

Beata Fiecek\*<sup>1</sup>, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska<sup>1</sup>

Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych,  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka rodzaju *Leptospira*. 3. Systematyka *Leptospira* spp. 4. Zakażenia *Leptospira* spp. 4.1. Czynniki chorobotwórcze bakterii z rodzaju *Leptospira*. 4.2. Leptospiroza – objawy i leczenie. 5. Odpowiedź immunologiczna gospodarza na zakażenie *Leptospira* spp. 5.1. Szczepionki. 6. Diagnostyka zakażeń wywołanych przez *Leptospira* spp. 7. Epidemiologia leptospirozy. 8. Podsumowanie

### *Leptospira* spp. spirochetes – pathogenicity and diagnosis of infections

**Abstract:** Leptospirosis is a zoonotic disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. Humans are infected *Leptospira* spp. through contact with urine of carrier animals or contaminated surface water or soil. In humans, leptospirosis can have a wide range of manifestations such as: flu-like symptoms with mild hepatic and renal dysfunction or serious damage of the kidneys, liver, lungs, heart, brain and eyes, ending with the death of the patient. Factors increasing the risk of leptospiral infection include: water sports, fishing, hunting, rice plantation and a profession such as a butcher, a veterinarian, pigs farmer, sewer worker or military personnel. Leptospirosis has similar signs and symptoms to dengue, influenza, and rickettsial diseases. Leptospirosis is increasingly recognized as a public health problem. This disease is a cause of growing morbidity and mortality in both developed and developing countries.

1. Introduction. 2. Characteristics of *Leptospira* spp. 3. Systematics of *Leptospira* spp. 4. *Leptospira* spp. infections. 4.1. Pathogenic factors of the genus *Leptospira*. 4.2. Leptospirosis – symptoms and treatment. 5. Host immune responses to leptospiral infections. 5.1. Vaccines. 6. Diagnosis of infections caused by *Leptospira* spp. 7. The epidemiology of leptospirosis. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** choroba Weil'a, *Leptospira* spp., leptospiroza, zoonoza

**Key words:** *Leptospira* spp., leptospirosis, Weil's disease, zoonosis

## 1. Wstęp

Leptospiroza to występująca na całym świecie choroba odzwierzęca, którą wywołują różne gatunki krętków z rodzaju *Leptospira*. Bakterie te powodują zakażenia w strefach tropikalnych, subtropikalnych i umiarkowanych, gdzie panuje klimat wilgotny i ciepły. Rezerwuarem krętków *Leptospira* spp. są gryznie, psy, koty, świnie, konie, bydło domowe i dzikie zwierzęta.

U zwierząt zakażenie bakteriami z rodzaju *Leptospira* zwykle przebiega bezobjawowo, jednak zwierzęta niewykazujące żadnych objawów chorobowych mogą wydalać krętki z moczem. Głównym nośnikiem zakażenia jest woda i gleba oraz rośliny zanieczyszczone moczem zakażonych zwierząt [4]. Do zakażenia ludzi dochodzi poprzez uszkodzoną skórę, błony śluzowe, spojówkę, inhalację lub przez spożycie bakterii, rzadziej przez ugryzienie przez zakażone zwierzę. Z człowieka na człowieka zakażenie może się przenosić przez łożysko, mleko matki lub kontakty seksualne. Leptospiroza może wywoływać zmiany patologiczne nerek, wątroby, płuc, serca, mózgu i oczu. Ostre zakażenia *Leptospira* spp. mogą prowadzić do śmierci, dlatego niezwykle ważna jest ich szybka diagnostyka i wdrożenie odpowiedniego leczenia [38].

## 2. Charakterystyka rodzaju *Leptospira*

Bakterie z rodzaju *Leptospira* są to cienkie, spiralnie zwinięte, ruchliwe krętki. Zazwyczaj mają 6–20 mikrometrów długości i są haczykowato zakończone, co nadaje im charakterystyczny kształt przypominający „znak zapytania”. Krętki *Leptospira* spp. są bezwzględnie tlenowcami i mają zdolność do wytwarzania zarówno katalazy jak i monoaminoooksydazy. Do optymalnego wzrostu wymagają temperatury od 28 do 30°C. Rosną one na prostych podłożach, wzbogaconych witaminami (witaminy B2 i B12 są czynnikami wzrostu), długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi oraz kwasami i solami amonowymi. Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe są wykorzystywane jako jedyne źródło węgla i są metabolizowane na drodze β-oksydacji [24].

Komórki krętków mają powierzchniowe struktury o cechach zarówno bakterii Gram-ujemnych (obecność LPS i błony zewnętrznej) jak i Gram-dodatnich (ściśły związek błony cytoplazmatycznej z mureiną ściany komórkowej). Ruchliwość bakterii z rodzaju *Leptospira* jest możliwa dzięki dwóm periplazmatycznym wiciom znajdującym się na obydwóch końcach komórki bakteryjnej.

Krętki z rodzaju *Leptospira* zarówno chorobotwórcze jak i niechorobotwórcze mają zdolność do tworzenia

\* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 022 54 21 261; e-mail: bfiecek@pzh.gov.pl

biofilmu. Dzięki tej zdolności, gatunki saprofityczne mogą łatwiej przystosować się do życia w wodzie, a patogennym gatunkom pomagają przetrwać w różnych niszach środowiska i skolonizować gospodarza [33].

### 3. Systematyka *Leptospira* spp.

Do 1989 roku krętki *Leptospira* spp. były podzielone na dwa gatunki, *Leptospira interrogans* obejmujący wszystkie szczepy chorobotwórcze oraz *Leptospira biflexa* zawierający saprofityczne szczepy izolowane ze środowiska. Różnicowano je na podstawie cech fenotypowych. Do gatunku *L. biflexa* zaliczano szczepy mające zdolność do wzrostu w 13°C i w obecności 8-azoguaniny (225 µg/ml) oraz nie mające zdolności do tworzenia form kulistych w 1 M NaCl. Do *L. interrogans* należały szczepy wykazujące cechy przeciwne do cech *L. biflexa*.

Obecnie, fenotypowa klasyfikacja została zastąpiona genotypową, która jest bardziej złożona i może sprawiać wiele trudności w diagnostyce. Na podstawie genetycznej klasyfikacji opartej o analizę hybrydazyjną DNA zidentyfikowano co najmniej 19 gatunków z rodzaju *Leptospira* (13 patogennych i 6 saprofitycznych). Wszystkie rozpoznane gatunki tych bakterii zostały zakwalifikowane do 25 serogrup i 300 serotypów na podstawie różnic w ekspresji powierzchniowo prezentowanego lipopolisacharydu (tab. I).

