονόσων αποδίδεται στις δημογραφικές αλλαγές, τις κοινωνικές ανάγκες, καθώς και στην παραμέληση της υγειονομικής επιτήρησης τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Αυτή η συλλογική υγειονομική αποδυνάμωση έχει σημαντικές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, είναι απαραίτητη η συνεργασία ιατρών, κτηνιάτρων και λοιπών φορέων δημόσιας υγείας (Pal et al., 2021).

Η κατανόηση των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών της λεπτοσπείρωσης αποτελεί κρίσιμο βήμα για τον σχεδιασμό στοχευμένων παρεμβάσεων δημόσιας υγείας. Αν και η ανάπτυξη εμβολίων για τον άνθρωπο βρίσκεται σε εξέλιξη σε ορισμένες χώρες (Κούβα, Ρωσία, Κίνα), επί του παρόντος δεν διατίθεται εγκεκριμένο εμβόλιο για ανθρώπινη χρήση σε παγκόσμιο επίπεδο. Ειδικότερα, στην Κούβα, η κλινική δοκιμή ενός εμβολίου κατέδειξε 100% αποτελεσματικότητα χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες σε περισσότερους από 100.000 ανθρώπους. Ωστόσο, αυτά τα εμβόλια παρέχουν βραχυπρόθεσμη προστασία και απαιτούν συχνό επαναληπτικό εμβολιασμό, γεγονός που περιορίζει τη μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητά τους. Η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και ασφαλούς ανθρώπινου εμβολίου επηρεάζεται και παρεμποδίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως (Bharti et al., 2003).

- η ποικιλομορφία των στελεχών *Leptospira*,
- η προσωρινή βραχυπρόθεσμη και ενδεχομένως ατελή προστασία που προσφέρουν τα αδρανοποιημένα εμβόλια,
- η πιθανότητα ανοσολογικών αντιδράσεων (π.χ. ραγοειδίτιδα) και παρενεργειών που έχουν αναφερθεί,

- και η ελλιπής κατανόηση των προστατευτικών ανοσολογικών μηχανισμών στον άνθρωπο.

Ο Π.Ο.Υ καθώς και εθνικές δομές δημόσιας υγείας συνιστούν την εφαρμογή πρακτικών προληπτικών μέτρων για τη μείωση της διασποράς της νόσου (eody.gov.gr/disease/leptospeiroisi/), όπως:

- Χρήση ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού (π.χ. γάντια, αδιάβροχοι επίδεσμοι, μακριά ρούχα) σε επαγγελματικές ή περιβαλλοντικές συνθήκες υψηλού κινδύνου
- Αποφυγή πόσης πιθανά μολυσμένου νερού ή επαφής με νερά, εδάφη ή ούρα ζώων σε περιοχές όπου ενδημεί η λεπτοσπείρωση ή μετά από πλημμύρες
- Ορθή διαχείριση ζωικών αποβλήτων και τακτική απολύμανση χώρων και εγκαταστάσεων
- Εκπαίδευση και ενημέρωση του κοινού σχετικά με τους τρόπους μετάδοσης, τα συμπτώματα και την πρόληψη της νόσου (Εικ. 34).

Αναλυτικότερα, για τη μείωση του κινδύνου μετάδοσης της λεπτοσπείρωσης, το κτηνιατρικό προσωπικό και άλλα άτομα που εργάζονται με ζώα οφείλουν να αποφεύγουν την άμεση επαφή με ούρα και άλλα σωματικά υγρά μολυσμένων ζώων, χρησιμοποιώντας κατάλληλα μέσα ατομικής προστασίας, όπως γάντια. Πρόσθετος εξοπλισμός, όπως μάσκες και προστατευτικά γυαλιά, πρέπει να χρησιμοποιείται κατά την εκτέλεση διαδικασιών που ενδέχεται να προκαλέσουν εκτίναξη υγρών (π.χ. καθαρισμός κλουβιών). Όλα τα βιολογικά υλικά, όπως αίμα, ούρα και ιστοί από μολυσμένα ζώα, πρέπει να θεωρούνται δυνητικά βιοεπικίνδυνα απόβλητα. Συνιστάται επιμελές πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό μετά από κάθε επαφή ή καθαρισμό χώρων και αντικειμένων που έχουν μολυνθεί. Για την απολύμανση επιφανειών, κλινοσκεπασμάτων και κλουβιών μπορούν να χρησιμοποιούνται κατάλληλα απολυμαντικά με βάση το ιώδιο ή το χλώριο. Η βιωσιμότητα των λεπτοσπειρών μειώνεται σημαντικά μέσω αποξήρανσης, έκθεσης σε άμεση ηλιακή ακτινοβολία και περιβάλλον χαμηλού pH. Το κτηνιατρικό προσωπικό και οι ιδιοκτήτες κατοικίδιων θα πρέπει να λαμβάνουν τα κατάλληλα μέτρα ώστε να περιορίζεται η επαφή μολυσμένων σκύλων με άλλα ζώα. Αυτό είναι απαραίτητο τόσο κατά τη διάρκεια της νοσηλείας όσο και μετά την επιστροφή του ζώου στο οικιακό περιβάλλον. Η ούρηση των μολυσμένων ή αναρρωσάντων σκύλων θα πρέπει να γίνεται σε ελεγχόμενους χώρους, στους οποίους δεν έχουν πρόσβαση άλλα ζώα ή παιδιά, και οι οποίοι βρίσκονται μακριά από πισίνες ή φυσικά υδάτινα σώματα. Άλλοι σκύλοι που διαβιούν στον ίδιο χώρο με ζώο θετικό

