

Leptospiroza – groźna choroba zwierząt i zoonoza

Zdzisław Gliński, Krzysztof Kostro

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Patogeny cechują się nie tylko zdolnością wywoływania chorób u określonych gatunków zwierząt, ale też zdolnością adaptacji do nowych gatunków i zasiedlania nowych ekosystemów oraz właściwościami przekraczania bariery międzygatunkowej pomiędzy zwierzęciem a człowiekiem. Chociaż związki pomiędzy chorobami człowieka i chorobami zwierząt były znane od dawna, to nie opierały się jednak na racjonalnych przesłankach, ponieważ nie znano zarówno etiologii chorób zakaźnych i pasożytniczych, jak i dróg szerzenia się chorób oraz uwarunkowań epidemiologicznych i roli odporności w rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych. Dopiero poznanie tych związków, a także roli przenosi-cieli mechanicznych i biologicznych stało się racjonalną podstawą pełnego poznania chorób zakaźnych. Tylko wyjątkowo, jak to miało miejsce w przypadku zimnicy, sugerowano istnienie związku pomiędzy bagnami i mokradłami, a tym samym obecnością komarów i występowaniem endemicznym zimnicy. Wiadomo też było, że epidemie dżumy u ludzi poprzedzało zawsze masowe padanie szczurów, zaś konsumpcja żywności pochodzącej od chorych zwierząt może spowodować zachorowania u ludzi.

Do chorób zakaźnych i zaraźliwych wielu gatunków zwierząt domowych i wolno żyjących, a także ludzi, należą leptospirozy (krętkowice). Wśród znanych ponad 300 serotypów w obrębie rodzaju *Leptospira* niektóre, oprócz patogenności dla zwierząt, mają charakter zoonotyczny i u człowieka wywołują leptospirozy odzwierzęce. Stąd też leptospirozy w Polsce są umieszczone w wykazie chorób zakaźnych i zakażeń człowieka, objętych ustawą z 5 grudnia 2009 r. o zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi (Dz.U. 2008, nr 234, poz. 1570). Do 2006 r. leptospirozy zwierząt znajdowały się w wykazie chorób zakaźnych notyfikowanych do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt – OIE (1), brak ich natomiast w wykazie chorób zakaźnych notyfikowanych do OIE w 2012 r. (2).

Epidemiologia

Na leptospirozy chorują zwierzęta i ludzie na całym świecie. Większe nasilenie zachorowań obserwuje się w krajach

o ciepłym klimacie oraz w hodowlach wielkotowarowych zwierząt. Częstsze zachorowania występują w ciepłej porze roku. Stałym źródłem zakażenia, rezerwuaem leptospir, są zwierzęta dziko żyjące, szczególnie gryznie, oraz pastwiska i woda, w której leptospiry nie tylko przeżywają, ale mogą się rozmnażać. Duży problem w hodowli, zwłaszcza bydła, stanowi leptospiroza w krajach Ameryki Południowej i Północnej, Australii oraz we wschodniej i południowej Azji. W Polsce bydło choruje sporadycznie, natomiast znacznie częściej na leptospirozę chorują świnie, psy i zwierzęta futerkowe. Leptospirozy odzwierzęce są niebezpiecznymi zoonozami. W Europie leptospirozy zwierząt w okresie 2010–2011 r. występowały w 16 krajach (tab. 1).

Systematyka leptospir

Systematyka leptospir nadal nie jest w pełni ustalona. Obejmowała ona najczęściej patogeny zwierząt i człowieka, często budząc kontrowersje (3). Rodzaj *Leptospira* należy do rodziny Leptospiraceae, łącznie z rodzajami *Turneria* i *Leptonema*. Patogenne leptospiry grupowano w rodzaju *Leptospira*, gatunku *L. interrogans*. W oparciu o hybrydyzację DNA wyróżniono 20 gatunków i cztery genomogatunki (genomospecies; 4, 5). W ich obrębie wyróżnia się ponad 200 serowarów (serotypów; 6). W 2002 r. Komisja Taksonomii Leptospir Międzynarodowej Unii Stowarzyszeń Mikrobiologów (International Union of Microbiological Societies) przyjęła sposób zapisu dla rodzaju, gatunku i serowaru *Leptospira* np. *Leptospira interrogans* serowar Pomona. Pomocna w diagnostyce laboratoryjnej jest kwalifikacja leptospir pod względem patogenności (tab. 2; 7). Na tym polu pewien sukces przyniosły badania Fenner i wsp. (8), dotyczące polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) szczepów patogennych *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* i *L. kirschneri*, szczepów o małej patogenności i niepatogennych oraz wykorzystanie metody D-HPLC do wykrywania obecności leptospir w zakażonych tkankach zwierząt oraz nad równoczesną identyfikacją patogennych i niepatogennych gatunków *Leptospira* metodą multiplex RT-PCR (TaqMan) (9). Ważniejsze serowary *L. interrogans*, patogenne dla

Leptospirosis – dangerous disease of animals and zoonosis

Gliński Z., Kostro K., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

This review aims at the presentation of leptospirosis, an important zoonotic bacterial disease. Its occurrence in humans is influenced by connections to animal production, at-risk occupations, behavior and also tropical climate. It is counted among the most widespread zoonoses. Leptospirosis is caused by spirochetes from genus *Leptospira*. There are more than 200 distinct leptospiral serovars recognized and arranged in 23 serogroups. Genetic typing is likely the future of leptospiral taxonomy. Leptospirosis is strongly environmentally associated and transmission depends on direct and indirect interactions between humans and animal reservoir hosts. Many serovars appear to have a certain species as a natural host but animals and humans can be infected with variety of serovars. Leptospirae often colonize proximal convoluted kidney tubules and may be excreted in urine by reservoir animal without clinical signs. The carrier state may be quite short (just few days) or may extend for an animals' life. Indirect exposure depends on mild environmental conditions that favor survival of leptospirae. Few leptospiral factors that contribute to the pathogenesis of disease have been identified: periplasmic endoflagella, sphingomyelinase, porphyrins, LPS, lipoproteins and Lig proteins. Laboratory diagnosis employs tests designed to detect anti-leptospiral antibodies (microscopic agglutination test and ELISA) and to detect leptospirae (isolation of leptospirae from clinical material), leptospiral antigens (immunofluorescence, immunohistochemistry) or leptospiral nucleic acid (PCR) in animal tissues or body fluids.

Keywords: *Leptospira* spp., leptospirosis, reservoir hosts, zoonosis.