Natomiast na podstawie filogenetycznej analizy sekwencji 16S rRNA, bakterie te podzielono na trzy grupy: saprofityczną (nie patogenną dla ludzi), patogenną i grupę o cechach pośrednich. Do krętków saprofitycznych należą: *Leptospira biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. yanagawa*, *L. terpstrae* i *L. vantiellii*. Za patogenne gatunki tego rodzaju uznaje się: *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. borgpeterseni*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. alexanderi* i *L. alstoni*. Występują także takie gatunki z rodzaju *Leptospira*, które mają „właściwości pośrednie” pomiędzy tymi dwoma grupami. Zalicza się do nich: *Leptospira inadai*, *L. broomi*, *L. fainei*, *L. wolffii* i *L. licerasiae* [7, 14, 24].

U ludzi, leptospirozę najczęściej wywołują gatunki *L. interrogans*, *L. kirschneri* oraz *L. borgpeterseni*. W Europie występuje głównie *Leptospira interrogans* serotypów Icterohaemorrhagiae i Copenhageni, a w południowoschodniej Azji – *Leptospira interrogans* serotypu Lai [4, 5].

### 4. Zakażenia *Leptospira* spp.

Rozprzestrzenienie krętków *Leptospira* spp. w środowisku, ściśle jest związane z ich krążeniem pomiędzy zwierzęcymi rezerwuarami i ich zdolnością do długo-

trwałego utrzymywania się w organizmie gospodarza. Różne serotypy bakterii z rodzaju *Leptospira* wykazują szczególne powinowactwo do określonego żywiciela, np. szczury (rodzaj *Rattus*) są rezerwuarem serotypu Icterohaemorrhagiae, natomiast myszy domowe (*Mus musculus*) serotypu Ballum. Krętki z rodzaju *Leptospira* zwykle nie wywołują chorób w organizmie głównego żywiciela, do którego są przystosowane [23]. Zakażone przewlekle i bezobjawowo zwierzęta, przenoszą je w kanalikach nerkowych, gdzie krętki tworzą agregaty komórkowe. Mikroorganizmy te są uwalniane i wydalane z moczem do środowiska (ok. 10<sup>7</sup> bakterii na ml), w którym mogą przeżyć od kilku tygodni do kilku miesięcy (wilgotna gleba i woda). Zdolność komórek do agregacji i wytwarzania biofilmu może umożliwiać przetrwanie także poza organizmem gospodarza. Krętki *Leptospira* spp. zakażają głównie zwierzęta hodowlane oraz domowe. Ludzie stanowią przypadkowe ogniwo w cyklu krążenia krętków w środowisku.

Bakterie z rodzaju *Leptospira* są przenoszone na ludzi przez bezpośredni kontakt z zakażonymi zwierzętami lub poprzez zanieczyszczone moczem wody powierzchniowe. Krętki te przenikają przez uszkodzoną skórę lub błony śluzowe, docierając do krwiobiegu i rozprzestrzeniając się we wszystkich tkankach organizmu. Zakażenie wywołuje ostrą gorączkę (wczesna faza), a następnie powoduje poważne objawy ze strony wielu układów (faza późna). Dochodzi do zaburzeń czynności wątroby i żółtaczki, ostrej niewydolności nerek, licznych krwotoków w płucach, zapalenia mięśnia sercowego oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. W większości przypadków zakażeń, układ immunologiczny eliminuje bakterie, jednak mogą one utrzymywać się przez dłuższy czas w organizmie, w immunologicznie uprzywilejowanych dla drobnoustrojów miejscach. Do miejsc tych zalicza się komorę przednią i ciało szkliste oka oraz kanaliki nerkowe. Obecne w nich krętki wywołują zapalenie błony naczyniowej oka (utrzymujące się miesiące po zakażeniu), oraz leptospirozę (tygodnie po ustąpieniu choroby) [4, 25].

#### 4.1. Czynniki chorobotwórcze bakterii z rodzaju *Leptospira*

Mechanizmy patogenezы *Leptospira* spp. są słabo poznane. Genom *Leptospira* spp. zawiera około 3.9–4.6 Mbp w zależności od gatunku i szczepu. *L. borgpetersenii* ma dwa koliste chromosomy oznaczone jako chromosom I (CI; 3,614,456 pb, GC% 41,0) i chromosom II (CII; 3,17,335 pb, GC% 41,2). U *L. interrogans* chromosomy mają wielkość CI 4,277,185 pb (GC% 35,1) oraz CII 350,181 pb (GC% 35,0). *L. borgpeterseni* ma genom o 700 kb mniejszy niż *L. interrogans*, co zapewne ma związek z jej ograniczoną zdolnością do przeżycia

Tabela I

Genotypowa klasyfikacja wybranych chorobotwórczych gatunków bakterii z rodzaju *Leptospira* występujących w Europie [7]

Gatunek	Serogrupa	Serovar
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
	Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
	Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
	Pyrogenes	Pyrogenes
	Bataviae	Bataviae
	Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
	Canicola	Canicola
	Australis	Australis, Bratislava, Lora
	Pomona	Pomona
	Panama	Panama, Mangus
	Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
	Javanica	Javanica
	Ballum	Ballum, Aroborea
	Cynopteri	Cynopteri
	Mini	Mini, Georgia
	Djasiman	Djasiman
	Calledoni	Calledoni
	Sarmin	Sarmin
	Ranarum	Ranarum
	Louisiana	Louisiana, Lanka
Hurstbridge	Hurstbridge	
Manhao	Manhao	
Shermani	Shermani	
Tarassovi	Tarassovi	
<i>Leptospira kirschneri</i>	Bataviae	Djatzi
	Icterohaemorrhagiae	Bogvere, Dakota, Mwogolo, Ndambari, Ndahambukuje
	Grippotyphosa	Grippotyphosa, Ratnapura, Valbuzzi, Vanderhoedeni
	Pomona	Pomona, Kunming, Mozdok, Tsaratsovo
	Canicola	Bafani, Galtoni, Kamituga
	Australis	Australis
	Autumnalis	Bim, Bulgarica, Butembo, Erinaceauriti, Lambwe
	Djasiman	Agogo
	Cynopteri	Cynopteri
	Hebdomadis	Kabura, Kambale
<i>Leptospira borgpeterseni</i>	Javanica	Jjavanica, Ceylonica, Dehong, Menoni, Poi, Sorexjalna
	Ballum	Ballum, Arboreta, Castellonis, Guangdong, Kenya, Soccoestomes
	Tarassovi	Tarassovi, Gengma, Guidae, Kanana, Kisuba, Tunis
	Mini	Mini
	Hebdomadis	Istrica, Jules, Nona, Worsfoldi
	Sejroe	Sejroe, Balcanica, Hardo, Nero, Polonica
	Australis	Pina
	Autumnalis	Srebarna
	Celledoni	Anhoa, Whitcombi
	Bataviae	Moldaviae
	Pyrogenes	Hamptoni, Kwale
<i>Leptospira weilii</i>	Javanica	Coxi, Mengma, Menrun
	Celledoni	Celledoni, Hajnan, Mengdeng
	Sarmin	Sarmin
	Mini	Hekou
	Tarassovi	Langati, Mogdeni, Vughia
	Manhao	Gingshui
	Hebdomadis	Longnan
	Pyrogenes	Menglian
Sejroe	Unipertama	

w środowisku wodnym. *L. interrogans* może długo utrzymywać się w tym środowisku, aż do zetknięcia się z ssakiem [8].