στη λεπτοσπείρωση θα πρέπει να υποβάλλονται σε διαγνωστικό έλεγχο και να εξετάζεται το ενδεχόμενο χορήγησης προφυλακτικής αντιμικροβιακής αγωγής. Η έγκαιρη χορήγηση κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας μπορεί να μειώσει τη διάρκεια τόσο των κλινικών συμπτωμάτων όσο και της απέκκρισης του παθογόνου στα ούρα (Guerra, 2009).

Για άτομα που εκτίθενται επαγγελματικά ή για ψυχαγωγικούς λόγους σε περιβάλλοντα με παρουσία λεπτοσπειρών, συνιστάται η χρήση προστατευτικής ενδυμασίας και αδιάβροχων υποδημάτων (μπότες). Η αποτροπή πρόσβασης τρωκτικών και άλλων μικρών θηλαστικών στους χώρους κατοικίας συντελεί στη μείωση του κινδύνου έκθεσης σε μολυσμένα ούρα. Κατά τη διάρκεια πλημμυρών ή άλλων φυσικών καταστροφών που δύνανται να επηρεάσουν τις υποδομές δημόσιας υγείας, είναι απαραίτητο να λαμβάνονται προληπτικά μέτρα για την εξασφάλιση ασφαλούς ύδρευσης και την προστασία από την έκθεση σε μολυσμένο περιβάλλον (Guerra, 2009). Σε περιπτώσεις υψηλού κινδύνου έκθεσης (π.χ. περιοχές με επιδημίες ή φυσικές καταστροφές), μπορεί να προταθεί προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών (συνήθως δοξυκυκλίνη), κατόπιν ιατρικής εκτίμησης. Επιπλέον, η άμεση διάγνωση και θεραπεία με κατάλληλα αντιβιοτικά (π.χ. δοξυκυκλίνη, πενικιλίνη) είναι καθοριστικής σημασίας για την αποφυγή σοβαρών επιπλοκών (Haake & Levett, 2015; Bharti et al., 2003).

Προστασία από τη Λεπτοσπείρωση



ΠΩΣ ΠΑΘΑΙΝΟΥΜΕ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗ



Αν έρθουμε σε επαφή με:

- ούρα ή άλλα βιολογικά υγρά από μολυσμένα ζώα
- νερά από ποτάμια, λίμνες, στάσιμα νερά, νερά πλημμύρας, υγρό έδαφος ή βλάστηση
- μη ασφαλές πόσιμο νερό
- φαγητό ή νερό που ήρθε σε επαφή με ούρα από μολυσμένα ζώα

ΠΡΟΛΗΨΗ



Δεν περπατάμε ξυπόλητοι ή με σαγιονάρες, δεν κολυμπάμε, δεν βάζουμε το κεφάλι στο νερό και δεν καταπίνουμε νερό από ποτάμια, λίμνες, νερά πλημμυρών ή από οποιαδήποτε πηγή νερού που μπορεί να εκτέθηκε σε νερό πλημμυρών ή σε ζώα.



Καλύπτουμε τραύματα και αμυχές με αδιάβροχους επίδεσμους ή οτιδήποτε μπορεί να δημιουργήσει αδιάβροχοποίηση.



Δεν περπατάμε ξυπόλητοι ή με ανοιχτά πέδιλα σε έδαφος με υγρασία, στάσιμα νερά ή νερά πλημμύρας. Φοράμε αδιάβροχα προστατευτικά ρούχα, αδιάβροχα γάντια και αδιάβροχα παπούτσια ή γαλότσες.



Αν το νερό του δικτύου είναι ακατάλληλο για πόση, καταναλώνουμε εμφιαλωμένο, ή βράζουμε το νερό για τουλάχιστον 1 λεπτό, αν υπάρχει σύσταση για βράσιμο του νερού για να το πούμε ή για οικιακή χρήση.



Ελέγχουμε τους πληθυσμούς των τροφικών φυλάσσοντας σκουπίδια και αποθηκευμένες τροφές σε κλειστάς περιέκτες ή επαρκώς προστατευμένους χώρους και εφαρμόζοντας συστηματικά μυοκτονίες.