Tabela 1. Leptospiroza zwierząt w Europie w latach 2010–2011 (75)

Kraj	2010 r.	2011 r.
Albania	+	+
Chorwacja		+
Dania	+	+
Estonia		+
Finlandia	+	+
Francja	+	+
Hiszpania	+	+
Irlandia	+	+
Niemcy	+	+
Norwegia		+
Portugalia		+
Rosja	+	+
Rumunia	+	+
Szwecja	+	+
Wielka Brytania	+	+
Włochy	+	+

Tabela 2. Klasyfikacja leptospir ze względu na patogenność (76; częściowo zmieniono)

Patogeny	<i>Leptospira interrogans</i>
	<i>Leptospira kirschneri</i>
	<i>Leptospira noguchii</i>
	<i>Leptospira alexanderi</i>
	<i>Leptospira weilii</i>
	<i>Leptospira genomospecies 1</i>
	<i>Leptospira borgpetersenii</i>
	<i>Leptospira santarosai</i>
	<i>Leptospira kmetyi</i>
	<i>Leptospira meyeri</i>
	<i>Leptospira inadai</i>
Stabe patogeny lub leptospiry oportunistyczne	<i>Leptospira inadai</i>
	<i>Leptospira fainei</i>
	<i>Leptospira broomii</i>
	<i>Leptospira licerasiae</i>
	<i>Leptospira wolffii</i>
Saprofity	<i>Leptospira biflexa</i>
	<i>Leptospira meyeri</i>
	<i>Leptospira wolbachii</i>
	<i>Leptospira genomospecies 3</i>
	<i>Leptospira genomospecies 4</i>
	<i>Leptospira genomospecies 5</i>

zwierząt i człowieka i najważniejszych nosicieli, zawiera tabela 3. Najważniejszymi nosicielami leptospir są gryzonie, ale może być bydło, świnię, owce, kozy, psy.

Struktura i właściwości hodowlane leptospir

Leptospiry są Gram-ujemnymi, cienkimi spiralnymi bakteriami (6–20 × 0,1 μm) z haczykowato zakończonym jednym lub obydwo ma końcami. Są one obdarzone ruchem dzięki włóknu osiowemu, którego zakończenia wychodzą poza komórkę tworząc dwie polarnie ułożone rzęski. Mutanty mogą być pozbawione rzęsek (10). Z błoną cytoplazmatyczną są ściśle związane peptydoglikany, zaś zewnętrzna błona komórkowa zawiera lipoproteidy, transmembranowe białka i LPS (11). Transmembranowe białka leptospir cechują się właściwościami adhezyjnymi do białek zewnątrzkomórkowej macierzy i czynnika H komórki gospodarza. Chronią one przy tym bakterie przez zniszczeniem przez aktywowany układ dopełniacza (12). Antygeny somatyczne leptospir stanowią kompleksy wielocukrowo-białkowo-lipidowe. Swoistość tych antygenów determinuje określona struktura chemiczna komponentu wielocukrowego, a immunogenność komponent białkowy. Od struktury lipopolisacharydu (LPS) zależy przynależność do określonego, immunologicznie swoistego serowaru (13). W organizmie LPS aktywuje głównie receptor Toll-podobny 2 (TRL-2) komórek gospodarza, w mniejszym zakresie receptor Toll-podobny 1 (TRL-1). Antygen somatyczny *L. interrogans* wykazuje zmienność w zależności od przebiegu zakażenia (ostre lub przewlekłe; 14). Zjadliwość

leptospir jest uwarunkowana białkami powierzchniowymi zarazka, LPS, obecnością sfingomielinaz, hemolizyn i poryn.

Genom patogennych leptospir ma dwa chromosomy, które różnią się wielkością. Na przykład u *L. interrogans* serowar Copenhageni i *L. interrogans* serowar Lai wynosi on około 4,6 Mb u *L. borgpetersenii* 3,9 Mb. U *L. interrogans* i *L. borgpetersenii* zidentyfikowano 2708 genów, przy czym 656 genów warunkuje patogenność tych gatunków (15). Oznaczania sekwencji genów dzięki technice VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) i MLST (Multilocus Sequence Typing) mogą być przydatne do identyfikacji gatunkowej leptospir (3).

Leptospiry są tlenowcami, ale najlepszy wzrost uzyskuje się w atmosferze o częściowo zmniejszonej zawartości tlenu. Dają się hodować na podłożach selektywnych, przy czym najlepszym podłożem hodowlanym jest płynne podłoże EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) wzbogacone w dodatek 0,21% surowicy króliczej. Jej dodatek do podłoża wzmacnia wzrost wybrednych pod względem zapotrzebowania wzrostowego szczepów (16). Na podłożu EMJH, przy temperaturze inkubacji 30°C, wzrost saprofitycznych szczepów pojawia się po 2–3 dniach, a patogennych po 4–7 dniach. Temperatura inkubacji 15°C umożliwia odróżnienie gatunków patogennych leptospir od niepatogennych, ponieważ minimalna temperatura wzrostu dla patogenów wynosi 13–15°C, a dla saprofitów 5–10°C (7). Głównym źródłem węgla w podłożach hodowlanych są długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, których źródłem jest Tween lub Tween80/Tween 40. Źródła żelaza konieczne do wzrostu mogą się

różnić, może być nim hem i hemina dzięki obecności HbpA (hemin-binding protein A). *Leptospira interrogans* i *L. biflexa* mogą korzystać z syderoforów wydzielanych przez różne rodzaje bakterii (17, 16).

Materiał biologiczny do badań laboratoryjnych należy przesyłać w stanie schłodzenia (2–5°C). Do transportu materiału zaleca się podłoże płynne lub roztwór 1% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) z dodatkiem 100–200 μg 5-fluorouracylu/ml (18). Do hodowli jest zalecane półpłynne podłoże agarowe (0,1–0,2%) z dodatkiem BSA i Tween 80, podłoże EMJH lub BSA z dodatkiem Tween80/Tween 40. W celu zahamowania wzrostu mikroflory zanieczyszczającej zaleca się stosowanie 5-fluorouracylu, kwasu nalidyksowego, fosfomicyny, mieszanin antybiotyków (rifamycyna, polimyksyna, neomycyna, bacytracyna, aktidion). Ich dodatek może utrudnić izolowanie leptospir przy małej ilości żywych leptospir w materiale oraz w przypadku niektórych szczepów *Leptospira*. Wzbogacenie podłoża półpłynnego w 0,4–1,0% surowicy króliczej zwiększa szanse izolowania niektórych serowarów (19). Czas inkubacji jest długi i w 29 ± 1°C wynosi co najmniej 16 tyg., najlepiej przedłużyć ten czas do 26 tyg. W przypadku mniej wymagających serowarów (*L. interrogans* serowar Hardjo, *L. interrogans* serowar Grippotyphosa) wzrost uzyskuje się po 7–10 dniach.

Leptospiry są podatne na działanie czynników fizycznych i chemicznych. Czas przeżycia w środowisku zależy głównie od temperatury, wilgotności i pH. W środowisku wilgotnym lub w wodzie o pH obojętnym lub lekko zasadowym leptospiry nie tracą żywotności przez kilka tygodni. W wodach stojących nie tracą żywotności po 6 miesięcy. Szybko giną pod wpływem promieni słonecznych, wysuszenia i w kwaśnym moczu. W mleku i żółci giną dość szybko. W 40°C giną po 4 godz., w 60°C po kilku sekundach. Są wrażliwe na ogólnie dostępne środki odkażające, w szczególności 0,5% fenol, 0,25% formalina, które je inaktywują po 5 min.