U *L. biflexa* oprócz dwóch chromosomów: CI o wielkości 3,603,977 pz (GC% 38,9) i CII o wielkości 277,995 pz (GC% 39,3), wykryto plazmid o wielkości 74,114 pz (GC% 37,47) oznaczony jako p74, którego brak w szczepach patogennych. W p74 znajduje się 13 genów metabolizmu podstawowego, które także występują w chromosomie I szczepów chorobotwórczych. Całkowita liczba genów kodujących białka u *L. biflexa* wynosi 3 590, u *L. borgpetersenii* wynosi 2 844, a u *L. interrogans* wynosi 3 379. Geny kodujące transpozazy i pseudogeny (niedziałające kopie genów) stanowią około 1–2% genomu [29]. Porównując genomy u patogennych bakterii *L. interrogans* i *L. borgpetersenii* z saprofitycznym gatunkiem *L. biflexa*, zidentyfikowano 2050 wspólnych genów. Odpowiedzialne są one za podstawowe funkcje takie jak: metabolizm DNA i RNA, przetwarzanie i sekrecję białek, utrzymanie odpowiednich struktur i procesów komórkowych oraz metabolizm energetyczny. Stwierdzono także, że *L. interrogans* i *L. borgpetersenii* mają powyżej 900 genów, występujących tylko u tych gatunków i prawdopodobnie kodujących białka związane z wirulencją. Zbadano również, że jedna trzecia genów *L. biflexa* jest nieobecna u patogennych gatunków i zapewne jest związana z możliwością przeżycia w środowisku zewnętrznym. Chociaż prowadzone są liczne badania genomu krętków z rodzaju *Leptospira* to wciąż pozostaje wiele genów o niepoznanej funkcji. U *L. biflexa* jest ich około 40%, u *L. interrogans* z 655 białek występujących u tego gatunku bakterii, 78% nie ma poznanej funkcji. Podobnie jest u *L. borgpetersenii*, z 308 białek występujących tylko u tego gatunku, 58% nie ma przypisanej funkcji [2].

Struktury związane z chorobotwórczością, które udało się zidentyfikować u krętków *Leptospira* spp. to LPS, hemolizyny, białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins – OMP) oraz inne białka powierzchniowe (np. adhezyny).

Lipopolisacharyd (LPS) występujący u bakterii z rodzaju *Leptospira* różni się znacznie od LPS występującego u bakterii Gram-ujemnych pod względem biologicznym, fizycznym i biochemicznym. Aktywność endotoksyczna LPS krętków *Leptospira* spp. jest dużo niższa, niż LPS innych bakterii Gram-ujemnych. Składnikiem LPS odpowiedzialnym za jego toksyczną aktywność jest lipid A, który u bakterii *Leptospira* spp. różni się funkcjonalnie i strukturalnie od lipidu A *Escherichia coli*. Wykazano, że lipid A *L. interrogans* jest nieaktywny w teście krzepnięcia lizatu amebocytów skrzypłocza, standardowo stosowanym do wykrywania endotoksyny bakterii Gram-ujemnych. Lipid A zawiera nietypowy skład kwasów tłuszczowych i metylowaną resztę fosforanową. Nietypowy proces metylacji w pozycji 1 grupy

fosforanowej występuje bardzo rzadko. Inną bakterią, u której stwierdzono obecność takiej metylacji jest *Halobacterium salinarium*.

Nietypową cechą u *L. interrogans* jest obecność pełnego zestawu genów kodujących białka Lpx, które katalizują biosyntezę lipidu A u wszystkich innych Gram-ujemnych bakterii. Takich genów nie mają np. *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* i *T. denticola* [31].

Zdolność hemolizyn *Leptospira* spp. do lizy erytrocytów i innych błon komórkowych czyni je potencjalnymi czynnikami wirulencji. Sfingomielinaza C (*sphA*) występująca u *L. interrogans* serotypu Pomona oraz *L. borgpetersenii* serotypu Hardjo powoduje lizę owczych erytrocytów. Natomiast u *L. interrogans* serotypu Lai występują geny *sphA* i *spaH*, kodujące białka tworzące pory w błonach komórek oraz gen *sph2*, którego produkt indukuje uszkodzenie komórek śród-błonka. U *L. biflexa* stwierdzono brak genu kodującego sfingomielinazę.

Adhezja komórek bakterii do tkanek gospodarza i jego macierzy komórkowej jest niezbędnym etapem procesu patogenezy. *L. interrogans*, w hodowlach *in vitro* wiąże się z komórkami różnych linii (fibroblastami, monocytami/makrofagami, komórkami śród-błonka i komórkami nabłonkowymi nerek) [6]. Białka błony zewnętrznej mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie, uczestnicząc w procesie adhezji, będąc celem dla bakteriobójczych przeciwciał oraz receptorami dla różnych cząsteczek gospodarza. Do białek błony zewnętrznej u krętków z rodzaju *Leptospira* zalicza się LipL32, LipL21, LipL41, Loa22 oraz OmpL1. U *L. interrogans* serotypu Copenhageni wykryto białka OmpA70 i Lsa66 umożliwiające wiązanie się bakterii z tkankami gospodarza. *In vitro*, patogenne gatunki bakterii przenikają do międzykomórkowych przestrzeni śród-błonka podczas gdy saprofityczne szczepy *L. biflexa* nie mają tej zdolności. Kolejnymi czynnikami wirulencji uczestniczącymi w przyleganiu bakterii do komórek gospodarza są zewnętrzne białka powierzchniowe Lig (Leptospiral immunoglobulin-like proteins) i Len (leptospiral endostatin-like protein). Chorobotwórcze gatunki krętków *Leptospira* spp. prezentują na swojej powierzchni białka LigA, LigB i LigC. LigA i LigB, które wiążą elastynę, tropoelastynę, kolagen typu I i IV, lamininę i fibronektynę (składniki macierzy komórkowej). Rodzina białek Len u tych bakterii zawiera białka LenA, LenB, LenC, LenD, LenE i LenF, które również wiążą fibronektynę. Natomiast lipoproteina Loa22 występująca u wirulentnych bakterii *Leptospira* spp. jest wytwarzana podczas ostrej fazy zakażenia. Krętki mające mutację w genie *loa22* są awirulentne jak wykazały badania na świnkach morskich i chomikach. Lipoproteina LipL32 występuje u patogennych (nieobecna u niepatogennych) gatunków *Leptospira* i jest produkowana podczas zakażenia u ludzi. LipL32 wiąże kolagen typu I, IV i V oraz lami-



ninę, a także wykazuje zdolność wiązania fibronektyny, zależną od stężenia wapnia [2, 14, 19, 23, 26].