ΜΑΘΑΙΝΟΥΜΕ ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Συμπτώματα σαν της γρίπης

- Πονοκέφαλος
- Μυαλγίες
- Πυρετός & ρίγος
- Δερματικά εξανθήματα



- Επιπεφυκίτιδα (κόκκινα μάτια)
- Βήχας
- Πόνος στο στομάχι, έμετος, διάρροια
- Κιτρίνισμα ματιών ή/και δέρματος (ίκτερος)

ΑΝΑΖΗΤΟΥΜΕ ΕΓΚΑΙΡΩΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΟΗΘΕΙΑ



Αν έχουμε κάποιο από τα παραπάνω συμπτώματα επισκεπτόμαστε αμέσως γιατρό. Η έγκαιρη θεραπεία μπορεί να εμποδίσει την εξέλιξη σε βαριά νόσο και να μειώσει το διάστημα που είμαστε άρρωστοι. Χωρίς θεραπεία τα συμπτώματα της λεπτοσπείρωσης μπορεί να χειροτερέψουν. Οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν νεφρική και ηπατική ανεπάρκεια, μηνιγγίτιδα, δύσπνοια, αιμορραγίες και σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και να πεθάνουν.

Εικόνα 34. Ενημέρωση του κοινού για τη λεπτοσπείρωση και τους τρόπους πρόληψης (<https://eody.gov.gr/disease/leptospirosis/>)

Ο εμβολιασμός των ζώων, ιδιαίτερα των κατοικίδιων και παραγωγικών ζώων, αποτελεί σημαντικό εργαλείο πρόληψης. Στην Ευρώπη διατίθενται τετραδύναμα εμβόλια με ορότυπους *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippytyphosa* και *australis*. Παράλληλα, μονοσθενή και δισθενή εμβόλια εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες χώρες. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση πειραματικών δοκιμών, 21 εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια προσφέρουν προστασία άνω του 80% από την εμφάνιση κλινικής νόσου και μειώνουν σημαντικά την νεφρική αποβολή του βακτηρίου από τους σκύλους, περιορίζοντας έτσι τον κίνδυνο μετάδοσης στον άνθρωπο. Τα εμβόλια προστατεύουν για τουλάχιστον 12 μήνες, με αρκετούς κατασκευαστές να παρέχουν εγγύηση προϊόντος για 15 μήνες μετά την κατάλληλη χορήγηση (Sykes et al., 2023; Zeng et al., 2023).

Η εμβολιαστική πρακτική για τη λεπτοσπείρωση στα ζώα, κυρίως σκύλους, περιλαμβάνει:

- 2 αρχικούς εμβολιασμούς με μεσοδιάστημα 4 εβδομάδων, από την ηλικία των 12 εβδομάδων,
- ετήσιους επανεμβολιασμούς για διατήρηση της ανοσίας.

Ωστόσο, τα εμβόλια δεν εμποδίζουν πλήρως τη μετάδοση στον άνθρωπο, καθώς προκαλούν ανοσία ειδική έναντι του ορότυπου, με περιορισμένη αποτελεσματικότητα σε ετερόλογες οροομάδες. Δεδομένα από ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι τα αντισώματα κατά των λιποπολυσακχαριτών είναι προστατευτικά, αλλά δεν είναι σαφές αν το ίδιο ισχύει και για τους ανθρώπους (Bharti et al., 2003).

Πέρα από την κλινική προσέγγιση, κρίσιμος είναι και ο ρόλος της περιβαλλοντικής διαχείρισης:

- Μείωση της πρόσβασης σε ελώδεις περιοχές και στάσιμα νερά.
- Περίφραξη περιοχών διαμονής ζώων και καταπολέμηση των τρωκτικών
- Μείωση της αλληλεπίδρασης με άγρια ζώα και περιορισμός της εμπορίας άγριων ειδών.

Η συνεργασία μεταξύ ιατρών, κτηνιάτρων και δημόσιων φορέων αποτελεί βασική στρατηγική στον περιορισμό των ζωοανθρωπονόσων, με έμφαση στην αμφίδρομη επιτήρηση ζώων και ανθρώπων (Sykes et al., 2023; Zavitsanou & Babatsikou, 2008; WHO, 2003).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η λεπτοσπείρωση είναι η πιο συχνή ζωοανθρωπονόσος με εκατομμύρια περιστατικά μέσα στον χρόνο και παγκόσμια εξάπλωση, αποτελώντας έτσι σημαντικό κίνδυνο για την δημόσια υγεία.

Οι λεπτόσπειρες είναι σπειροειδούς σχήματος βακτήρια, τα οποία διαθέτουν περιπλασματικά μαστίγια που τους προσδίδουν ελικοειδή κινητικότητα. Παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα, καθώς, αν και ευδοκιμούν σε αναερόβιες συνθήκες, μπορούν να αναπτυχθούν και υπό αερόβιες συνθήκες. Η είσοδος του βακτηρίου στον άνθρωπο γίνεται μέσω εκδορών του δέρματος ή μέσω των βλεννογόνων από επαφή με το περιβάλλον (νερό, χώμα), το οποίο έχει μολυνθεί προηγουμένως από ζώα-φορείς.