Chorobotwórczość

Patogenne leptospiry są bardzo ruchliwymi i inwazyjnymi bakteriami (20), dla których wrotami zakażenia są rany skóry i błon śluzowych, skąd szybko, dzięki własnemu ruchowi, rozprzestrzeniają się w organizmie i osiagają narządy docelowe. Pomimo uruchomienia w zakażonym organizmie mechanizmów odporności humoralnej, zakażenie nie zostaje zlikwidowane i leptospiry kolonizują kanaliki nerkowe, czego następstwem jest nosicielstwo i siewstwo zarazka wraz z moczem. Ważniejsze serowary *L. interrogans* powodujące choroby

zwierząt i ludzi oraz głównych nosicieli podano w tabeli 3.

Za chorobotwórczość leptospir odpowiada wiele czynników, które umożliwiają wnikięcie do organizmu, rozprzestrzenienie i przyczepienie do komórek i białek macierzy gospodarza (21). Posiadanie peryplazmatycznych rzęsek, nadających dużą ruchliwość, zapewnia leptospirom szybkie rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza (22). Szybkie dotarcie do wrót zakażenia, jakimi są rany, umożliwia chemotaksja do hemoglobiny występującej w ranach (23). Ważnymi czynnikami zjadliwości jest sfingomielinaza C i poryny (24), LPS i adhezyny. LPS rozpoznawany przez receptor Toll-podobny 2 (TRL-2) makrofagów (25, 26), a komponent wielocukrowy LPS indukuje swoistą odporność w zależności od jej struktury, co stanowi podstawę do wyodrębnienia serowarów (serotypów) w obrębie *Leptospira* (27). Białko powierzchni komórki leptospir przyłączające się do fibronektyny jest jedną z poznanych adhezyn (28), dzięki której patogen szybko pokonuje bariery międzykomórkowe (20).

Ważnym czynnikiem patogenności, dzięki któremu jest możliwa adhezja leptospir do komórek zakażonego organizmu, jest białko błony komórkowej OmpL1, lipoproteiny LipL41, LipL32, peryferyjne białko błonowe P32_{LipL45} (29, 30) i białko LigA. Ich ekspresja ma miejsce w podczas zakażenia (31). LigA jest białkiem bakteryjnym z domenami immunoglobulinopodobnymi (bacterial immunoglobulin-like domains-Big) występującym u *L. interrogans* i *L. kirschneri*, które jest odpowiedzialne za inwazyjność i adhezję patogennych leptospir do komórek zakażonego organizmu. Geny *ligA* i *ligB* kodują aminoterminale lipoproteiny peptydów sygnałowych. Utrata białka Lig i ekspresji transkryptu RNA wiążą się z utratą wirulencji w trakcie hodowli i atenuacji szczepów wirulentnych. Białka Lig są najważniejszym antygenem rozpoznawanym w ostrej leptospirozie (12, 32).

Leptospiroza u bydła

Leptospira Hardjo, *L. Pomona*, *L. Canicola*, *L. Grippotyphosa* i *L. Icterohaemorrhagiae* należą do najważniejszych leptospir powodujących zachorowania u bydła. Nasilenie objawów i przebieg choroby zależą od serowaru *Leptospira* oraz od wieku zwierząt. W ostrej postaci choroby, na którą chorują głównie cielęta, występuje gorączka, utrata łaknienia, zapalenie spojówek, biegunka, niekiedy żółtaczka, hemoglobinuria, niedokrwistość, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych, któremu towarzyszą zaburzenia koordynacji ruchów, ślinotok i sztywność mięśni. Część chorych

cieląt pada w ciągu 3–5 dni, a cielęta, które przeżyły słabo się rozwijają.

U dorosłego bydła pierwsze objawy choroby w postaci gorączki, depresji są często słabo zaznaczone i pozostają niezauważone. Najważniejszymi objawami są ronicenia, spadek płodności oraz produkcji mleka. Ronicenia i porody niezdolnych do życia płodów wywołuje *L. Pomona*, rzadziej *L. Hardjo*. Ronicenia występują w trzecim trymestrze ciąży i towarzyszy im zatrzymanie łożyska u około 20% roniczących krów oraz zaburzenia płodności. W stadach, w których leptospiroza wystąpiła po raz pierwszy odsetek poronień może osiągnąć 30%. Natomiast w ogniskach endemicznych leptospirozy ronicenia występują sporadycznie i dotyczą młodszych krów. Niektóre serowary, oprócz późnych ronicień, są przyczyną porodów martwych cieląt i wzrostu śmiertelności noworodków. Następnym zakażenia niektórymi serowarami jest spadek produkcji mleka lub nawet bezmleczność, przy wyraźnych brakach zapalenia gruczołu mlekowego. Zmiany w wyglądzie mleka utrzymują się przez 4–5 dni, produkcja mleka powraca do stanu przed chorobą po około 10–21 dniach. W ciężkim przebiegu leptospirozy występuje żółtaczka.

Po ostrym przebiegu choroby leptospiry często lokalizują się w nerkach lub w układzie rozrodczym, są wydalane z moczem, niekiedy przez miesiące, a nawet lata. W postaci przewlekłej i atypowej leptospirozy objawy kliniczne są słabiej zaznaczone.

Leptospiroza u owiec i kóz

Leptospirozę u owiec i kóz wywołują *L. Hardjo*, *L. Pomona*, *L. Grippotyphosa* i *L. Ballum* (33, 34). Choroba przebiega, podobnie jak u bydła, z objawami gorączki i anoreksji, niekiedy też z żółtaczką, hemoglobinurią lub niedokrwistością. Okresowo pojawiać się też mogą przemijające stany gorączkowe, zaburzenia trawienne, włącznie z atonią żwacza i biegunką, oraz niedokrwistość. Do tych objawów mogą dołączyć się poronicenia, rodzenie słabych lub martwych jagniąt i koźląt, a także zaburzenia płodności u matek. Typowa kliniczna postać choroby jest stosunkowo rzadko notowana, ale, zwłaszcza w postaci ostrej, śmiertelność może sięgać nawet do 70% pogłowia. W przewlekłych stanach dochodzi natomiast do atonii żwacza i wychudzenia.

Najczęściej objawy kliniczne występują u młodych zwierząt (do 1 roku życia). Jednak w większości przypadków choroba przebiega u nich łagodnie i kończy się wyzdrowieniem, a wskaźnik upadków nie przekracza zwykle 8–10%. Ciężarne samice roniają lub rodzą słabe, niezdolne do życia jagnięta lub koźlęta. Odsetek spontanicznych ronicień z powodu leptospirozy może wahać się u owiec i kóz od 15 do 20%. Występuje też niepłodność (35), nosicielstwo i siewstwo leptospir z moczem trwające miesiące, a nawet lata (36). W niektórych krajach o intensywnej hodowli owiec (Nowa Zelandia) około 4% ich populacji stale rozsiewa leptospiry z moczem.