Wszystkie wyżej wymienione mechanizmy umożliwiają przyleganie i ściśle wiązanie się drobnoustrojów z komórkami eukariotycznymi, co sprawia, że bakterie *Leptospira* spp. mogą kolonizować gospodarza.

#### 4.2. Leptospiroza – objawy i leczenie

Leptospiroza to choroba, która po raz pierwszy została opisana w 1886 roku przez Weila jako nagłe wystąpienie gorączki oraz rozwój zmian wątrobowo-nerkowo-płucnych [22]. Zakażenie krętkami *Leptospira* spp. może powodować bardzo szeroki wachlarz objawów chorobowych od grypopodobnych z łagodnymi zaburzeniami czynności wątroby i nerek do bardzo ciężkich uszkodzeń nerek, wątroby, płuc, serca, mózgu i oczu, często kończących się śmiercią chorego (tab. II.) [20]. Przebieg leptospirozy możemy podzielić na dwa stadia. Pierwsze stadium to faza ostra/bakteriemia trwająca jeden tydzień, kolejnym etapem jest faza immunologiczna, trwająca następny tydzień, która charakteryzuje się produkcją przeciwciał i wydalaniem bakterii z moczem. W opisanym przez Rana waka przypadku chorego wymagającego hospitalizacji, wyniki badań laboratoryjnych wskazywały na znacznie podwyższony w surowicy poziom: amylazy 4200 IU/L (70–340), stężenia kreatyniny o 521 mmol/l (60–120), proteinurię 300 mg/dl, stężenia bilirubiny bezpośredniej [184 umol/l (5–21) oraz wzrost transaminazy asparaginianowej 96 jednostek/l (10–35), aminotransferazy alaninowej 141 jednostek/l (10–40) i fosfatazy alkalicznej 685 jednostek/l (100–360) [32]. Leptospiroza może przejść ze stadium ostrego w stadium przewlekłe, któremu towarzyszy leptospiuria. U gospodarza naturalnego (gryzonia) leptospiuria charakteryzuje się wysoką intensywnością oraz utrzymuje się stale przez dłuższy czas w odróżnieniu od gospodarza przypadkowego

(człowieka), u którego odznacza się niską intensywnością oraz przerywanym i krótkim okresem trwania.

Stwierdzono, genetyczne predyspozycje do ostrego zakażenia bakteriami *Leptospira* spp., które są związane z różnicami w allelach genów powodujących zmiany w receptorach cząsteczek MHC (major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej, zespół białek, odpowiedzialnych za prezentację antygenów limfocytom T). MHC II są to cząsteczki wymagane do prezentacji antygenów dla receptorów CD4+ limfocytów T i zwykle znajdują się na profesjonalnych komórkach prezentujących antygen, takich jak: komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B. Jednak zaobserwowano ekspresję MHC II na komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych w przypadku leptospirowego zapalenia nerek występującego u trzody chlewnej, co może sugerować, że odgrywają rolę w genetycznej predyspozycji zwierząt do zakażenia [26].

W przebiegu leptospirozy, zapalenie opon mózgowych występuje u około 25% przypadków i najczęściej dotyczy osób młodych, poniżej 14 roku życia. Leptospiroza objawiająca się żółtaczką stanowi 5–10%, a postać ostrej niewydolności nerek 16–40% przypadków. Objawy dotyczące układu oddechowego występują u 67% pacjentów, zmiany oczne pojawiają się u około 2–3%, a zapalenie mięśnia sercowego u około 40% chorych. Do bardzo rzadkich powikłań należą: zaburzenia naczyniowo-mózgowe, rozpad mięśni poprzecznie prążkowanych, plamica zakrzepowa, ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego, rumień guzowaty, zwężenie zastawki aortalnej, zespół Kawasaki, reaktywne zapalenie stawów, zapalenie najądrza, porażenie nerwów, hipogonadyzm u mężczyzn, oraz zespół Guillain-Barré [24].

Leptospiroza może mieć łagodny przebieg, tylko z objawami grypopodobnymi i niewielkimi zaburzeniami czynności wątroby i nerek. Krętki pomimo odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza, mogą przeżyć, namnażać się i uwalniać się z makrofagów

Tabela II  
Objawy kliniczne występujące w różnych stadiach leptospirozy u ludzi [15]

Bez zmian żółtaczkowych		Ze zmianami żółtaczkowymi (choroba Weila)	
Faza wczesna*	Faza późna**	Faza wczesna*	Faza późna**
gorączka	gorączka	gorączka	Gorączka
bóle mięśni	zapalenie opon mózgowych	żółtaczka	żółtaczka
ból głowy	zapalenie błony naczyniowej oka	krwotoki	krwotoki
ból brzucha	wysypka	niewydolność nerek	niewydolność nerek
wymioty	zapalenie płuc	zapalenie mięśnia sercowego	zapalenie mięśnia sercowego
wybroczyny		zapalenie wątroby	zapalenie wątroby
przekrwienie spojówek		zapalenie płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)	zapalenie płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS)
bakteriemia		bakteriemia	

\* trwa 3–7 dni, \*\* trwa 7–30 dni, faza immunologiczna

do zewnątrzkomórkowego środowiska. Następnie kolonizują kanaliki nerkowe i są wydalane z moczem, stanowiąc źródło zakażenia, o czym zakażony człowiek może nie wiedzieć, traktując występujące objawy jako grypę [10, 34].

Leptospiroza u kobiet w ciąży przebiega w postaci ostrej infekcji, która często prowadzi do śmierci płodu i poronienia. Chung i współpracownicy wyizolowali krętki z płynu owodniowego, łożyska i krwi pępowinowej noworodka oraz uwidocznili je w wątrobie i nerkach metodą srebrzenia. Bakterie te są również obecne w ludzkim mleku i prawdopodobnie są przekazywane przez zakażoną matkę dziecku podczas karmienia piersią [11].

Do czynników zwiększających ryzyko zakażenia zalicza się: uprawianie sportów wodnych, wędkarstwo, łowiectwo, prowadzenie plantacji ryżu oraz wykonywanie takich zawodów jak rzeźnik, weterynarz, hodowca trzody chlewnej, pracownik kanalizacji lub przebywający w terenie personel wojskowy [16, 36].

W diagnostyce różnicującej leptospirozę, muszą być brane pod uwagę zakażenia wirusowe i bakteryjne takie jak: grypa, wirusowe zapalenie wątroby, HIV, rikietsjoza oraz mononukleozą zakaźną.