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται διαφέρουν από άνθρωπο σε άνθρωπο ανάλογα και με τη σοβαρότητα της νόσου, η οποία έχει δυο μορφές. Η ήπια μορφή της νόσου (ανικτερική μορφή) παρουσιάζει συμπτώματα παρόμοια με γρίπης όπως πονοκέφαλο, πυρετό, μυαλγίες, επιπεφυκίτιδα κλπ. Στη σοβαρή μορφή (ικτερική μορφή) παρουσιάζεται ίκτερος και διάφορες δευτερογενείς επιπλοκές που μπορεί να στοιχίσουν ακόμα και τη ζωή του ασθενή. Μόνο το 10% των περιστατικών εμφανίζουν ωστόσο αυτή τη μορφή που αλλιώς ονομάζεται και νόσος του Weil. Σε αυτήν παρατηρείται ίκτερος, νεφρική ανεπάρκεια και αιμορραγίες. Η ανικτερική μορφή έχει διάρκεια 4-7 ημέρες σε αντίθεση με την ικτερική που φτάνει έως τις 30 ημέρες.

Ιδιαίτερη σημασία για την θεραπεία της νόσου έχει η έγκαιρη διάγνωση. Όπως αναλύσαμε στο κεφάλαιο 8, η διάγνωση της νόσου μπορεί να γίνει με αρκετές μεθόδους, κλασικές, όπως η καλλιέργεια και η μικροσκοπία, αλλά και ορολογικές και μοριακές, όπως PCR, RT-PCR, LAMP, αλληλούχιση γονιδιώματος (NGS). Ωστόσο η πιο διαδεδομένη και πιο ακριβής από όλες θεωρείται η MAT. Αυτή χρησιμοποιείται τόσο για επιδημιολογικούς όσο και διαγνωστικούς σκοπούς.

Η επιδημιολογία της νόσου διαφέρει ανάλογα με το περιβάλλον. Η γεωργία και η αγροτική ενασχόληση σε περιοχές εκτός πόλεων, ο συνωστισμός εντός των πόλεων αλλά και τα ταξίδια και οι δραστηριότητες αναψυχής σε άλλες περιοχές φαίνεται να αποτελούν τις κύριες πηγές μόλυνσης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καθοριστικό ρόλο στη διασφάλιση της δημόσιας υγείας διαδραματίζουν η έγκαιρη διάγνωση της νόσου, η εφαρμογή

κατάλληλων προληπτικών μέτρων –όπως ο εμβολιασμός των ζώων–, η αποφυγή επαφής με ύποπτες περιοχές, ιδιαίτερα μετά από έντονες βροχοπτώσεις ή πλημμυρικά φαινόμενα, καθώς και η χρήση κατάλληλου ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού (όπως γάντια και αδιάβροχα υποδήματα) σε περιπτώσεις αναγκαστικής επαφής με το δυνητικά μολυσμένο περιβάλλον, κυρίως σε περιόδους αυξημένου κινδύνου.

Συμπερασματικά, η λεπτοσπείρωση αποτελεί μία νόσο με σημαντική επιδημιολογική σημασία, η οποία απασχολεί ολοένα και περισσότερο τα συστήματα υγείας λόγω της αυξανόμενης συχνότητάς της εμφάνισής της. Αξίζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή ή και απειλητική για τη ζωή κατάσταση. Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η εντατική ενημέρωση του κοινού και των επαγγελματιών υγείας, ιδίως κατά τους μήνες υψηλής βροχόπτωσης ή σε περιόδους φυσικών καταστροφών, σχετικά με τα αίτια, τους μηχανισμούς μετάδοσης και τους δυνητικούς κινδύνους της νόσου. Παράλληλα, είναι αναγκαία η συστηματική επιτήρηση της νόσου μέσω ακριβούς επιδημιολογικής καταγραφής, προκειμένου να ενισχυθεί η δυνατότητα έγκαιρης παρέμβασης και αποτελεσματικής διαχείρισης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας έγινε μια μελέτη που αφορά την «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΛΕΠΤΟΣΠΕΙΡΩΣΗΣ». Πρόκειται για μια ιδιαίτερα μολυσματική ζωοανθρωπονόσο με συμπτώματα που ποικίλουν από πολύ ήπια έως πολύ σοβαρά. Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο βασικά μέρη. Στο πρώτο μέρος εξετάζεται το βακτήριο *Leptospira*, με αναφορά στην ιστορία του, την ταξινόμηση, τη μορφολογία και τη δομή του. Επιπλέον, αναλύονται η οικολογία του παθογόνου, οι μηχανισμοί παθογένειας, καθώς και τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της νόσου. Τέλος, παρουσιάζονται οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται κατά της λεπτοσπείρωσης. Το δεύτερο μέρος εστιάζεται στις εργαστηριακές διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση της νόσου και την αναζήτηση των κυκλοφορούντων ορότυπων, στην επιτήρηση της νόσου, την επίπτωση στη δημόσια υγεία και στα προτεινόμενα μέτρα πρόληψης και προστασίας. Σκοπός της εργασίας είναι η ενίσχυση της γνώσης γύρω από τη λεπτοσπείρωση — μια ιδιαίτερα μολυσματική νόσο που επηρεάζει τόσο τον άνθρωπο όσο και τα ζώα — με στόχο την ευαισθητοποίηση, την ορθή πρόληψη και τον αποτελεσματικό έλεγχο της.