Tabela 3. Ważniejsze serowary *L. interrogans* patogenne dla zwierząt i człowieka (76, 77)

Serowar	Gatunki wrażliwe na zakażenie	Najważniejsi nosiciele
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	bydło, świnie, konie, psy, lisy, króliki, świnki morskie, jeże, foki, człowiek	szczury, psy, lisy, konie, bydło
<i>L. Grippotyphosa</i>	świnie, konie, bydło, owce, kozy, psy, foki, człowiek,	myszy, bydło, człowiek
<i>L. Hardjo</i>	bydło, owce, kozy, konie, jelenie, człowiek	gryzonie, bydło, owce
<i>L. Saxkoebing</i>	zwierzęta domowe, człowiek	myszy, bydło
<i>L. Canicola</i>	psy, bydło, świnie, konie, człowiek	psy
<i>L. Pomona</i>	świnie, konie, bydło, owce, kozy, psy, jelenie, człowiek	świnie, bydło, owce, konie
<i>L. Tarassovi</i>	świnie, bydło, psy, człowiek	świnie
<i>L. Bratislava</i>	psy, świnie	świnie
<i>L. Bataviae</i>	koty, psy, człowiek	koty, psy, szczury, myszy
<i>L. Sejroe</i>	konie, psy, bydło, świnie	myszy, szczury, konie, bydło
<i>L. Autumnalis</i>	psy, świnie, człowiek	myszy, szczury, świnie
<i>L. Australis</i>	psy, konie, człowiek	szczury, myszy
<i>L. Zanonii</i>	człowiek	szczury
<i>L. Hebdomadis</i>	świnka morska, człowiek	myszy, psy
<i>L. Copenhageni</i>	psy, jelenie, człowiek	gryzonie
<i>L. Ballum</i>	owce, kozy, psy	myszy, szczury
<i>L. Muenchen</i>	świnie	gryzonie

Leptospiroza u koni

Przyczyną zachorowań są serotypy: *L. Hardjo*, *L. Pomona*, *L. Canicola*, *L. Icterohaemorrhagiae* i *L. Sejro*. W większości przypadków choroba ma przebieg subkliniczny (37). Częstość objawem jest ostre nawracające surowiczo-włóknikowe zapalenie tęczówki, ciała szklatego, siatkówki, rogówki i nerwu wzrokowego, co prowadzi do całkowitego zaniku gałki ocznej i ślepoty. W przewlekłej postaci zapalenia pojawiają się najrozmaitsze zaburzenia, jak zmętnienie rogówki, ciała szklatego i zaciemnienie (38). Chore konie szybko się męczą, występuje kulawizna, sztywny chód, objawy morzyskowe, żółtaczką, krew w moczu. Mogą sporadycznie występować poronienia, zapalenie mózgu i zapalenie opon mózgowych (39). W zajęciu nerek występuje siewstwo leptospir (40).

Leptospiroza u świń

Choroba występuje przede wszystkim w stadach wielkotowarowych świń, ale może występować w stadach zarodowych. W Polsce chorobę najczęściej wywołują *L. Pomona*, *L. Tarassovi*, *L. Canicola*, mniejszą rolę odgrywają *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Sejro* i *L. Grippytyphosa*, które najczęściej powodują postać subkliniczną.

Najczęstszą drogą zakażenia jest przewód pokarmowy, ale istnieje możliwość zakażenia przez uszkodzoną skórę oraz przez drogi rodne w trakcie krycia. Następstwem zakażenia jest bakteremia, a następnie odpowiedź immunologiczna. Organem docelowym działania leptospir są przede wszystkim nerki. W okresie zdrowienia i w zakażeniach bezobjawowych leptospiry osiedlają się oraz rozmnażają w kanalikach nerkowych i są wydalane z moczem nawet do 2 lat. Najbardziej podatne na zakażenie transmasciczne są płody w trzecim trymestrze ciąży. Efektem jest śmierć płodu, przedwczesny poród lub ronienie. Prosięta, które przeżyły zakażenie rodzą się słabe, wśród objawów żółtaczki i rzadko przeżywają kilka dni.

U prosiąt, które rzadko chorują, występuje utrata łąknienia, zażółcenie błon śluzowych i krew w moczu. W ciężkim przebiegu choroby chore sztuki padają.

U świń częste są zakażenia bezobjawowe, powiązane z nosicielstwem i siewstwem zarazka. Natomiast jawna ostra postać choroby występuje rzadko i dotyczy niewielkiej liczby zwierząt. Cechuje się ona utratą łąknienia, gorączką i biegunką lub zaparciami utrzymującymi się przez 2–3 dni. Pierwsze chorują warchlaki. W postaci podostrej objawy chorobowe są słabiej wyrażone.

Rozrodcza postać choroby dotyczy macior ciężarnych. Najczęściej ronią loszki

lub pierwiastki w ostatnim trymestrze ciąży, które po raz pierwszy uległy zakażeniu. Maciory mogą też rodzić w terminie martwe prosięta lub słabe mioty, które szybko giną. Lochy jeden raz ronią, ponieważ na skutek rozwoju odporności stają się niepodatne na zakażenie tym samym serotypem zarazka. Stają się one jednak nosicielami i rozsiewają zarzek wraz z moczem.

Charakter i nasilenie zmian pośmiertnych, podobnie jak obraz kliniczny choroby i jego nasilenie, zależą od serotypu leptospir, który wywołał zakażenie. W zakażeniu *L. Pomona* i *L. Tarassovi* są one ograniczone. U części padłych zwierząt i poronionych płodów występuje żółtaczką, powiększenie węzłów chłonnych i wątroby, obrzęk, nacieki limfocytarne i komórki plazmatycznych. Leptospiry są obecne w świetle i w nabłonku kanalików nerkowych oraz w nacieku leukocytarnym. W miocie poronionym obok płodów zmacerowanych lub zmumifikowanych występują płody o normalnym wyglądzie.

Do diagnostyki choroby, oceny stanu zdrowotnego stada i śledzeniu dynamiki procesu chorobowego jest stosowany odczyn aglutynacji mikroskopowej (MAT). OIE zaleca badanie surowic pobranych co najmniej od 10 zwierząt lub od 10% zwierząt. Odczyn dodatni wskazuje na aktualnie istniejące lub uprzednio przebyte zakażenie. Na toczący się proces chorobowy wskazuje wzrost miana swoistych przeciwciał w kolejnych partiach surowicy pochodzącej z kolejnych pobrań krwi. Test ELISA umożliwia wykrycie wczesnych zakażeń (41).