Leczenie odpowiednimi antybiotykami należy rozpocząć natychmiast po pojawieniu się podejrzenia leptospirozy. Najlepiej gdy ma to miejsce do piątego dnia od rozpoczęcia się choroby. Skuteczność leczenia antybiotykami po piątym dniu choroby jest wątpliwa. W przypadku podejrzenia leptospirozy nie należy czekać z rozpoczęciem leczenia antybiotykami do czasu otrzymania wyników badań laboratoryjnych. Przeciwciała wykrywane są dopiero po około tygodniu od wystąpienia objawów choroby, a hodowle bakteryjne uzyskuje się po kilku tygodniach. Krętki *Leptospira* spp. bardzo wolno rosną na standardowych podłożach bakteriologicznych. Ich hodowla, w celu uzyskania czystych kultur wymaga specjalnych półpłynnych oraz płynnych podłoży i może trwać od kilku tygodni do kilku miesięcy. Postępowanie wymaga doświadczonego personelu.

Lekooporność tych bakterii występuje rzadko i podejrzewana jest zwykle wtedy, kiedy u chorego następuje nieoczekiwane pogorszenie stanu klinicznego, pomimo podawania antybiotyku.

Metoda rozcieńczeń w bulionie opisywana już 2004 roku, okazała się zbyt czasochłonna aby mogła być stosowana w laboratoriach diagnostyki mikrobiologicznej. W 2013 roku, Wuthikann i wsp. oznaczyli wrażliwość 109 izolatów krętków *Leptospira* spp. na penicylinę G, doksycyklinę, cefotaksym, ceftriaksone i chloramfenikol stosując E-testy. Do tego celu opracowano specjalne podłoże (nazwane LVW) znacznie przyspieszające wzrost krętków. Wartość MIC<sub>90</sub> (Minimal Inhibitory Concentration; minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów dla 90% izolatów)

wynosiła odpowiednio: 0,064 jednostki/ml, 0,19 µg/ml, 0,047 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2 µg/ml. Ze względu na brak prostych metod oznaczania wrażliwości krętków *Leptospira* spp. na antybiotyki, leczenie leptospirozy opiera się głównie na empirycznej terapii, czyli obserwacji stanu chorego po podaniu antybiotyku [27, 41].

Przyjmuje się, że ciężkie przypadki leptospirozy powinny być leczone dużymi dawkami dożylnych penicyliny. Po jej podaniu jednak mogą wystąpić reakcje Jarisch-Herxheimera. Lżejsze przypadki należy leczyć doustnymi antybiotykami, takimi jak amoksycylina, ampicylina, doksycyklina lub erytromycyna. Cefalosporyny trzeciej generacji, takie jak ceftriaksone i cefotaksym oraz leki z grupy chinolonów również wydają się być skuteczne przy leczeniu tego zakażenia [40]. Doksycyklina może być stosowana w celu zapobiegania zakażeniom u osób podróżujących w obszarach wysokiego ryzyka.

## 5. Odpowiedź immunologiczna gospodarza na zakażenie *Leptospira* spp.

Odporność na zakażenie *Leptospira* spp. jest typu humoralnego. Swoiste przeciwciała klasy IgM i IgG są wykrywane metodami serologicznymi. Przeciwciała klasy IgM, mogą być wykryte 4–5 dni po wystąpieniu objawów i utrzymują się co najmniej 5 miesięcy. Natomiast przeciwciała klasy IgG można oznaczyć około 7 dnia choroby i utrzymują się do 6 lat po wystąpieniu infekcji. Przeciwciała wytwarzane głównie przeciw lipopolisacharydowi (LPS), wykazują swoistość względem określonego serotypu bakterii z rodzaju *Leptospira*.

Wrodzona odpowiedź immunologiczna oparta jest na rozpoznawaniu tzw. wzorców molekularnych związanych z patogenem (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs). Receptory dla cząsteczek PAMP określane są jako receptory PRRs (pattern recognition receptors) rozpoznające konserwowane mikrobiologiczne motywy takie jak: peptydoglikany i LPS. Przykładem receptora PRR jest TLR4 (Toll like receptor), który sygnalizuje obecność LPS bakterii Gram-ujemnych w połączeniu z receptorem CD14 znajdującym się na powierzchni makrofagów i limfocytów B oraz z białkiem MD-2. LPS łącząc się z TLR4 aktywuje czynniki transkrypcyjne tj. jądrowy czynnik NF-κB i indukuje produkcję zapalnych interleukin IL-1β, IL-6, IL-8 oraz TNF (czynnika martwicy nowotworu). TLR2 jest odpowiedzialny za rozpoznanie składników bakterii Gram-dodatnich takich jak: lipoarabinomannan *Mycobacterium tuberculosis* oraz aktywujący makrofagi lipopeptyd 2 (MALP-2). TLR2 wraz z TLR6 wyzwała wewnątrzkomórkową sygnalizację poprzez kinazy białkowe MAPK (MAPKs – mitogen-activated protein kinases) oraz NF-κB. Obecność zarówno TLR2

jak i TLR4 jest niezbędna do skutecznej wrodzonej odporności na zakażenia krętkami *Leptospira* spp. Na podstawie wielu badań stwierdzono, że u myszy odpowiedź układu immunologicznego na obecność LPS *Leptospira* spp. jest związana z aktywacją receptorów TLR4 i TLR2. Jednak u ludzi w odpowiedzi na zakażenie tym patogenem aktywowane są tylko receptory TLR2. LPS *L. interrogans* wiąże się z CD14 i TLR2, nie uruchamiając szlaku sygnałowego związanego z TLR4, co sugeruje, że lipid A w LPS tych bakterii nie jest rozpoznawany przez ludzkie TLR4. TLR2 i TLR4 ulegają silnej ekspresji na powierzchni komórek nabłonka kanalików nerkowych. TLR2 pośredniczy we wczesnej odpowiedzi zapalnej spowodowanej obecnością chorobotwórczych krętków w proksymalnych kanalikach nerkowych.

Wirulentne krętki *Leptospira* spp. mogą unikać fagocytozy poprzez ucieczkę z fagosomu do cytoplazmy komórkowej. Inwazyjność bakterii *Leptospira* spp. wydaje się być także związana z ich zdolnością do uniknięcia działania układu dopełniacza. Niechorobotwórcze bakterie *Leptospira* spp. są zabijane zaraz po ekspozycji na składniki układu dopełniacza. Badania dotyczące odporności patogennych gatunków *Leptospira* na działanie składników układu dopełniacza wykazują, że jest ona związana ze zdolnością chorobotwórczych gatunków *Leptospira* spp. do wiązania czynnika H i białka 1 podobnego do czynnika H (FHL-1), które są głównymi regulatorami alternatywnego szlaku. W wiązaniu czynnika H biorą udział bakteryjne białka powierzchniowe: LenA (Leptospiral endostatin-like protein A), LS24 (adhezyna) i LenB, które chronią bakterie przed skutkami aktywacji dopełniacza [12, 19, 23, 39].