Λέξεις – κλειδιά: Λεπτοσπείρωση, Λεπτόσπειρα, Ζωοανθρωπονόσος, Βακτήριο, Μόλυνση, Παθογένεια, Κλινική Εικόνα, Επιδημιολογία, Διάγνωση, Επιτήρηση, Πρόληψη

ABSTRACT

This thesis is focusing on *Leptospirosis* and more particularly on its diagnostic methods, the surveillance and safety measures. *Leptospirosis* is a very important zoonotic disease that gets transmitted by infected water or urine from infected animals. Its symptoms have a variety from light to extremely dangerous, since it can lead to death depending on the seriousness of the infection. The first part of the assignment is analyzing the bacteria (*Leptospira*) mostly, that in this case they are *spirochetes*. There are chapters dedicated on *Leptospirosis* history and ecology, on its structure and pathogenesis, and on its treatment along with others. The second part, which is the main part of this thesis, focuses on the laboratory diagnostic methods used for the identification of the disease and the detection of circulating serotypes, as well as on disease surveillance, its impact on public health, and the recommended prevention and protection measures.

This thesis was written in order to inform people more about this disease, that even though it's really serious it doesn't get recorded as much as it should have been because of its expensive diagnostic methods. Last but not least, leptospirosis has been a serious issue the last decades due to the floods and excessive rain making it one of the most dangerous zoonotic diseases.

Key words: Leptospira, Leptospirosis, Zoonotic Disease, Bacteria, Infection, Diagnosis, Surveillance, Control Measures

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

World Health Organization (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control (No. WHO/CDS/CSR/EPH 2002.23). World Health Organization.

Levett P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326.

Andersen-Ranberg E.U., Jensen P.M., & Pipper C. (2016). Global patterns of *Leptospira* prevalence in vertebrate reservoir hosts, *Journal of Wildlife Diseases*. 52.(3), 468–477.

Toyokawa T., Ohnishi M., & Koizumi N. (2014). Diagnosis of acute leptospirosis, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(1), 111–121.

Arboleda M., Mejía-Torres M., Posada M., Restrepo N., Ríos-Tapias P., Rivera Pedroza L.A., Calle D., Sánchez-Jiménez M.M., Marín K., & Agudelo-Flórez P. (2023). Molecular Diagnosis as an Alternative for Public Health Surveillance of Leptospirosis in Colombia, *Microorganisms*, 11(11), 2759.

Ko A.I., Goarant C., & Picardeau M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(10), 736-747.

Picardeau M. (2013). Diagnosis and Epidemiology of Leptospirosis, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1-9.

Zavitsanou A., & Babatsikou F. (2008). Leptospirosis: Epidemiology and Preventive Measures, *Health Science Journal*, 2(2), 75-82.

Waggoner J.J., & Pinsky B.A. (2017). Molecular Diagnostics for Human Leptospirosis, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(5), 440–445.

Sykes J.E., Francey T., Schuller S., Stoddard R.A., Cowgill L.D., & Moore G.E (2023). Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 37(6):1966-1982.

Esteves L.M., Bulhões S.M., Branco C.C., Carreira T., Vieira M.L., Gomes-Solecki M., & Mota-Vieira L. (2018). Diagnosis of Human Leptospirosis in a Clinical Setting: Real-Time PCR High Resolution Melting Analysis for Detection of *Leptospira* at the Onset of Disease. *Scientific reports*, 8(1), 9213.

Baharom M., Ahmad N., Hod R., Ja'afar M. H., Arsad F. S., Tangang F., & Osman, Y. (2023). Environmental and occupational factors associated with leptospirosis: a systematic review. *Heliyon*, 10(1).

Zeng Z., Chen H., Xu J., Zhang H., Xu C., Fan L., ... & Wei Y. (2023). Characteristics of leptospirosis cases, prevention and control managements 1955–2020, Guangzhou, China. *One Health*, (Amsterdam, Netherlands)16, 100541.

Gomes-Solecki M., Santecchia I., & Werts C. (2017). Animal models of leptospirosis: of mice and hamsters. *Frontiers in Immunology*, 8, 58.

Adler B., & de la Pēna Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis, (2010). *Veterinary Microbiology*, Volume 140, Issues 3–4, Pages 287-296.

Haake D.A., & Levett P.N. (2015). Leptospirosis in humans. Current topics in *Microbiology and Immunology*, 387, 65-97.

Arean V.M. (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *The American Journal of Pathology*. 40 (4), 393-423.

Samrot A.V., Sean T.C., Bhavya K.S., Sahithya C.S., Chan-draseskaran S., Palanisamy R., Robinson E.R., Subbiah S.K., & Mok P.L. (2021). Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis - A Review, *Pathogens* (Basel, Switzerland); 10(2):145.

Seguro A.C., & Andrade L. (2013). Pathophysiology of Leptospirosis, *Shock (Augusta, Ga.)*, 39 Suppl 1, 17–23.

Ramadass P., Jarvis B.D.W., Penny D., & Marshall R.B. (1992). Genetic Characterization of Pathogenic *Leptospira* Species by DNA Hybridization, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 215–219.

Budihal SV., & Perwez K. (2014). Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(1):199.

Petakh P., Isevykh V., Kamyshnyi A., & Oksenykh V. (2022). Weil's Disease—Immunopathogenesis, Multiple Organ Failure, and Potential Role of Gut Microbiota. *Biomolecules*, 12(12), 1830.