Leptospiroza u psów

Przebieg i objawy leptospirozy u psów różnią się w zależności od serowaru, a niekiedy i szczepu *Leptospira*, wieku psów i stanu odporności i płci. Częściej bowiem chorują dorosłe zwierzęta, samice i psy dużych ras (42, 43). Przyczyną choroby są: *L. Pomona*, *L. Grippytyphosa*, *L. Canicola*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Tarassovi*, *L. Ballum*, *L. Bratislava*, rzadziej *L. Zononi*, *L. Pyrogenes* i *L. Paidjan*. Z niektórymi serowarami wiążą się określone zespoły chorobowe. Gorączka, wybroczyny na błonach śluzowych, niedokrwistość, żółtaczką są typowymi objawami dla zakażenia *L. Icterohaemorrhagiae*. Ostra niewydolność nerek, łącznie z przewlekłym zapaleniem wątroby lub samo zapalenie wątroby, charakteryzuje zakażenie wywołane przez *L. Grippytyphosa*. Zakażenie serowarem *L. Pomona* często ma bezobjawowy przebieg, przy czym psy są długotrwałymi siewcami leptospir. Natomiast efektem zakażenia przez *L. Canicola* jest przewlekłe śródmiąższowe

zapalenie nerek (44, 45). Czasami leptospiroza u jednych psów przebiega bezobjawowo, u innych w łagodnej postaci, u części psów jej przebieg jest ciężki i kończy się śmiercią (46).

Objawy kliniczne są różnorodne i żaden nie ma charakteru patognomicznego. Choroba z reguły zaczyna się gorączką, dreszczami, depresją, utratą apetytu, bólami mięśniowymi, osłabieniem i sztywnym chodem. Często błony śluzowe są przekrwione. W miarę upływu czasu mogą pojawić się objawy zajęcia nerek, o czym świadczy bezmocz lub częste oddawanie moczu, hematuria, wymioty, odwodnienie i owrzodzenie jamy ustnej. Mogą też występować poronienia, biegunka, żółtaczką, kaszel, duszność i zapalenie spojówek. U części psów występuje zespół krwotoczny cechujący się wybroczynami i wylewami krwawymi na błonach śluzowych. W późniejszym okresie trwania zespołu rozwija się krwotoczne zapalenie przewodu pokarmowego, występują też krwawienia z nozdrzy. Często dochodzi do zajęcia nerek (47, 48, 49). Leptospirozę o nadostrym przebiegu cechują nagłe padnięcia.

Leptospiroza u dzikich zwierząt

U zwierząt dzikich zakażeniu leptospirami najczęściej nie towarzyszą objawy kliniczne. Leptospiroza u gryzoni ma przebieg bezobjawowy. U fok w ogrodzie zoologicznym leptospiroza przebiegała w postaci ostrej posocznicy. Występowały takie objawy, jak: depresja, nadmierne pragnienie, gorączka i poronienia. Przyczyną choroby była *L. Icterohaemorrhagiae* i *L. Copenhageni* (50). Od hodowanych jeleni izolowano *L. Hardjobovis*, *L. Pomona* i *L. Copenhageni*, którą izolowano najrzadziej. U jeleni stwierdzono przeciwciała dla *L. Australis*, *L. Ballum*, *L. Balcantica* i *L. Tarassovi*. *Leptospira Pomona* wywołuje chorobę o przebiegu klinicznym, a być może też subklinicznym, podczas gdy następstwem zakażenia *L. Hardjobovis* jest wyłącznie choroba o przebiegu subklinicznym. Leptospirozę jeleni najczęściej wywołują *L. Hardjobovis* i prawdopodobnie *L. Pomona*, natomiast zakażenia *L. Copenhageni* mają charakter przypadkowy (51).

Leptospiroza zwierząt u futerkowych

Lisy polarne i srebrzyste chorują najczęściej na nadostrą lub ostrą postać leptospirozy. Chorobę najczęściej wywołuje *L. Icterohaemorrhagiae*. Postać nadostrą cechują nagłe zachorowania i padnięcia, zaś w postaci ostrej występują objawy podobne do pojawiających się u innych gatunków zwierząt. Żaden nie ma charakteru patognomicznego (52).

Leptospiroza jako zoonoza

Leptospiroza jest najpowszechniej występującą na świecie zoonozą i stanowi ogromny problem zdrowotny, zwłaszcza w krajach rozwijających się (13). Corocznie choruje około 10 mln ludzi. Najczęstszymi serotypami wywołującymi leptospirozę u ludzi są: *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Grippityphosa*, *L. Pomona*, *L. Canicola*, *L. Sejroe*, *L. Tarassovi* i *L. Saxkoebing*. Człowiek jest szczególnie wrażliwy na zakażenie leptospirami. Poszczególne serowary są odpowiedzialne za oddzielne jednostki chorobowe: *L. Icterohaemorrhagiae* wywołuje chorobę Weila, *L. Grippityphosa*, rzadziej *L. Sejroe* są przyczyną gorączki błotnej, *L. Pomona* powoduje chorobę pasteryzacji, *L. Canicola* gorączkę canicola (53, 54). Najczęściej chorują ludzie z grupy podwyższonego ryzyka, a więc mający kontakty ze zwierzętami, jak: lekarze weterynarii, zootechnicy, personel rzeźni i personel obsługujący zwierzęta.

Człowiek zakaża się bezpośrednio przez jamę ustną, uszkodzoną skórę, spojówkę, błonę śluzową nosa, naturalne otwory ciała oraz pośrednio przez spożycie mięsa zakażonych zwierząt. Choroba szerzy się przez kontakt ze zwierzętami chorymi lub siewcami zarazków, a także przez żywność, wodę i glebę zanieczyszczoną leptospirami.

U ludzi choroba ma z reguły przebieg dwufazowy. Faza pierwsza, ostra lub posocznicowa, zaczyna się nagle i trwa około tygodnia. Cechuje się nieswoistymi objawami, takimi jak: gorączka, bóle głowy, wymioty, wybroczyny na spojówkach. W fazie drugiej choroby (faza immunologiczna), która występuje u części pacjentów, pojawia się odpowiedź immunologiczna, leptospiry są wydalane z moczem. Trwa ona 30 lub więcej dni i występuje gorączka, bóle mięśniowe, ale w mniejszym nasileniu aniżeli w pierwszej fazie choroby. Żółtaczka występuje u 5–10% pacjentów i wtedy choroba ma często ciężki przebieg, zajęte są: nerki, wątroba i ośrodkowy układ nerwowy (13).

W chorobie Weila, będącej zakażeniem o przebiegu ostrym, z komplikacjami ze strony wielu narządów, występuje żółtaczka, zaburzenie czynności nerek, zapalenie opon mózgowych, wybroczynowość w płucach, a śmiertelność może przekraczać 15% (55). Leptospiry po wnikięciu do organizmu usadawiają się i wywołują zmiany chorobowe głównie w nerkach, wątrobie i płynie mózgowo-rdzeniowym. Po okresie wylegania, wynoszącym 7–13 dni, występuje nagle gorączka, dreszcze, silne bóle mięśni podudzia i głowy, wymioty, osłabienie, czasami krwotoki z nosa, ust i obecność krwi w kale. Następnie pojawia się żółtaczka oraz mogą dołączać się zaburzenia czynności nerek. U ciężarnych

kobiet może mieć miejsce obumarcie płodu, ronienie lub wczesny poród.