### 5.1. Szczepionki

Początki pracy nad szczepionką przeciw zakażeniu *Leptospira* spp. sięgają 1916 roku, kiedy to stwierdzono, że podanie zabitych bakterii chroni przed infekcją. Wszystkie szczepionki przeciw leptospirozie były podawane zwierzętom hodowlanym i domowym, a w następnych latach stosowane do uodpornienia ludzi. Jednak korzystanie z tych szczepionek jest ograniczone z powodu występowania niepożądanych reakcji i krótkotrwałej odporności wyłącznie na serotyp zawarty w szczepionce. Szczepionki poliwalentne umożliwiają uzyskanie odporności na wiele krążących w środowisku serotypów. Natomiast pojawienie się nowego serotypu wiąże się z kolejnymi wysokimi kosztami badań i wdrażania nowych preparatów. Obecnie, potencjalnymi kandydatami do opracowywania szczepionek są białka powierzchniowe bakterii, które nie różnią się pomiędzy serotypami [21, 23].

Obiecującymi kandydatami do produkcji szczepionki pojednostkowej są białka Lig, które nadają

wysoki poziom odporności, sięgający u myszy i chomików 100%. Fragment DNA zawierający gen *lip32* w połączeniu z DNA adenowirusowym (szczepionki rekombinowane) wykazuje zdolność do wywołania odporności immunologicznej. Podobnie, immunizacja chomików białkami LipL41 i OmpL1 zapewnia częściową ochronę przed letalnymi zmianami występującymi podczas zakażenia krętkami *Leptospira* spp.

Wszystkie prowadzone badania nad białkami powierzchniowymi bakterii z rodzaju *Leptospira*, nie tylko przyczyniają się do uzyskiwania szczepionek wywołujących wysoki poziom odporności z rzadko występującymi reakcjami niepożądanymi, ale jednocześnie sprzyjają rozwojowi diagnostyki i powstawaniu nowych testów przyspieszających wykrywanie zakażenia.

### 6. Diagnostyka zakażeń wywołanych przez *Leptospira* spp.

Metodami stosowanymi w diagnostyce laboratoryjnej leptospirozy są: posiew bezpośredni z krwi i moczu, test aglutynacji mikroskopowej (MAT), test immunoenzymatyczny ELISA, test immunofluorescencyjny (IFA) a także PCR. Leptospiremia występuje w pierwszym etapie leptospirozy, przed wystąpieniem objawów i zwykle kończy się pod koniec pierwszego tygodnia ostrej fazy. Posiew należy wykonać jak najszybciej po wystąpieniu objawów. Przetrawianie krętków *Leptospira* spp. w ludzkim moczu jest ograniczone, dlatego mocz powinien być poddany odpowiedniej obróbce zaraz po pobraniu od zakażonego pacjenta. Posiew z krwi i moczu wykonuje się na podłożu płynnym, półpłynnym (0.1–0.5% agaru) lub stałym (0.8–1.3% agaru) zawierającym albuminę surowicy bydlęcej, fosforany potasu i sodu, chlorki magnezu, wapnia, żelaza, miedzi i cynku; sole amonowe, tiaminę (B1 wit.), glicerol, wit. B12, Tween 80, pirogronian sodu, 5-fluorouracyl oraz długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Standardowo stosowane jest podłoże EMJH (ELLINGHAUSEN and MCCULLOUGH, modified by JOHNSON and HARRIS). Hodowle inkubowane są w temperaturze 28 do 30°C i oglądane co tydzień w ciemnym polu widzenia, przez 13 tygodni. Hodowle, w których stwierdzono wzrost krętków, mogą być przenoszone za pośrednictwem filtrów do świeżej pożywki.

Jest to jednak zbyt długi okres oczekiwania na prawidłowe rozpoznanie zakażenia, dlatego standardowo, zgodnie z zaleceniami WHO, lekarze w przypadku podejrzenia leptospirozy wdrażają antybiotykoterapię. Referencyjną metodą diagnostyki laboratoryjnej jest test aglutynacji mikroskopowej (MAT – microscopic agglutination test). W teście tym surowice pacjentów reagują z zawiesinami „żywych” antygenów, czyli kolekcją szczepów różnych serotypów krętków *Leptospira*.



Po inkubacji mieszaniny surowicy i antygeny stopień aglutynacji jest badany mikroskopowo w ciemnym polu widzenia. Zarówno metoda hodowli jak również MAT są pracochłonne i wymagają dłuższego czasu do uzyskania wyniku. Identyfikacja *Leptospira* spp. przy zastosowaniu testu MAT wymaga stałego utrzymywania hodowli wielu szczepów, reprezentujących różne serotypy poszczególnych gatunków tych bakterii, a ponadto stwarza trudności interpretacyjne przy jednokrotnym badaniu surowic. Wskazane w związku z tym jest kilkukrotne badanie materiału pacjenta i monitorowanie dynamiki przeciwciał. Miano 200 i kliniczne objawy choroby przyjmowane są jako leptospiroza u mieszkańców, których ekspozycja na krętki *Leptospira* spp. jest rzadkością. W obszarach, gdzie leptospiroza występuje endemicznie uznaje się miano 800 i objawy wskazujące na leptospirozę. Miano po ostrej infekcji mogą być bardzo wysokie ( $\geq 25\ 600$ ) i mogą utrzymywać się przez miesiące, a nawet lata.

Utrudnieniem w prowadzeniu zarówno hodowli jak i testu MAT jest cotygodniowe pasażowanie dużej liczby szczepów, co jest pracochłonne i stwarza zagrożenie dla pracowników laboratoryjnych. Istnieje także ryzyko zanieczyszczenia kultur. W związku z tym wymagana jest okresowa weryfikacja każdego serotypu. Ponadto, na miano testu MAT wpływa rodzaj podłoża hodowlanego, w którym hoduje się szczepy mające posłużyć jako antygeny. Zestaw antygenów powinien obejmować serotypy wszystkich gatunków, zwłaszcza tych występujących na danym terenie. Miano przeciwciał dla krętków występujących w środowisku są często wyższe niż miano dla szczepów laboratoryjnych tej samej serogrupy. Interpretację MAT komplikuje bardzo częste występowanie reakcji krzyżowych, zachodzących pomiędzy różnymi serogrupami, zwłaszcza w ostrej fazie. Często, nie jest możliwe rozróżnienie dominującej serogrupy aż do kilku miesięcy po zakażeniu. Zdarza się także, że osoby zakażone mają podobne miano dla wszystkich serotypów badanej serogrupy.

Obecnie, metodą stosowaną w diagnostyce jest test ELISA, służący do oznaczania swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG dla krętków *Leptospira* spp., występujących w surowicy pacjenta. Test ELISA jest metodą znacznie szybszą. Badania porównujące wyniki uzyskane metodą MAT i ELISA wykazały, że 90% dodatnich próbek badanych metodą MAT było również dodatnich w klasie IgM, w odczynie ELISA, a 82% ujemnych próbek w MAT było także ujemnych w teście IgM ELISA. Zgodność dodatnich wyników uzyskanych metodą IgM ELISA i PCR wynosiła 61%. Porównując testy komercyjne ELISA różnych producentów można powiedzieć, że czułość testów jest podobna, przy niewielkich różnicach ich swoistości [28, 35].

Badania molekularne stosowane w diagnostyce leptospirozy opierają się na reakcji łańcuchowej poli-

merazy (metoda PCR). DNA bakteryjne izoluje się z krwi, moczu oraz tkanek osoby zakażonej. Do reakcji PCR stosuje się startery komplementarne do 16S i 23S rRNA. Startery rrs komplementarne do 16S rRNA dają produkt o wielkości 331 pz i umożliwiają amplifikację zarówno chorobotwórczych jak i niechorobotwórczych krętków *Leptospira* spp. Startery G1 (5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3') i G-2 (5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3') najczęściej stosowane w diagnostyce zakażenia bakteriami *Leptospira* spp. nie umożliwiają amplifikacji *L. kirschneri*, dlatego dodatkowo powinno się zastosować startery B64-I (5'-CTGAATTCT-CATCTCAACTC-3') oraz B64-II (5'-GCAGAAATC AGATGGA CGAT-3'). Do wykrycia i identyfikacji różnych serotypów bakterii w moczu można zastosować startery komplementarne do IS 1533. Jest to metoda czuła i pomocna w okresie ostrej fazy zakażenia [18, 24].

## 7. Epidemiologia leptospirozy

Leptospiroza jest coraz częściej uznawana jako problem zdrowia publicznego. Zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się obserwuje się wzrost zachorowalności i śmiertelności z jej powodu. W krajach rozwiniętych występowanie zakażenia krętkami *Leptospira* spp. jest zwykle związane z narażeniem na kontakt z zanieczyszczoną krętkami wodą.

W krajach Azji Południowo-Wschodniej leptospiroza występuje endemicznie. W ciągu roku nasłynie odnotowuje się średnio 10000 przypadków ciężkich, wymagających hospitalizacji. Podczas ostatnich kilku lat zgłoszono kilka ognisk leptospirozy w różnych miejscach: Azji, Ameryki Łacińskiej i Afryki (Nikaragua, Salvador i Rio de Janeiro w Brazylii, Indie, Barbados, Grenada, Gwadelupa, Jamajka oraz Trynidad i Tobago) [1, 30].

W Europie, leptospiroza nie jest często wykrywana poza Francją i Wielką Brytanią, gdzie ostatnio nastąpił wzrost zakażeń tymi krętkami. We Francji, występowanie choroby podlega wahaniom w zależności od rejonu geograficznego. Stałe monitorowanie leptospirozy wykonywane przez National Reference Centre (CNR), potwierdza około 600 przypadków zakażeń krętkami *Leptospira* spp. rocznie [3, 30, 38].

Uważa się, że tak duża liczba zakażeń związana jest z dużym zanieczyszczeniem wód słodkowodnych. Izolacja patogennych gatunków z rodzaju *Leptospira* z wody środowiskowej jest trudna. Ciągłe prowadzi się badania nad metodami skutecznego wykrywania i ilościowego oznaczania krętków w tym środowisku. W 2012 roku opracowano metody izolacji DNA z próbek słodkowodnych oraz wykrywania DNA wszystkich patogennych gatunków *Leptospira* spp. metodą real-time PCR. Do oznaczeń użyto startery



komplementarne dla genu LipL32. Metodą tą można wykryć od 10 do 10<sup>7</sup> komórek bakteryjnych/ml. W Polsce nie były dotychczas prowadzone badania dotyczące monitorowania obecności krętków *Leptospira* spp. w wodach powierzchniowych [37].

W Wielkiej Brytanii w latach 2006–2010 wykryto 301 przypadków leptospirozy z czego 78 przypadków (25,9%) zostało zawleczonych [17]. Zarówno we Francji jak i Wielkiej Brytanii najczęściej występuje serotyp Icterohaemorrhagiae.

We Włoszech w latach 1995–2001 zbadano 250 osób, z których 14 (5,60%), okazało się serododatnich [9]. W Polsce zgodnie z wydawanymi przez Zakład Epidemiologii NIZP-PZH meldunkami epidemiologicznymi w latach 2009–2012 zgłoszono 16 przypadków zachorowań na leptospirozę. Wszyscy chorzy wymagali hospitalizacji. Zapadalność na tę chorobę wynosi 0,01 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców w ciągu roku. Niewielka liczba przypadków leptospirozy może wynikać z tego, że choroba ta często nie jest rozpoznawana. Leptospiroza jest nie tylko trudna do diagnozowania klinicznego, ale także metody diagnostyki laboratoryjnej są czasochłonne oraz trudne do interpretacji.

W Polsce, w latach 1995–2002 Czerwiński i Sadkowska-Todys przeprowadzili analizę 66 zarejestrowanych zachorowań z których wynikało, że 41 przypadków leptospirozy zostało potwierdzonych testem MAT, a 25 przypadków było podejrzanych o zakażenie, ponieważ nie wykonano pacjentom badań laboratoryjnych lub ich wyniki były wątpliwe, natomiast obraz kliniczny odpowiadał zakażeniu krętkami *Leptospira* spp. [13]. W 2012 roku Fiecek i wsp. stwierdzili obecność przeciwciał dla *Leptospira* spp. u 23,6% badanych hodowców trzody chlewnej i weterynarzy oraz 26,2% pracowników gospodarki komunalnej, co wskazuje, że występowanie tego zakażenia jest znacznie częstsze niż jest to rozpoznawane i zgłaszane do Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych [16].

## 8. Podsumowanie

Obecnie wiadomo, że krętki *Leptospira* spp. są przenoszone na ludzi podczas bezpośredniego kontaktu z zakażonymi zwierzętami lub poprzez zanieczyszczone ich moczem wody powierzchniowe. U ludzi leptospiroza może powodować bardzo szeroki wachlarz objawów chorobowych od grypopodobnych, łagodnych zaburzeń czynności wątroby i nerek do bardzo ciężkich uszkodzeń nerek, wątroby, płuc, serca, mózgu i oczu, często kończących się śmiercią chorego. Do czynników zwiększających ryzyko zakażenia zalicza się: uprawianie sportów wodnych, wędkarstwo, łowiectwo, prowadzenie plantacji ryżu oraz wykonywanie takich zawodów jak rzeźnik, weterynarz, hodowca trzody chlewnej, pra-

ownik kanalizacji lub przebywający w terenie personel wojskowy. W diagnostyce różnicującej leptospirozę, muszą być brane pod uwagę zakażenia wirusowe i bakteryjne takie jak: grypa, wirusowe zapalenie wątroby, HIV, riketsjoza, mononukleoza zakaźna.

## Piśmiennictwo

- Adesiyun A.A., Baboolal S., Suepaul S., Dookeran S., Stewart-Johnson A.: Human leptospirosis in the Caribbean, 1997–2005: characteristics and serotyping of clinical samples from 14 countries. *Rev. Panam. Salud. Publica*, **29**, 350–357 (2011)
- Adler B., Lo M., Seemann T., Murray G.L.: Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet. Microbiol.* **153**, 73–81 (2011)
- Assez N., Mauriau-court P., Cuny J., Goldstein P., Wiel E.: Fever and jaundice and if it was a leptospirosis. About a case of *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae in Northern France. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **32**, 439–443 (2013)
- Bharti A.R., J. M. Vinetz i wsp.: Leptospirosis: a zoonotic diseases of global importance. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 757–771 (2003)
- Boonsilp S., S.J. Peacock i wsp.: A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e1954 (2013)
- Breiner D.D., Fahey M., Salvador R., Novakova J., Coburn J.: *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. *Infect. Immun.* **77**, 5528–5536 (2009)
- Brenner D.J., Kaufmann A.F., Sulzer K.R., Steigerwalt A.G., Rogers F.C., Weyant R.S.: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **2**, 839–858 (1999)
- Bulach D.M., B. Adler.: Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14560–14565 (2006)
- Cerri D., Ebani V.V., Fratini F., Pinzauti P., Andreani E.: Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a “diagnostic laboratory for leptospirosis” from 1995 to 2001. *New Microbiol.* **26**, 383–389 (2003)
- Chow E., Deville J., Nally J., Lovett M., Nielsen-Saines K.: Prolonged *Leptospira* urinary shedding in a 10-year-old girl. *Case Rep. Pediatr.* **2012**, 169013 (2012)
- Chung H.L., Ts’ao W.C., Mo P.S., Yen C.: Transplacental or congenital infection of leptospirosis. *Chin. Med. J.* **82**, 777–782 (1963)
- Cinco M.: New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *New Microbiol.* **33**, 283–292 (2010)
- Czerwiński M., Sadkowska-Todys M.: Epidemiologic analysis of human leptospirosis in Poland in 1995–2002. I. Clinical features and laboratory diagnosis. *Przegl. Epidemiol.* **58**, 197–205 (2004)
- Evangelista K.V., Coburn J.: *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* **5**, 1413–1425 (2010)
- Farrar W.E.: *Leptospira* species (leptospirosis) (w) Principles and practice of infectious disease, red. G.L. Mandell, J. Bennett, R. Dolin, Churchill Livingstone Inc., USA, 1995, tom 2, s. 2137–2140, 4<sup>th</sup> ed.
- Fiecek B., Grochowalska A., Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Leptospira* spp. and *Coxiella burnetii* infections occurring in Radomskie District in people of selected professional groups. *Przegl. Epidemiol.* **66**, 605–610 (2012)

17. Forbes A.E., Zochowski W.J., Dubrey S.W., Sivaprakasam V.: Leptospirosis and Weil's disease in the UK. *QJM*, **105**, 1151–1162 (2012)
18. Gebriel A.M., Subramaniam G., Sekaran S.D.: The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. *Trop. Biomed.* **23**, 194–207 (2006)
19. Gonçalves-de-Albuquerque C.F., Burth P., Silva A.R., Younes-Ibrahim M., Castro-Faria-Neto H.C., Castro-Faria M.V.: *Leptospira* and inflammation. *Mediators Inflamm.* **2012**, 317950 (2012)
20. Gulati S., Gulati A.: Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Lung India.* **29**, 347–353 (2012)
21. Ido Y., Hoki R., Ito H., Wani H.: The prophylaxis of Weil's disease *Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*. *J. Exp. Med.* **24**, 471–483 (1916)
22. Inada R., Ido Y., Hoki R., Kaneko R., Ito H.: The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*) *J. Exp. Med.* **23**, 377–402 (1916)
23. Ko A.I., Goarant C., Picardeau M.: *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 736–747 (2009)
24. Levett P.N.: Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 296–326 (2001)
25. Mc Bride A.J., Athanazio D.A., Reis M.G., Ko A.I.: Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**, 376–386 (2005)
26. Monahan A.M., Callanan J.J., Nally J.E.: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet. Pathol.* **46**, 792–799 (2009)
27. Murray C.K., Hospenthal D.R.: Broth microdilution susceptibility testing for *Leptospira* spp.. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1548–1552 (2004)
28. Ooteman M.C., Vago A.R., Koury M.C.: Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods*, **65**, 247–257 (2006)
29. Picardeau M., B. Adler i wsp.: Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS One*, **3**, e1607 (2008)
30. Picardeau M.: Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* **43**, 1–9 (2013)
31. Que-Gewirth N.L.S., Ribeiro A.A., Kalb S.R., Cotter R.J., Bulach D.M., Adler B., Girons I.S., Werts C., Raetz C.R.H.: A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* Lipid A: The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J. Biol. Chem.* **279**, 25420–25429 (2004)
32. Ranawaka N., Jeevagan V., Karunanayake P., Jayasinghe S.: Pancreatitis and myocarditis followed by pulmonary hemorrhage, a rare presentation of leptospirosis- a case report and literature survey. *BMC Infect. Dis.* **24**, 13–38 (2013)
33. Ristow P., Bourhy P., Kerneis S., Schmitt C., Prevost M.C., Lilenbaum W., Picardeau M.: Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology*, **154**, 1309–1317 (2008)
34. Toma C., Okura N., Takayama C., Suzuki T.: Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol.* **13**, 1783–1792 (2011)
35. Trombert-Paolantoni S., Thomas P., Hermet E., Clairet V., Litou N., Maury L.: Leptospirosis screening: performance of the Serion Elisa Classic *Leptospira* IgM KIT. *Pathol. Biol.* **58**, 95–99 (2010)
36. Utzinger J., Becker S.L., Knopp S., Blum J., Neumayr A.L., Keiser J., Hatz C.F.: Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly*, **22**, 142:w13727 (2012)
37. Vein J., Perrin A., Berny P.J., Benoit E., Leblond A., Kodjo A.: Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can. J. Microbiol.* **58**, 28–35 (2012)
38. Vijayachari P., Sugunan A.P., Shriram A.N.: Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* **33**, 557–569 (2008)
39. Werts C.: Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Med. J.* **33**, 591–601 (2010)
40. World Health Organization.: Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland, WHO, ISBN 92 4 154589 5 (2003)
41. Wuthiekanun V., Peacock S.J. i wsp.: Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LVW agar. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 297–302 (2013)