Philip N., Affendy N.B., Masri S.N., Yuhana M.Y., Than L.T., Sekawi Z., & Neela V.K. (2020). Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. *PloS one*, 15(9).

Westblade L.F., van Belkum A., Grundhoff A., Weinstock G.M., Pamer E.G., Pallen M.J., & Dunne Jr W.M. (2016). Role of clinicogenomics in infectious disease diagnostics and public health microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 54 (7), 1686-1693.

Levett P.N., & Haake D.A. (2010). *Leptospira* species (leptospirosis). *Principles and practice of infectious diseases, Churchill Livingstone Elsevier*, Philadelphia, 3059-3065.

Wesley Farr R. (1995). Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21(1), Pages 1-8.

Pappas G., Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., & Akritidis N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends, *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4), Pages 351-357.

Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., ... & Vinetz J.M. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 757-771.

Guerra M.A. (2013). Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 41(5), 295–297.

Papa A., Theoharidou D., & Antoniadis A. (2009). Pulmonary involvement and leptospirosis, Greece. *Emerging Infectious diseases*, 15(5), 834.

Terpstra W.J. (2006). Historical Perspectives in Leptospirosis, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(4), 316–320.

Mwachui M.A., Crump L., Hartskeerl R., Zinsstag J., & Hattendorf J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9).

Musso D., & La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge, (2013). *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46, (4), Pages 245-252.

Kumari P., Yadav S., Sarkar S., & Satheeshkumar PK. (2024). Cleavage of cell junction proteins as a host invasion strategy in leptospirosis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108 (1), 119.

Rajapakse S. (2022). Leptospirosis: clinical aspects, *Clinical medicine (London, England)*, 22(1), 14–17.

Guerra M.A. (2009). Leptospirosis, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(4), 472–430.

Arent Z., Pardyak L., Dubniewicz K., Płachno B., & Kotula-Balak M. A. Ł. G. O. R. Z. A. T. A. (2022). *Leptospira* taxonomy: Then and now. *Medycyna Weterynaryjna*, 78(10), 489-496.

Hsu S.H., & Yang C.W., (2022). Insight into the structure, functions, and dynamics of the *Leptospira* outer membrane proteins with the pathogenicity. *Membranes*, 12(3), 300.

Johnson R.C. & Faine S. (1984). *Leptospira*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 62-67.

Lau C.L., Smythe L.D., Craig S.B., & Weinstein P. (2010). Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(10), 631-638.

Brabb T., Newsome D., Burich A., & Hanes M. (2012). Chapter 23 - Infectious Diseases, In American College of Laboratory Animal Medicine, *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Academic Press, Pages 637-683.

Barragan V., Olivas S., Keim P., & Pearson T. (2017). Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19).

Moinet M., Wilkinson D. A., Aberdein D., Russell J. C., Vallée E., Collins-Emerson J. M., ..., & Benschop J. (2021). Of mice, cattle, and men: A review of the eco-epidemiology of *Leptospira borgpetersenii* serovar Ballum. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(4), 189.

Xue F., Yan J., & Picardeau M. (2009). Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microbes and infection*, 11(3), 328-333.

Marinho M., & Cardoso T.C. (2015). Pathogenesis of leptospirosis: Important issues. *Journal of Medical Microbiology and Diagnosis*, 4 (1)

Turhan V., Atasoyu E. M., Solmazgul E., Evrenkaya R., & Cavuslu S. (2005). Anicteric leptospirosis and renal involvement. *Renal Failure*, 27(4), 491-492.

Assimakopoulos S.F., Psilopanagioti A., Fligou F., Filos K.S., Marangos M., & Zotou A. (2012). Anicteric leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome: a case series study. *The American journal of the medical sciences*, 344(4), 326-329.

Bisias G., Kritas S. K., Burriel A., & Kontos B. (2017). Leptospirosis: an important re-emerging infection of animals and man. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(1), 76-84.

Selvarajah S., Ran S., Roberts N. W., & Nair M. (2021). Leptospirosis in pregnancy: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(9).

Khan R., Quaizer S., & Khan F. (2015). Anicteric leptospirosis: An unusual cause of acute pancreatitis: Anicteric leptospirosis: An unusual cause of acute pancreatitis. *Community Acquired Infection*, 2, 107.

Yang CW. (2007). Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by toll-like receptors. *Kidney international*, 72(8), 918–925.

Kaya E., Dervisoglu A., Eroglu C., Polat C., Sunbul M., & Ozkan K. (2005). Acute pancreatitis caused by leptospirosis: report of two cases. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(28), 4447 - 4449

Chancharoenthana W., Leelahavanichkul A., Schultz M.J., & Dondorp A.M. (2022). Going micro in leptospirosis kidney disease. *Cells*, 11(4), 698.

Cullen P.A., Haake D.A., Bulach D.M., Zuerner R.L., & Adler B. (2003). LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infection and immunity*, 71(5), 2414-2421.

Spichler A.S., Vilaça P.J., Athanazio D.A., Albuquerque J.O., Buzzar M., Castro B., ... & Vinetz J.M. (2008). Predictors of lethality in severe leptospirosis in urban Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 911-914.