Gorączki błotne przebiegają w łagodnej grypopodobnej postaci. Rzadko występuje żółtaczka, a jeżeli pojawia się, to w niewielkim nasileniu.

Ze względu na powszechne nosicielstwo leptospir przez gryzonie, ich zwalczanie odgrywa decydujące znaczenie zarówno w zapobieganiu, jak i zwalczaniu leptospirozy. Transmisji zakażenia zapobiega używanie odzieży ochronnej, gumowych rękawic, przestrzeganie zasad higieny, ochrona ciała przed skaleczeniami i toaletą ran. Z uwagi na możliwość transmisji zakażenia drogą pokarmową odpowiednie przygotowanie pokarmu, picie wody wolnej od leptospir przerywa łańcuch epidemiologiczny (56).

Metody stosowane w diagnostyce leptospiroz

Diagnostyka opiera się na izolacji *Leptospira* z narządów wewnętrznych (wątroba, płuca, mózg, nerki), płynów ustrojowych (krew, mleko, płyny mózgowo-rdzeniowy, opłucnowy, otrzewnowy), wykazaniu obecności zarazka lub jego kwasu nukleinowego w tkankach i płynach ustrojowych oraz na wynikach badań serologicznych, których celem jest stwierdzenie przeciwciał swoistych dla tego zarazka. Analiza sytuacji epizootologicznej nasuwa podejrzenie leptospirozy, zaś badania kliniczne i sekcyjne są pomocne w prawidłowym rozpoznaniu choroby. Samo badanie kliniczne i sekcyjne ma jednak ograniczoną wartość diagnostyczną.

Izolacja zarazka jest trudna i wymaga kilku tygodni czasu. Decydujące znaczenie w rozpoznaniu mają badania serologiczne, zwłaszcza odczyn aglutynacji mikroskopowej (MAT) i odczyn ELISA. Do identyfikacji leptospir jest zalecany przez OIE test immunohistochemiczny oraz PCR.

Obecność leptospir we krwi, mleku zwierząt z objawami klinicznymi ma znaczenie diagnostyczne i świadczy o ostrej postaci leptospirozy. Nie zawsze jednak udaje się izolacja leptospir z krwi, ponieważ w leptospirozie bakteriemia ma charakter przejściowy i nie zawsze towarzyszą jej objawy kliniczne. Również izolacja z reguły nie udaje się u zwierząt uprzednio leczonych antybiotykami. Izolacja lub wykrycie obecności *Leptospira* w tkankach i płynach ustrojowych płodu świadczy o zakażeniu śródmacicznym, jego rozwoju w organizmie płodu, a także o przewlekłej leptospirozie matki. Ujemny wynik badania moczu nie wyklucza możliwości, że zwierzę jest długotrwałym nosicielem leptospir. Wskazuje jedynie, że w moczu pobranym do badań ilość tego zarazka jest poniżej progu wykrywalności stosowaną

metodą badania. Podanie zwierzęciu diuretyku zwiększa szansę wykrycia leptospir w moczu (57). Test immunofluorescencji jest mniej czuły od metod hodowlanych i nie umożliwia określenia serowaru. OIE zaleca interpretację jego wyników w powiązaniu z wynikami badań serologicznych (2). Test PRC i RT-PCR cechują się dużą czułością, ale, podobnie jak testy immunohistochemiczne, nie pozwalają na określenie serowaru *Leptospira*. W tych testach stosowane są najrozmaitsze startery (58, 59, 60). W badaniach, na razie tylko w wyspecjalizowanych laboratoriach, stosuje się nowoczesne techniki biologii molekularnej. Stosując sekwencjonowanie amplikonów, można określić gatunek i serowar *Leptospira*. Obecność w badanym materiale biologicznym inhibitorów amplikonów, co ma miejsce w autolizowanym materiale lub zanieczyszczeniach kałem, może wpłynąć na prawdziwość wyników. W identyfikacji gatunków jest też wykorzystywana analiza 16S rDNA, analiza 16S lub 23S rRNA (5, 61), MST (Multilocus Sequence Typing) (62), sekwencjonowanie genu DNA kodującego podjednostkę B gyrasy (63) lub test PCR z użyciem starteru ampl.1 (64). Testy aglutynacji krzyżowej umożliwiają określenie grupy serologicznej. Analiza restrykcyjna z użyciem endonukleazy też jest stosowana do określania serowarów *Leptospira* (65, 66).

Decydujące znaczenie diagnostyczne nadal mają badania serologiczne, zwłaszcza odczyn aglutynacji mikroskopowej (MAT) i odczyn ELISA. Jednym z ograniczeń MAT w diagnostyce u poszczególnych osobników jest fakt spadku poziomu przeciwciał poniżej progu wykrywalności w leptospirozie przewlekłej. Istnieją ograniczenia MAT w ustalaniu przyczyny poronień, wykrywaniu nosicieli *Leptospira* w nerkach i w układzie rozrodczym (67). Wartość diagnostyczną ma dodatni wynik MAT z krwią poronionych płodów. MAT jest testem referencyjnym dla wszystkich testów serologicznych w leptospirozie. Swoistość testu MAT jest duża, ale występują odczyny krzyżowe pomiędzy serowarami oraz pomiędzy grupami serologicznymi leptospir. W serologicznym badaniu stada Cole i wsp. (68) zalecają badanie 10 sztuk bydła, a nawet 10% stada.

ELISA jest czułym testem, ale o braku swoistości w odniesieniu do serowarów *Leptospira*. W Europie jest zalecany test ELISA do wykrywania u psów przeciwciał w klasie IgM i IgG dla różnych serowarów leptospir, co pozwala na odróżnienie wczesnego od późnego zakażenia, a także zwierząt szczepionych. Opracowano też testy ELISA do wykrywania przeciwciał w klasach IgM i IgG dla innych gatunków zwierząt (69, 70). Znany jest test

ELISA do badania mleka od poszczególnych krów i mleka zbiorczego w kierunku *L. Hardjo* oraz testy ELISA do wykrywania białek powierzchniowych lub lipoprotein *Leptospira* (71,72).