Cilia G., Bertelloni F., Albini S., & Fratini F. (2021). Insight into the epidemiology of leptospirosis: A review of *Leptospira* isolations from “unconventional” hosts. *Animals*, 11(1), 191.

Matsui M., Roche L., Geroult S., Soupé-Gilbert M.E., Monchy D., Huerre M., & Goarant C. (2016). Cytokine and chemokine expression in kidneys during chronic leptospirosis in reservoir and susceptible animal models. *PLoS One*, 11(5).

Haake D.A. (2006). Hamster model of leptospirosis. *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 12, Unit–12E.2.

Truccolo J., Charavay F., Merien F., & Perolat P. (2002). Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 848-853.

Liegeon G., Delory T., & Picardeau M. (2018). Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of leptospira. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(5), 693-699.

Lane A.B., & Dore M.M. (2016). Leptospirosis: A clinical review of evidence-based diagnosis, treatment and prevention. *World Journal of Clinical Infectious Diseases* 6(4): 61-66.

Warnasekara J., Koralegedara I., & Agampodi S. (2019). Estimating the burden of leptospirosis in Sri Lanka; a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 119.

Yadeta W., Bashahun G.M., & Abdela N. (2016). Leptospirosis in animal and its public health implications: A review. *World Applied Sciences Journal*, 34(6), 845-853.

Arguin P.M., Marano N., & Freedman D.O. (2009). Globally mobile populations and the spread of emerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 15(11), 1713–1714.

Evangelista K.V., & Coburn J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future microbiology*, 5(9), 1413–1425.

Ahmed A., Grobusch M.P., Klatser P.R., & Hartskeerl R.A. (2012). Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 3, 133.

Rosa M.I., Reis M.F.D., Simon C., Dondossola E., Alexandre M.C., Colonetti,T., & Meller F.O. (2017). IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ciencia & Saude Coletiva*, 22, 4001-4012.

Niloofo R., Fernando N., de Silva N.L., et al. (2015). Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. *PLoS One*. 10(6).

Ramos-Vázquez J.R., Sánchez-Montes S., Esparza-González S.C., Romero-Salas D., Pardio-Sedas V., Estrada-Coates A.T., Alva-Trujillo M., Ballados-González G.G., Grostieta E., Becker I., & Cruz-Romero A. (2024). Isolation and molecular identification of *Leptospira santarosai* and *Leptospira interrogans* in equines from eastern Mexico. *Acta Tropica*, 256, 107242.

Shivakumar S., & Krishnakumar B. (2006). Diagnosis of leptospirosis-role of MAT. *Journal of the Association of Physicians of India*, 54.

Sanger F., Nicklen S., & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.

Schreier S., Doungchawee G., Chadsuthi S., Triampo D., & Triampo W. (2013). Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Review of Clinical Immunology*, 9(3), 263-280.

Jin L., & Lloyd R.V. (1997). In situ hybridization: methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(1), 2-9.

Gu W., Miller S., & Chiu C.Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 14, 319-338.

Brammer S., Vasconcelos S., Poersch L., Oliveira A., & Brasileiro-Vidal A. (2013). Genomic in situ Hybridization in Triticeae: A Methodological Approach. *Plant Breeding from Laboratories to*, 1-22.

GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators (2017). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*, 390(10100), 1260–1344.

Guernier V., Goarant C., Benschop J., & Lau CL. (2018). A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5).

Alston J.M., & Brown H.C. (1937). The epidemiology of Weil's disease. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 30(6), 741-756.

Bradley E.A., & Lockaby G. (2023). Leptospirosis and the environment: a review and future directions. *Pathogens* 12(9), 1167.

Behera S.K., Sabarinath T., Ganesh B., Mishra P.K.K., Niloofa R., Senthilkumar K., Verma M.R., Hota A., Chandrasekar S., Deneke Y., Kumar A., Nagarajan M., Das D., Khatua S., Sahu R., & Ali S.A. (2022). Diagnosis of Human Leptospirosis: Comparison of Microscopic Agglutination Test with Recombinant LigA/B Antigen-Based In-House IgM Dot ELISA Dipstick Test and Latex Agglutination Test Using Bayesian Latent Class Model and MAT as Gold Standard. *Diagnostics*, 12(6), 1455.

Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M.S., ... & Ko A.I. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9).

Picardeau M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297-307.

Zhang Y., Bao L., Zhu H., Huang B., & Zhang H. (2010). OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(1), 70-79.

Verma A., Stevenson B., & Adler B. (2013). Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1-2), 61-66.

Pal M., Bulcha M.R., & Bune W.M. (2021). Leptospirosis and one health perspective. *American Journal of Public Health Research*, 9(4), 180-183.

Jaiswal N. K., Chandrasekaran S., & Padmavathy B.K. (2015). Dark field microscopy an important conventional technique for the early diagnosis of leptospirosis. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(6), 718-722.

Diesch S.L., McCulloch W.F., Braun J.L, & Davis J.R. (1970). Detection and ecology of leptospirosis in Iowa wildlife. *Journal of Wildlife Diseases*, 6(4), 275–288.

Agrawal S., Chaudhry R., Gupta N., Arif N., & Bahadur T. (2018). Decreasing trend of seroprevalence of leptospirosis at All India Institute of Medical Sciences New Delhi: 2014–2018. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 7 (6), 1425-1428.

Lin C., Chiu N., & Lee C. (2012). Leptospirosis after Typhoon. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(2), 187-188.

de Oliveira N.R., Kremer F.S., de Brito R.S.A., Zamboni R., Dellagostin O.A., & Jorge S. (2022). Pathogenesis and Genomic Analysis of a Virulent *Leptospira Interrogans* Serovar Copenhageni Isolated from a Dog with Lethal Infection. *Tropical medicine and infectious disease*, 7(11), 333.

Hall T., Soepnel A., Addidle M. (2024). A review of ten years of *Leptospira* serology and PCR testing. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, 78(1): 25:30.

Smythe L.D., Smith I.L., Smith G.A., Dohnt M.F., Symonds M.L., Barnett L.J., & McKay D.B. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases*, 2, 1-7.

Koizumi N., Nakajima C., Harunari T., Tanikawa T., Tokiwa T., Uchimura E..., Suzuki Y. (2012). A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2072-2074.

Waggoner J., Abeynayake J., Balassiano I., Lefterova M., Sahoo M., Liu Y., Vital-Brazil J., Gresh L., Balmaseda A., Harris E., Banaei N., & Pinsky B. (2014). Multiplex Nucleic Acid Amplification Test for Diagnosis of Dengue Fever, Malaria, and Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2011-2018.

Asokan S., Selvaraju G., Palanivel K., & Srinivasan P. (2017). Seroprevalence of canine leptospirosis in Namakkal, Tamil Nadu by Microscopic Agglutination Test. *Journal of Cell and Tissue Research*. 17. 5991-5996.

Brandão A., Camargo E., da Silva E., Silva M., & Abrão R. (1998). Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36. 3138-42.

Haake D.A., & Galloway R.L. (2021). Leptospiral Infections in Humans, *Clinical Microbiology Newsletter*, Volume 43, Issue 20, Pages 173-180.

European Centre for Disease Prevention and Control. Leptospirosis. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.

Bal A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R.A., De Meza-Brewster J., Korver H., & Terpstra W.J. (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1894–1898.

Thibeaux R., Girault D., & Bierque E., et al. (2018). Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Lehmann J., Matthias M., Vinetz J., & Fouts D. (2014). Leptospiral Pathogenomics. *Pathogens* (Basel, Switzerland). 3 (2), 280-308.

Veerapandian R., & Natarajaseenivasan K. (2015). Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). Critical reviews in microbiology. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 1–17.

Tahara H., Takabe K., Sasaki Y., Kasuga K., Kawamoto A., Koizumi N., & Shuichi N. (2018). The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira*: Swimming and crawling. *Science Advances*, 4(5).

Akhtar T., Naeem M., Younus M., Nisa Q., Ahmad H., Wazir N., & Tanveer K. (2024). Dog-mediated Leptospirosis. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 356-368.

Gonçalves-de-Albuquerque C.F., Cunha C.M.C.d., Castro L.V.G.d., Martins C.d.A., Barnese M.R.C., Burth P., & Younes-Ibrahim M. (2023). Cellular Pathophysiology of Leptospirosis: Role of Na/K-ATPase. *Microorganisms*. 11(7):1695.

Wild C., Greenlee J., Bolin C., Barnett J., Haake D., & Cheville Norman. (2002). An Improved Immunohistochemical Diagnostic Technique for Canine Leptospirosis using Antileptospiral Antibodies on Renal Tissue. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 14(1), 20–24.

Marinho Márcia. (2012). Leptospirosis: Epidemiologic Factors, Pathophysiological and Immunopathogenic. *Current Topics in Tropical Medicine*, 43.

Munoz-Zanzi C., Groene E., Morawski B. M., Bonner K., Costa F., Bertherat, E., & Schneider M. C. (2020). A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 44, e78.

Yasouri S., Doudi M., Ghane M., Naghavi N., Rezaei A. (2020). The Effect of Environmental Stresses on lipL32 Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. through Real-Time PCR. *Polish journal of Microbiology*, 69(3); 301-310.

Dellagostin O. A., Grassmann A. A., Rizzi C., Schuch R. A., Jorge S., Oliveira T. L., McBride A. J. A., & Hartwig, D. D. (2017). Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 158.

Paraguison-Alili R., Renman Dela Cruz, Balaga A. M., Palasi A. (2022). Isothermal Amplification-Based Detection Platforms for Pathogenic *Leptospira* Species in Flood and Environmental Waters. *International Journal of Tropical Diseases*. 5.

Sykes J.E., Reagan K.L., Nally J.E., Galloway R.L., Haake D.A. (2022). Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. *Pathogens*, 11(4):395.

BIBLIA

John M. Butler. (2012). Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.

Feigin RD., & Cherry JD. (1998). Textbook of Pediatric Infectious Disease. E-Book: 2-Volume Set. Elsevier Health Sciences. W.B. Saunders, 1506pp.

Bisen, P. S., & Raghuvanshi, R. (2013). *Emerging epidemics: Management and control*. John Wiley & Sons.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

<https://eody.gov.gr/disease/leptospeirosi/> (accessed on March 2025)