Postępowanie

W leczeniu stosuje się antybiotyki, surowice odpornościowe oraz leczenie objawowe. Leptospiry są wrażliwe na ogólnie dostępne antybiotyki. Wybór antybiotyku jest podyktowany jego zdolnością wydalania przez nerki oraz niską nefrotoksycznością. Ogólnie przyjęte zasady postępowania profilaktycznego, takie jak: zakaz obrotu chorymi zwierzętami, kwarantanna, tworzenie stad wolnych od zakażenia, monitoring serologiczny stad podejrzanych o chorobę. Eliminacja zakażonych knurów i buhajów odgrywa zasadniczą rolę w profilaktyce i zwalczaniu leptospirozy. Dobre efekty dają szczepienia. Wybór szczepionki zależy od lekarza weterynarii, przy czym sposób podania i czas trwania odporności zależy od rodzaju szczepionki i gatunku zwierzęcia. Spośród nowo opracowanych szczepionek coraz powszechniej są zalecane szczepionki oparte o rekombinowane białko błony *Leptospira*, szczepionki lipopolisacharydowe, szczepionki inaktywowane i atenuowane oraz szczepionki DNA (73, 74). Szczepienia w sposób istotny obniżają odsetek zwierząt zakażonych przy istniejącej ekspozycji i chronią przed ronieniami. Odporność poszczepienna trwa od 6 miesięcy do roku. Podstawowym warunkiem skuteczności szczepionki jest obecność w szczepionce antygenów dla tych serotypów leptospir, które wywołują zakażenie. W przeciwnym wypadku szczepienia nie przyniosą zamierzonego efektu. Szczepienie nie zapobiega jednak nosicielstwu i siewstwu zarazka z moczem. Ze względu na powszechne nosicielstwo leptospir przez gryzonie deratyzacja odgrywa rolę zarówno w zapobieganiu, jak i zwalczaniu leptospirozy. Dewastacja zarazka w środowisku jest warunkiem koniecznym zapobiegania i zwalczania leptospirozy.

Piśmiennictwo

- Wijaszka T., Truszczyński M.: Nowa lista chorób zgłaszanych do OIE. *Medycyna Weter.* 2008, **62**, 1455.
- OIE: Animal Health Code. Vol.II. Recommendations applicable to OIE listed diseases and other diseases of importance to international trade. On line.
- Cerqueira G.M., Picardeau M.: A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 2009, **9**, 760-768.
- Brenner J., Kaufmann A.F., Sulzer K.R., Steigerwal A.G., Rogers F.C., Weyant R.S.: Further determination of DANN relatedness between serogroups and serovars in the family of Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexandri* sp. nov. and four new *Leptospira* genospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, **49**, 839-858.
- Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L., Steigerwal A.G., Mayer L.W., Levett P.N.: Species specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**, 3510-3516.
- Ramadass P., Jarvis B.D.W., Corner R.J., Penny D., Marshall R.B.: Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* spp. By DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992, **42**, 215-219.
- Johnson R.C., Harris V.G.: Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 1967, **94**, 27-33.
- Fenner J.S., Anjum M.F., Randall L.P., Pritchard G.C., Wu G., Errington J., Dalley C.G., Woodward M.J.: Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid spatio-temporal by D-HPCL. *Res. Vet. Sci.* 2010, **89**, 48-57.
- Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A.M., Turhan V., Basustaoglu A.C.: Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. *Pol. J. Microbiol.* 2010, **59**, 167-173.
- Picardeau M., Brenot A., Saint Girons I.: First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol. Microbiol.* 2001, **40**, 189-199.
- Cullen P.A., Cordwell S.J., Bulach D.M., Haake D.A., Adler B.: Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 2311-2318.
- Choy H.A., Kelley M.M., Chen T.L., Moller A.K., Matsunaga J., Haake D.A.: Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogens. *Infect. Immun.* 2007, **75**, 2441-2450.
- Levett P.N.: Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, **14**, 296-326.
- Nally J.E., Chow E., Fishbein M.C., Blanco D.R., Lovett M.A.: Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguishing acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect. Immun.* 2005, **73**, 3251-3260.
- Bulach D.M., Zuerner R.L., Wilson P., Seemann T., McGrath A., Cullen P.A., Davis J., Johnson M., Kuczek E., Alt D.P., Peterson-Burch B., Coppel R.L., Rood J.L., Davies J.K., Adler B.: genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, **103**, 14560-14566.
- OIE: Leptospirosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_Lepto.pdf.
- Louvel H., Bommezzadri S., Zidane N., Boursaux-Eude C., Creno S., Magnier A., Rouy Z., Médigue C., Saint Girons I., Bouchier C., Picardeau M.: Comparative and functional genomic analysis of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. *J. Bacteriol.* 2006, **188**, 7893-7904.
- Johnson R.C., Rogers P.: 5-fluorouracil as a selective medium for growth of Leptospirae. *J. Bacteriol.* 1964, **87**, 422-426.
- Adler B., Faine S., Christopher W.L., Chappel R.J.: Development of an improved medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol.* 1986, **12**, 377-381.
- Barocchi M.A., Ko A.I., Reis M.G., McDonald K.L., Riley L.W.: Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintra-cellular pathogen. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 6926-6932.
- Thomas D.D., Higbie L.M.: In vitro association of leptospires with host cells. *Infect. Immun.* 1990, **58**, 581-585.
- Trueba G.A., Bolin C.A., Zuerner R.L.: Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 1992, **17**, 4761-4768.
- Yuri K., Takamoto Y., Okada M., Hiramune T., Kikuchi N., Yanagawa R.: Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. *Infect. Immun.* 1993, **61**, 2270-2272.
- Lee S.H., Kim S., Park S.C., Kim M.J.: Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphA as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 315-322.
- Werts C., Tapping R.I., Mathison J.C., Chuang T.H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D.A., Godowski P.J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D.M., Kirschning C.J., Wagner H., Aderem A., Tobias P.S., Ulevitch R.J.: Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2001, **2**, 346-352.
- Adler B., de la Peña-Moctezuma A.: Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2010, **140**, 287-296.
- de la Peña-Moctezuma A., Bulach D.M., Adler B.: Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* 2001, **31**, 73-81.
- Merien F., Baranton G., Perolat P.: Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immun.* 1997, **65**, 729-738.
- Haake D.A., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M.: The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 2000, **68**, 2276-2285.
- Matsunaga J., Young T.A., Barnett J.K., Barnett D., Bolin C.A., Haake D.A.: Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect. Immun.* 2002, **70**, 323-334.
- Haake D.A.: Spirochetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000, **146**, 1491-1504.
- Matsunaga J., Barocchi M., Croda J., Young T.A., Sanchez Y., Siquiera L., Bolin C.A., Reis M.G., Riley L.W., Haake D.A., Ko A.I.: Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol. Microbiol.* 2003, **49**, 929-945.
- Cousins D.V., Ellis T.M., Parkinson J., McGlashan C.H.: Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet. Rec.* 1989, **124**, 123-127.
- Farina R., Cerri D.G., Renzoni G., Andreani E., Mani P., Elbani V., Pedrini A., Nuvoloni R.: *Leptospira interrogans* in the genital tract of sheep. Research on ewes and rams experimentally infected with serovar hardjo (hardjobovis). *New Microbiol.* 1996, **19**, 235-344.
- Krawczyk M.: Leptospiroza owiec na podstawie badań serologicznych. *Medycyna Weter.* 1999, **55**, 397-399.
- Lilenbaum W., Vargas R., Ristow P., Cortez A., Souza S.O., Richtzenhain L.J., Vasconcelos S.A.: Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 2009, **87**, 16-19.
- Kitsos-Piggot A.W., Prescott J.F.: Leptospirosis in horses in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 1987, **51**, 448-451.
- Gratzek A.T., Kaswan R.L., Martin C.L., Champagne E.S., White S.L.: Ophthalmic cyclosporine in equine keratitis and keratouveitis: 11 cases. *Equine Vet. J.* 1995, **27**, 327-333.
- Shapiro J.L., Prescott J.F.: Equine abortions in eastern Ontario due to leptospirosis. *Can. Vet. J.* 1999, **40**, 350-351.
- Bernard W.W., Bolin C., Riddle T., Durando M., Smith B.J., Tramontin R.R.: Leptospiral abortion and leptospiuria in horses from the same farm. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1993, **202**, 1285-1286.
- Pejsak Z.: *Choroby świń*. PWR, Poznań 2002.
- Ruhl-Fehlert C.J., Brem S., Feller W.: Clinical, microbiological and pathological observations in laboratory beagle dogs infected with leptospires of the serogroup sebroe. *Exp. Toxic. Pathol.* 2000, **52**, 201-207.
- Goldstein R.E.: Canine leptospirosis. *Vet. Clin. Small Anim.* 2010, **40**, 1091-1101.
- Goldstein R.E., Lin R.C., Langston C.E., Scriveri P.V., Erb H.N., Barr S.C.: Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Vet. Intern. Med.* 2006, **20**, 489-494.
- Alton G.D., Berke O., Reid-Smith R., Ojick D., Prescott J.F.: Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. *Can. J. Vet. Res.* 2009, **73**, 167-174.
- André F.G., Ruveon C.N., Ganière J.P.: Dog leptospirosis: new topics. *Recueil Méd. Vét.* 1994, **170**, 663-668.
- Prescott J.F., Key D., Osuch M.: Leptospirosis in dogs. *Can. J. Vet.* 1999, **40**, 430-431.
- Ward M.P.: Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada. *Prev Vet Med* 2002, **56**, 215-226.
- Miller R.L., Ross S.P., Sullivan N.D., Perkins N.R.: Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. *Aust. Vet. J.* 2007, **85**, 13-19.
- Kik M.J., Goris M.G., Bos J.H., Hartskeerl R.A., Dorrestein G.M.: An outbreak of leptospirosis in seals (*Phoca vitulina*) in captivity. *Vet. Quart.* 2006, **1**, 22-39.
- Ayanegui-Alcarra M.A., Wilson P.R., Mackintosh C.G., Collins-Emerson J.M., Heuer C., Midwinter A.C., Castillo-Alcala F.: Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: a review. *N. Z. Vet. J.* 2007, **55**, 102-108.
- Gliński Z., Kostro K. (red.): *Choroby zakaźne zwierząt z elementami epidemiologii i zoonoz.* PWRiL, Warszawa 2011.
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., Levett P.N., Gilman R.H., Willig M.R., Gotuzzo E., Vinetz J.M.: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Inf. Dis.* 2003, **3**, 751-771.
- Gliński Z., Kostro K., Buczek J.: *Zoonozy.* PWRiL, Warszawa, 2008.
- Marotto P.C., Nascimento C.M., Eluf-Neto J., Marotto M.S., Andrade L., Sztajnbojk J., Seguro A.C.: Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features,

- outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 1999, **29**, 1561-1563.
56. Prost E. K.: *Zwierzęta rzeźne i mięso – ocena i higiena*. LTN, Lublin 2006.
57. Nervig R.M., Garrett L.A.: Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Amer. J. Vet. Res.* 1979, **40**, 1197-1200.
58. Barocchi M.A., Ko A.I., Ferrer S.R., Faria M.T., Reis M.G., Rile L.W.: Identification of New repetitive element of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application of PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 2001, **39**, 191-195.
59. Branger C., Blanchard B., Fillonneau C., Suard I., Aviat E., Chevallier B., Andre-Fontaine G. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *jap1* encoding the hemolysin-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, **243**, 437-445.
60. Levett P.N., Morey R.E., Galloway R.L., Turner D.E., Steigerwait A.G., Mayer L.W.: Detection of pathogenic leptospires by real – time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 2005, **54**, 45-49.
61. Brown P.D., Levett P.N.: Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-reaction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J. Med. Microbiol.* 1997, **46**, 173-181.
62. Salaun L., merien F., Gurianova S., Baranton G., Picardeau M.: Application of multilocus variable number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**, 3954-3962.
63. Snack A.T., Symonds M.L., Dohnt M.F., Smythe L.D.: Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit encoding gene. *BMC Microbiol.* 2006, **27**, 95-98.
64. Reitsstetter R.E.: Development of species-specific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, **264**, 31-39.
65. Hermann J.L., Bellenger E., Perolat P., Baranton G., Sainnt Girons I.: Pulsed-field gel electrophoresis of not digested of leptospiral DNA: A new rapid method of serovar identification. *J. Clin. Microbiol.* 1992, **30**, 1696-1702.
66. Thiermann A.B., Handsaker A.L., Moseley S.L., Kingscote B.: New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup Pomona by restriction endonuclease analysis: serovar kennewicki. *J. Clin. Microbiol.* 1985, **21**, 585-587.
67. Ellis W.A., O'Brien J.J., Neil S.D., Hanna J.: Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.* 1982, **110**, 178-180.
68. Cole J.R., Ellinghausen H.C., Rubin H.L.: Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. *Proc. US Anim. Health Ass.* 1980, **83**, 189-199.
69. Ribotta M.J., Higgins R., Gottschalk M., Lallier R.: Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. *Can. J. Vet. Res.* 2000, **64**, 32-37.
70. Yan K.T., Ellis W.A., Mackie D.P., Taylor M.J., McDowell S.W., Montgomery J.M.: Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Vet. Microbiol.* 1999, **69**, 173-187.
71. Bomfim M.R., Ko A., Koury M.C.: Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2005, **109**, 89-94.
72. Okuda M., Sakaya Y., Matsuuchi M., Oikawa T., Watanabe M., Itamoto K., Iwata H., Kano R., Hasegawa A., Onishi T., Inokuma H.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant OmpL1 protein. *J. Vet. Med. Sci.* 2005, **67**, 249-254.
73. Wang Z., Jin L., Węgrzyn A.: Leptospirosis vaccine. *Mikrob. Cell Fact.* 2007, **6**, 39-43.
74. Humphries P.C., Weeks M.E., Gilbert A., Thomson G., Coldham N.G.: Analysis of multiple *Leptospira interrogans* serovar Canicola vaccine proteomes and identification of LipL32 as a biomarker for potency. *Clin Vaccine Immunol.* 2012, **19**, 587-593.
75. OIE: Animal Health information. WAHID 2013. On line.
76. Anonymous: Leptospirosis. *Center for Food Security and Public Health* 2012, 1-7.
77. Larski Z., Truszczyński M.: *Zarys mikrobiologii weterynaryjnej*. Wydawnictwo ART, Olsztyn 1992.

Prof. zw. dr hab. mgr Z. Gliński, Katedra Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin